

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 917**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2014 PCT/US2014/049957**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15021166**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2014 E 14752744 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 3011345**

54 Título: **Proteínas biomarcadoras del síndrome urémico hemolítico atípico (SUHA)**

30 Prioridad:

07.08.2013 US 201361863299 P

06.12.2013 US 201361913180 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2018

73 Titular/es:

ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
100 College St.
New Haven, Connecticut 06510, US

72 Inventor/es:

MCKNIGHT, SUSAN FAAS;
COFIELL, ROXANNE;
KUKREJA, ANJLI;
BEDARD, KRYSTIN, A. y
YAN, YAN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 650 917 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas biomarcadoras del síndrome urémico hemolítico atípico (SUHA)

5 **Campo técnico**

El campo de la invención es la medicina, la inmunología, la biología molecular y la química de proteínas.

10 **Antecedentes**

15 El síndrome urémico hemolítico (SUH) se caracteriza por trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática e insuficiencia renal aguda. SUH se clasifica como uno de dos tipos: SUH asociado a diarrea (SUH D+; también denominado SUH de *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) o SUH típico) y SUH no diarreico o atípico (SUHa). El SUH D+ es la forma más común, que representa más del 90 % de los casos y está provocada por una enfermedad precedente con una bacteria productora de toxina de tipo Shiga, por ejemplo, *E. coli* O157:H7. SUHa es poco habitual y tiene una tasa de mortalidad de hasta el 25 %. Muchos pacientes con esta enfermedad sufrirán insuficiencia renal o neurológica permanente, por ejemplo, al menos el 50 % de los pacientes con SUHa progresan a insuficiencia renal de estadio final (SRF). Véase, por ejemplo, Kavanagh *et al.* (2006) British Medical Bulletin 77 y 78: 5-22.

20 El SUHa puede ser genético, adquirido o idiopático. Las formas heredables de SUHa pueden estar asociadas con mutaciones en varios componentes del complemento humano incluyendo, por ejemplo, factor de complemento H (CFH), proteína de cofactor de membrana (MCP), factor de complemento I (CFI), proteína de unión a C4b (C4BP), factor de complemento B (CFB) y componente del complemento 3 (C3). Véase, por ejemplo, Caprioli *et al.* (2006) Blood 108: 1267-1279. Ciertas mutaciones en el gen que codifica CD55, aunque aún no estén implicadas en SUHa, están asociadas con la gravedad del SUHa. Véase, por ejemplo, Esparza-Gordillo *et al.* (2005) Hum Mol Genet 14: 703-712.

25 Hasta recientemente, las opciones de tratamiento para pacientes con SUHa estaban limitadas y con frecuencia implicaban infusión de plasma o intercambio de plasma. En algunos casos, los pacientes con SUHa experimentan nefrectomía uni o bilateral o trasplante renal (véase Artz *et al.* (2003) Transplantation 76: 821-826). Sin embargo, es habitual la reaparición de la enfermedad en pacientes tratados. Recientemente, se aprobó el tratamiento de los pacientes con SUHa con el fármaco Soliris® en los Estados Unidos de América y en Europa. A pesar de tener finalmente un fármaco útil para el tratamiento de pacientes con SUHa, aún existe la necesidad de diagnosticar a pacientes con SUHa, así como supervisar la progresión y la disminución de SUHa.

30 Okamoto *et al.* (2011) Journal of Immunoassay and Immunochemistry 32(2): 145-155 describe un ensayo ELISA usado para mostrar que los niveles de sTNFR1 y sTNFR2 en orina de pacientes con SUH eran notablemente mayores que los de niños sanos desde el inicio del síndrome urémico hemolítico diarrea positivo (SUH D+).

40 **Sumario**

La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, una diversidad de proteínas cuya actividad y/o concentración en un líquido biológico es anómala en pacientes aquejados de SUHa y/o los pacientes con SUHa que reciben terapia de inhibidor del complemento. En lo sucesivo en el presente documento estas proteínas se denominan "proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa" o "proteínas biomarcadoras de SUHa". Por ejemplo, los inventores han observado que las concentraciones y/o actividades de varias proteínas en la sangre (por ejemplo, suero y/o plasma) y orina son anómalas en pacientes con SUHa. Los inventores también han observado que, después de la administración de un anticuerpo antagonista anti C5 (eculizumab) a un ser humano, las concentraciones de un subconjunto de estas proteínas cambian. En algunos casos, la concentración de una o más de las proteínas se normaliza. Aunque la divulgación no está ligada a ninguna teoría o mecanismo de acción particular, los inventores creen que la supervisión de un paciente tratado con un inhibidor del complemento (tal como un anticuerpo anti C5) con respecto a un cambio de concentración de una o más de estas proteínas, proteínas biomarcadoras de SUHa, es útil para, por ejemplo, diagnosticar que un paciente tiene o está en riesgo de desarrollar SUHa. La supervisión del estado de una o más de estas proteínas biomarcadoras también puede ser útil para determinar si un paciente con SUHa está respondiendo a la terapia con un inhibidor del complemento. Además, la evaluación del estado de uno o más de los biomarcadores también es útil para identificar una dosis, una dosis umbral, de un inhibidor del complemento, tal como un anticuerpo anti C5, que en virtud de su efecto en la concentración de una o más de las proteínas biomarcadoras de SUHa en el ser humano es suficiente para conseguir un efecto clínicamente significativo en la enfermedad (es decir, suficiente para tratar una enfermedad asociada al complemento, tal como SUHa).

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención proporciona un inhibidor del complemento, que es un anticuerpo anti C5 o un fragmento de unión a C5 del mismo, para uso en un método para tratar síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa), comprendiendo el método:

65 (a) determinar la concentración de al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en un líquido

biológico obtenido de un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar, SUHa, en el que las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa son TNFR1 y al menos otra proteína biomarcadora asociada con SUHa seleccionada de: CXCL10, MCP-1, IFN γ , IL-6, un fragmento proteolítico de factor componente del complemento B, C5b9 soluble (sC5b9), fragmento de protrombina F1+2, d-dímero,

5 trombomodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), componente del complemento C5a, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), albúmina, CXCL9, KIM-1, ligando CD40 soluble (sCD40L), ICAM-1, IL-1 beta, IL-12 p70, IL-8 y factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF); y

10 (b) administrar al sujeto el inhibidor del complemento en una cantidad y con una frecuencia suficientes para reducir la concentración de las al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa, en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor del complemento.

15 En una realización, la concentración reducida de las al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa puede producirse en dos semanas o dos meses después de la primera administración del inhibidor del complemento.

20 El sujeto puede haber recibido diálisis al menos una vez en los tres meses inmediatamente anteriores al tratamiento con el inhibidor del complemento, o experimentar la primera manifestación de SUHa aguda.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un método para supervisar la sensibilidad de un sujeto al tratamiento con un inhibidor del complemento, que es un anticuerpo anti C5 o un fragmento de unión a C5 del mismo, comprendiendo el método: determinar la concentración de al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en un líquido biológico obtenido del sujeto, en el que:

30 (a) las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa son TNFR1 y al menos otra proteína biomarcadora asociada con SUHa seleccionada de: CXCL10, MCP-1, IFN- γ , IL-6, un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B, C5b9 soluble (sC5b9), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, trombomodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), componente del complemento C5a, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), albúmina, CXCL9 y KIM-1;

(b) el sujeto tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar SUHa;

(c) el sujeto se ha tratado o se está tratando con el inhibidor del complemento; y

35 (d) una concentración reducida de las al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor del complemento indica que el sujeto es sensible al tratamiento con el inhibidor.

40 En los métodos anteriores, el sujeto puede ser un sujeto que se trata de forma crónica con un inhibidor del complemento.

45 En los métodos anteriores, el inhibidor del complemento puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que:

(i) se selecciona de un anticuerpo humanizado, un anticuerpo recombinante, un diacuerpo, un anticuerpo quimerizado o quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo desimmunizado, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fv, un fragmento Fd, un fragmento Fab, un fragmento Fab' y un fragmento F(ab')₂;

(ii) inhibe la escisión de C5 en los fragmentos C5a y C5b; o

50 (iii) es el anticuerpo eculizumab o el fragmento de unión a antígeno pexelizumab.

55 En un aspecto adicional más, la invención proporciona un método para diagnosticar que un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa), comprendiendo el método: determinar la concentración de al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en un líquido biológico obtenido de un sujeto, en el que las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa son TNFR1 y al menos otra proteína biomarcadora asociada con SUHa seleccionada de: un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B, C5b9 soluble (sC5b9), trombomodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), ligando de CD40 soluble (sCD40L), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, CXCL10, MCP-1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1 beta, IL-12 p70, componente del complemento C5a, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), IL-6, albúmina, IL-8 y CCL5 en el que una concentración elevada de las al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en comparación con la concentración de las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en una muestra de control de líquido biológico del mismo tipo indica que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, SUHa.

65 En los métodos anteriores, la al menos otra proteína biomarcadora asociada con SUHa adicional puede seleccionarse de: un fragmento proteolítico de factor B, C5a, C5b-9 soluble (sC5b-9), VCAM-1, trombomodulina,

fragmentos de protrombina 1 y 2 (F1+2), D-dímero, clusterina, TIMP-1, FABP-1, microglobulina beta-2 (b2m) y cistatina C, en los que la VCAM-1 es VCAM-1 soluble (sVCAM-1).

5 En los métodos anteriores, las al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa pueden medirse usando un inmunoensayo, tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA).

En los métodos anteriores, el líquido biológico puede ser sangre, una fracción sanguínea, tal como suero o plasma, u orina. La fracción sanguínea es preferentemente suero.

10 En los métodos anteriores, la concentración de al menos un biomarcador asociado con SUHa puede medirse en uno o más tipos de líquido biológico; o la concentración de una primera de las al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa puede medirse en un tipo de líquido biológico y la concentración de una segunda de las al menos dos proteínas biomarcadoras de SUHa puede medirse en un segundo tipo de líquido.

15 En los métodos anteriores, se prefiere que:

(i) se determine la concentración de CXCL9, CXCL10, IFN- γ , MCP-1, CCL5, sCD40L o TNFR1 en el suero del sujeto, en el que el TNFR1 es TNFR1 soluble (sTNFR1);

20 (ii) se determine la concentración de al menos uno de microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL10, CXCL9, albúmina y KIM-1 en la orina del sujeto;

(iii) se determine la concentración de NGAL, un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B, C5b9 soluble (sC5b9), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, trombomodulina o factor de von Willebrand (vWF) en el plasma del sujeto; y/o

25 (iv) se determine la concentración de Ba en plasma obtenido del sujeto.

En los métodos anteriores, la concentración de control normal de sTNFR1 es menos de 2000 pg/ml. La concentración de sTNFR1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es: (i) al menos dos veces mayor que la concentración de control de sTNFR1; o (ii) al menos 10.000 pg/ml.

30 En un aspecto adicional más, la invención proporciona el uso de un kit de diagnóstico en el diagnóstico de SUHa, en el que el kit de diagnóstico comprende: (a) una placa de ensayo y (b) al menos tres agentes de unión, en los que cada agente de unión se une con una proteína de analito biológico diferente, en el que las proteínas de analito se seleccionan de: un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B, C5b9 soluble (sC5b9), trombomodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), ligando de CD40 soluble (sCD40L), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1 beta, IL-12 p70, componente del complemento C5a, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), IL-6, albúmina, IL-8 y CCL5, y una de las proteínas es TNFR-1.

40 Se prefiere que el agente de unión sea un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

La divulgación presenta un método para supervisar o evaluar el estado de proteínas biomarcadoras asociadas con síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa) en un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano) o un método para evaluar uno o ambos de la concentración y el nivel de actividad de al menos una proteína biomarcadora asociada con síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa) en un sujeto. El método comprende medir en un líquido biológico obtenido del sujeto uno o ambos de (i) la concentración de al menos una (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20) proteína biomarcadora asociada con SUHa en el líquido biológico, en el que las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa son cualquiera de los biomarcadores expuestos en la Tabla 1, por ejemplo, uno seleccionado del grupo que consiste en: un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), trombomodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), ligando de CD40 soluble (sCD40L), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1 beta, IL-12 p70, componente del complemento C5a, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), IL-6, albúmina, IL-8 y CCL5. El sujeto puede ser, por ejemplo, un ser humano que tenga, se sospeche que tiene o esté en riesgo de desarrollar, SUHa. El sujeto puede ser uno que se ha tratado (o se está tratando) con un inhibidor del complemento (por ejemplo, un inhibidor del componente del complemento C5 tal como un anticuerpo anti C5). El tratamiento puede haberse realizado menos de un mes (por ejemplo, menos de 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 días) antes de obtener la muestra del sujeto. El método puede incluir además la etapa de determinar si el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar SUHa. Cuando el sujeto se ha tratado o se está tratando con un inhibidor del complemento (por ejemplo, un anticuerpo anti C5) en un programa de dosificación predeterminado, el método puede incluir además determinar si el paciente es sensible (terapéuticamente) a la terapia inhibidora del complemento.

65 La divulgación presenta un método para supervisar o evaluar el estado de proteínas biomarcadoras asociadas con

síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa) en un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano) o un método para evaluar uno o ambos de la concentración y el nivel de actividad de al menos una proteína biomarcadora asociada con síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa) en un sujeto. El método comprende: (A) medir en un líquido biológico obtenido del sujeto la concentración de al menos una (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20) proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en el líquido biológico, en el que las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa son cualquiera de los biomarcadores expuestos en la Tabla 1, por ejemplo, uno seleccionado del grupo que consiste en: un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), trombomodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), ligando de CD40 soluble (sCD40L), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1 beta, IL-12 p70, componente del complemento C5a, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), IL-6, albúmina, IL-8 y CCL5; y (B) registrar (por ejemplo, en un registro de pacientes electrónico) los resultados de la medición o las mediciones o comunicar los resultados de la medición o las mediciones al sujeto, el tutor del sujeto o un profesional médico a cuyo cargo se ha puesto al sujeto. El sujeto puede ser, por ejemplo, un ser humano que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar, SUHa. El sujeto puede ser uno que se ha tratado (o se está tratando) con un inhibidor del complemento (por ejemplo, un inhibidor del componente del complemento C5 tal como un anticuerpo anti C5). El tratamiento puede haberse producido menos de un mes (por ejemplo, menos de 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 días) antes de obtener la muestra del sujeto. El método puede incluir además la etapa de determinar si el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar SUHa. Cuando el sujeto se ha tratado o se está tratando con un inhibidor del complemento (por ejemplo, un anticuerpo anti C5) en un programa de dosificación predeterminado, el método puede incluir además determinar si el paciente es sensible (terapéuticamente) a la terapia inhibidora del complemento.

La divulgación presenta un método para supervisar o determinar si un paciente está en riesgo de desarrollar microangiopatía trombótica. El método incluye (A) medir en un líquido biológico obtenido del sujeto la concentración de al menos una (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro) proteína biomarcadora asociada con trombosis o coagulación en el líquido biológico, en el que las proteínas biomarcadoras son cualquiera de los biomarcadores expuestos en la Tabla 1 o la Tabla 11, por ejemplo, F1+2 o D-dímero; y (B) registrar (por ejemplo, en un registro de pacientes electrónico) los resultados de la medición o las mediciones o comunicar los resultados de la medición o las mediciones al sujeto, el tutor del sujeto o un profesional médico a cuyo cargo se ha puesto al sujeto. El sujeto puede ser, por ejemplo, un ser humano que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar SUHa. El sujeto puede ser uno que se ha tratado (o se está tratando) con un inhibidor del complemento (por ejemplo, un inhibidor del componente del complemento C5 tal como un anticuerpo anti C5). El tratamiento puede haberse producido menos de un mes (por ejemplo, menos de 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 días) antes de obtener la muestra del sujeto. El método puede incluir además la etapa de determinar si el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar SUHa (o confirmar un diagnóstico de SUHa) usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Cuando el sujeto se ha tratado o se está tratando con un inhibidor del complemento (por ejemplo, un anticuerpo anti C5) en un programa de dosificación predeterminado, el método puede incluir además determinar si el paciente es sensible (terapéuticamente) a la terapia inhibidora del complemento, es decir, se produce una reducción en la concentración de uno o más de los biomarcadores asociados a trombosis o coagulación después del tratamiento con el inhibidor del complemento.

La divulgación presenta un método para supervisar o evaluar el estado de proteínas biomarcadoras asociadas con síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa) en un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano) o un método para evaluar uno o ambos de la concentración y el nivel de actividad de al menos una proteína biomarcadora asociada con síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa) en un sujeto. El método comprende: (A) medir en un líquido biológico obtenido del sujeto la concentración de al menos una (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12 o 13) proteína biomarcadora asociada con SUHa en el líquido biológico, en el que las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa son cualquiera de los biomarcadores expuestos en la Tabla 1, por ejemplo, uno seleccionado del grupo que consiste en: un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), C5a, trombomodulina, VCAM-1, fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, sTNFR1, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, TIMP-1, y proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1); y (B) registrar (por ejemplo, en un registro de pacientes electrónico) los resultados de la medición o las mediciones o comunicar los resultados de la medición o las mediciones al sujeto, el tutor del sujeto o un profesional médico a cuyo cargo se ha puesto al sujeto. El sujeto puede ser, por ejemplo, un ser humano que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar, SUHa. El sujeto puede ser uno que se ha tratado (o se está tratando) con un inhibidor del complemento (por ejemplo, un inhibidor del componente del complemento C5 tal como un anticuerpo anti C5). El tratamiento puede haberse realizado menos de un mes (por ejemplo, menos de 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 días) antes de obtener la muestra del sujeto. El método puede incluir además la etapa de determinar si el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar SUHa. Cuando el sujeto se ha tratado o se está tratando con un inhibidor del complemento (por ejemplo, un anticuerpo anti C5) en un programa de dosificación predeterminado, el método puede incluir además determinar si el paciente es sensible (terapéuticamente) a la terapia inhibidora del complemento.

Cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede comprender además determinar si el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar SUHa. En algunas realizaciones, una concentración elevada, en comparación con la concentración en un líquido biológico de control normal del mismo tipo, de al menos uno de Ba, sC5b-9, C5a, sCD40L, fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, trombomodulina, VCAM-1, vWF, FABP-1, p2M, clusterina, cistatina C, TIMP-1, albúmina, NGAL, CXCL10, CXCL9, IL-18, TNFR1, VCAM-1, MCP-1, VEGF, CCL5, IL-6, IFN γ , indica que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, SUHa.

Cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluye determinar si el sujeto ha respondido al tratamiento con el inhibidor del complemento. En algunas realizaciones, (a) una concentración reducida, en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor, de al menos uno de CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), fragmento de protrombina F1+2, d-dímero, trombomodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), componente del complemento C5a, sC5b9, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), albúmina, CXCL10, CXCL9 y KIM-1; o (b) una concentración aumentada, en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor, de CCL5, indica que el sujeto es sensible al tratamiento con el inhibidor.

La divulgación presenta un método para supervisar la sensibilidad de un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano) al tratamiento con un inhibidor del componente del complemento C5. El método incluye: medir la concentración de al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en un líquido biológico, en el que las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa son cualquiera de las expuestas en la Tabla 1, por ejemplo, una seleccionada del grupo que consiste en: un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), trombomodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), ligando de CD40 soluble (sCD40L), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1 beta, IL-12 p70, componente del complemento C5a, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), IL-6, albúmina, IL-8 y CCL5. El líquido biológico se obtiene de un sujeto: (i) que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar SUHa y (ii) que se está tratando (o que se ha tratado, por ejemplo, recientemente) con un inhibidor del componente del complemento C5 en un programa de dosificación predeterminado. De acuerdo con dichos métodos, (a) una concentración reducida, en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor, de al menos uno de CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), fragmento de protrombina F1+2, d-dímero, trombomodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), componente del complemento C5a, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), albúmina, CXCL10, CXCL9 y KIM-1; o (b) una concentración aumentada, en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor, de CCL5, indica que el sujeto es sensible a tratamiento con el inhibidor.

Cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluye determinar si el sujeto ha respondido al tratamiento con el inhibidor del complemento. En algunas realizaciones, una concentración reducida, en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor, de al menos uno de un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), C5a, trombomodulina, VCAM-1, fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, sTNFR1, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, TIMP-1 y proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1).

La divulgación presenta un método para supervisar la sensibilidad de un sujeto al tratamiento con un inhibidor del complemento, en el que el método comprende: determinar la concentración de al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en un líquido biológico obtenido del sujeto, en el que las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa se seleccionan del grupo que consiste en: CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , IL-6, un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), fragmento de protrombina F1+2, d-dímero, trombomodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), componente del complemento C5a, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), albúmina, CXCL9, KIM-1 y CCL5. El sujeto tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar SUHa y el sujeto se ha tratado o se está tratando con un inhibidor del complemento. (A) una concentración reducida, en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor, de al menos uno de CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , IL-6, un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), fragmento de protrombina F1+2, d-dímero, trombomodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), componente del complemento C5a, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), albúmina, CXCL9 y KIM-1; o (B) una concentración aumentada, en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor, de CCL5, indica que el sujeto es sensible a tratamiento con el inhibidor.

La divulgación presenta un método para reducir el número, la frecuencia o la aparición, probabilidad de aparición o riesgo de desarrollo de TMA, usando un inhibidor del complemento de una manera suficiente para inducir un cambio fisiológico en al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con trombosis o coagulación. El método incluye: (a) determinar la concentración de al menos dos proteínas biomarcadoras en un líquido biológico obtenido del sujeto, en el que las proteínas biomarcadoras se seleccionan de la Tabla 1 u 11 y están relacionadas con la trombosis y/o la coagulación (por ejemplo, D-dímero o F1+2); y (b) administrar a un sujeto que tenga, se sospeche que tiene o esté en riesgo de desarrollar TMA un inhibidor del complemento en una cantidad y con una frecuencia suficientes para provocar un cambio fisiológico en al menos cada una de dos (2) de las proteínas biomarcadoras, en el que el cambio fisiológico es una reducción de la concentración de las menos dos proteínas biomarcadoras en relación con la concentración de los marcadores en una muestra biológica equivalente obtenida del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor del complemento. El método puede incluir medir la concentración de los biomarcadores tanto antes como después del tratamiento.

La divulgación presenta un método para determinar si un paciente con SUHa tratado con un inhibidor del complemento en un programa de dosificación predeterminado necesita: (i) tratamiento con un inhibidor del complemento diferente o (ii) tratamiento con el mismo inhibidor del complemento en un programa de dosificación diferente. El método comprende: (A) determinar si el paciente con SUHa es sensible a tratamiento con el inhibidor del complemento en el programa de dosificación predeterminado, en el que la determinación comprende: medir en un líquido biológico obtenido del sujeto una o ambas de la concentración y la actividad de al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en el líquido biológico, en el que las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa se seleccionan del grupo que consiste en: un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), trombomodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), ligando de CD40 soluble (sCD40L), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1 beta, IL-12 p70, componente del complemento C5a, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), IL-6, albúmina, IL-8 y CCL5, y en el que: (a) una concentración reducida, en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor, de al menos uno de CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), fragmento de protrombina F1+2, d-dímero, trombomodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), componente del complemento C5a, sC5b9, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), albúmina, CXCL10, CXCL9 y KIM-1; o (b) una concentración aumentada, en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor, de CCL5, indica que el sujeto es sensible a tratamiento con el inhibidor; y (B) si el paciente no es sensible a tratamiento con el inhibidor del complemento, administrar al paciente un inhibidor del complemento diferente o el mismo inhibidor del complemento a una dosis mayor o en un programa de dosificación más frecuente en comparación con el programa de dosificación predeterminado.

La divulgación presenta un método para determinar si un paciente con SUHa tratado con un inhibidor del complemento en un programa de dosificación predeterminado necesita: (i) tratamiento con un inhibidor del complemento diferente o (ii) tratamiento con el mismo inhibidor del complemento en un programa de dosificación diferente. El método comprende: (A) determinar si el paciente con SUHa es sensible al tratamiento con el inhibidor del complemento en el programa de dosificación predeterminado, en el que la determinación comprende: medir en un líquido biológico obtenido del sujeto una o ambas de la concentración y la actividad de al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en el líquido biológico, en el que las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa se seleccionan del grupo que consiste en: un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), C5a trombomodulina, VCAM-1, fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, sTNFR1, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, TIMP-1 y proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1) y en el que: (a) una concentración reducida, en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor, de al menos uno de un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), C5a, trombomodulina, VCAM-1, fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, sTNFR1, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, TIMP-1 y proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), indica que el sujeto es sensible a tratamiento con el inhibidor; y (B) si el paciente no es sensible al tratamiento con el inhibidor del complemento, administrar al paciente un inhibidor del complemento diferente o el mismo inhibidor del complemento a una dosis mayor o en un programa de dosificación más frecuente en comparación con el programa de dosificación predeterminado.

La concentración de una o más de las proteínas puede medirse usando, por ejemplo, un inmunoensayo (por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), transferencia de Western o transferencia puntual) o matriz de perlas citométricas (CBA, véanse los ejemplos de trabajo). Dichos métodos así como kits útiles para realizar los métodos se describen en el presente documento. Se conocen en la técnica y se describen en el presente documento métodos adecuados para medir la actividad de vWF.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de al menos cinco proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa individuales. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de al

- menos diez proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa individuales. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de al menos 15 proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa individuales. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de al menos 20 proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa individuales.
- 5
- En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el líquido biológico es sangre. En algunas realizaciones, el líquido biológico es una fracción de sangre, por ejemplo, suero o plasma. En algunas realizaciones, el líquido biológico es orina. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se realizan todas las mediciones en un líquido biológico. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se realizan mediciones en al menos dos líquidos biológicos diferentes obtenidos del sujeto. En algunas realizaciones, se miden las concentraciones de al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa individuales y se mide la concentración de la primera proteína biomarcadora asociada con SUHa en un tipo de líquido biológico y se mide la segunda proteína biomarcadora asociada con SUHa en un segundo tipo de líquido biológico.
- 10
- 15
- En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de al menos dos (por ejemplo, al menos tres, cuatro o todas) de IFN- γ , ICAM-1, IL-1 beta e IL-12 p70. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones tanto de Ba como de sC5b9. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de uno o ambos de C5a y C5b9. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de al menos dos (por ejemplo, al menos tres, cuatro, cinco, seis o todos) de β 2M, clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL y FABP-1. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de CXCL10, CXCL9 y/o KIM-1. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de uno o ambos de D-dímero y F1+2. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de al menos dos (por ejemplo, al menos tres, cuatro o todos) de sCD40L, fragmento de protrombina F1+2 y D-dímero. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de trombosmodulina, VCAM-1 y/o vWF. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de CXCL10, MCP-1 y/o TNFR1. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de al menos dos (por ejemplo, al menos tres, cuatro o todas) de IFN- γ , ICAM-1, IL-1 beta e IL-12 p70.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de uno o más de CXCL9, CXCL10, IL-1 beta, IL-12 p70, IFN- γ , MCP-1, CCL5, sCD40L y/o sTNFR1 en el suero del sujeto. En algunas realizaciones, se miden las concentraciones de uno o más del componente del complemento C5a, sC5b9, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL10, CXCL9 y/o KIM-1 en la orina del sujeto. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de uno o más de NGAL, un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, trombosmodulina y/o factor de von Willebrand (vWF) en el plasma del sujeto.
- En algunas realizaciones, se miden las concentraciones de dos o más (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12 o 13) de un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), C5a, trombosmodulina, VCAM-1, fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, sTNFR1, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, TIMP-1 y proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1).
- En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de al menos dos del grupo que consiste en Ba, sC5b-9 y C5a. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de uno o ambos de Ba y sC5b9. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de uno o ambos de C5a y C5b9. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de al menos dos miembros individuales del grupo que consiste en β 2M, clusterina, cistatina C, albúmina, TIMP-1, NGAL y FABP-1. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de al menos dos miembros individuales del grupo que consiste en CXCL10, CXCL9, IL-18, MCP-1, TNFR1, VEGF, IL-6 e IFN γ . En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de uno o ambos de d-dímero y F1+2.
- En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de al menos dos miembros individuales del grupo que consiste en sCD40L, fragmento de protrombina F1+2 y d-dímero. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de trombosmodulina, VCAM-1 o vWF. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de TNFR1. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de al menos dos miembros individuales del grupo que consiste en IFN- γ , CXCL10, CXCL9, IL-18, TNFR1, VCAM-1, MCP-1, VEGF,

CCL5 e IL-6. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de al menos una proteína biomarcadora asociada con SUHa seleccionada del grupo que consiste en IFN- γ , CXCL10, CXCL9, IL-18, TNFR1, VCAM-1, MCP-1, VEGF e IL-6. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de al menos un biomarcador asociado con SUHa seleccionado del grupo que consiste en microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL10, CXCL9, albúmina y KIM-1. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de al menos una proteína biomarcadora asociada con SUHa seleccionada del grupo que consiste en: CXCL10, CXCL9, IL-18, MCP-1, TNFR1, VEGF, IL-6, CCL5, IFN γ , IL-8, ICAM-1, IL-1 beta e IL-12 p70. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de CXCL9, CXCL10, IL-1 beta, IL-12 p70, IFN- γ , MCP-1, CCL5, sCD40L o sTNFR1 en el suero del sujeto. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de al menos un biomarcador asociado con SUHa seleccionado del grupo que consiste en microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL10, CXCL9, albúmina y KIM-1 en la orina del sujeto. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de NGAL, un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, trombomodulina o factor de von Willebrand (vWF) en el plasma del sujeto. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de Ba (por ejemplo, en la muestra de plasma obtenida del sujeto).

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el método requiere registrar el valor o los valores medidos de la concentración de al menos una proteína biomarcadora de SUHa. El registro puede estar escrito o en un medio leíble por ordenador. El método también puede incluir comunicar el valor o los valores medidos de la concentración de la al menos una proteína biomarcadora de SUHa al sujeto y/o a un practicante médico a cuyo cargo se pone al sujeto.

En algunas realizaciones, cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede incluir la etapa de administrar al sujeto el inhibidor del complemento a una dosis mayor o con una frecuencia de dosificación aumentada, en relación con el programa de dosificación predeterminado, si el sujeto no es sensible a tratamiento con el inhibidor en el programa de dosificación predeterminado.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el inhibidor del complemento se administra al sujeto en un programa de dosificación predeterminado basado, en parte, en el peso corporal del sujeto. Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo antagonista anti C5 (por ejemplo, eculizumab), para sujetos que tienen un peso corporal mayor de o igual a 40 kg, el anticuerpo puede administrarse al sujeto durante al menos 7 semanas en el siguiente programa: al menos 800 mg del anticuerpo, una vez por semana durante cuatro semanas consecutivas; al menos 800 mg del anticuerpo una vez durante la quinta semana; y al menos 800 mg del anticuerpo bisemanalmente a continuación. En algunas realizaciones, el anticuerpo se administra al sujeto durante al menos 7 semanas en el siguiente programa: al menos 900 mg del anticuerpo, una vez por semana durante cuatro semanas consecutivas; al menos 1200 mg del anticuerpo una vez durante la quinta semana; y al menos 1200 mg del anticuerpo bisemanalmente en lo sucesivo.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, para sujetos que tienen un peso corporal menor de 40 kg pero mayor de o igual a 30 kg, el anticuerpo puede administrarse al sujeto durante al menos 7 semanas en el siguiente programa: al menos 500 mg del anticuerpo, una vez por semana durante dos semanas consecutivas; al menos 700 mg del anticuerpo una vez durante la tercera semana; y al menos 700 mg del anticuerpo bisemanalmente a continuación. En algunas realizaciones, el anticuerpo se administra al sujeto durante al menos 5 semanas en el siguiente programa: al menos 600 mg del anticuerpo, una vez por semana durante dos semanas consecutivas; al menos 900 mg del anticuerpo una vez durante la tercera semana; y al menos 900 mg del anticuerpo bisemanalmente a continuación.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el peso corporal del sujeto es menor de 30 kg, pero es mayor de o igual a 20 kg y el anticuerpo se administra al sujeto durante al menos 5 semanas en el siguiente programa: al menos 500 mg del anticuerpo, una vez por semana durante dos semanas consecutivas; al menos 500 mg del anticuerpo una vez durante la tercera semana; y al menos 500 mg del anticuerpo bisemanalmente a continuación. En algunas realizaciones, el anticuerpo se administra al sujeto durante al menos 5 semanas en el siguiente programa: al menos 600 mg del anticuerpo, una vez por semana durante dos semanas consecutivas; al menos 600 mg del anticuerpo una vez durante la tercera semana; y al menos 600 mg del anticuerpo bisemanalmente a continuación.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el peso corporal del sujeto es menor de 20 kg, pero es mayor de o igual a 10 kg y el anticuerpo se administra al sujeto durante al menos 4 semanas en el siguiente programa: al menos 500 mg del anticuerpo una vez por semana durante una semana; al menos 200 mg del anticuerpo una vez durante la segunda semana; y al menos 200 mg del anticuerpo bisemanalmente a continuación. En algunas realizaciones, el anticuerpo se administra al sujeto durante al menos 4 semanas en el siguiente programa: al menos 600 mg del anticuerpo una vez por semana durante una semana; al

menos 300 mg del anticuerpo una vez durante la segunda semana; y al menos 300 mg del anticuerpo bisemanalmente a continuación.

5 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el peso corporal del sujeto es menor de 10 kg, pero es mayor de o igual a 5 kg y el anticuerpo se administra al sujeto durante al menos 5 semanas en el siguiente programa: al menos 200 mg del anticuerpo una vez por semana durante una semana; al menos 200 mg del anticuerpo una vez durante la segunda semana; y al menos 200 mg del anticuerpo una vez cada tres semanas a continuación. En algunas realizaciones, el anticuerpo se administra al sujeto durante al menos 5 semanas en el siguiente programa: al menos 300 mg del anticuerpo, una vez por semana durante una semana; al menos 300 mg del anticuerpo una vez durante la segunda semana; y al menos 300 mg del anticuerpo cada tres semanas a continuación. Se describen programas de dosificación de anticuerpos anti C5 ejemplares adicionales (por ejemplo, programas de dosificación crónicos) para SUHa en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2010/054403 (por ejemplo, Tablas 1 y 2 del documento WO 2010/054403).

15 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el inhibidor es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, una molécula pequeña, un polipéptido, un análogo polipeptídico, un peptidomimético o un aptámero. En algunas realizaciones, el inhibidor puede ser uno que inhiba uno o más de los componentes del complemento C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, Factor D, Factor B, properdina, MBL, MASP-1, MASP-2, o fragmentos biológicamente activos de cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el inhibidor del complemento inhibe uno o ambos de la generación de la actividad anafilotóxica asociada con C5a y/o el ensamblaje del complejo de ataque a la membrana asociado con C5b.

25 Las composiciones también pueden contener formas de origen natural o solubles de compuestos inhibidores del complemento tales como CR1, LEX-CR1, MCP, DAF, CD59, Factor H, factor de veneno de cobra, FUT-175, complestatina y K76 COOH.

30 En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento puede ser una molécula de factor H (FH) del receptor de complemento 2 (CR2) que comprende: a) una parte CR2 que comprende CR2 (por ejemplo, CR2 humano) o un fragmento del mismo, y b) una parte FH que comprende un FH o un fragmento del mismo, en el que la molécula CR2-FH o fragmento de la misma es capaz de unirse con un ligando de CR2, y en el que la molécula de CR2-FH es capaz de inhibir la activación del complemento de la ruta alternativa. Se describen proteínas de fusión de CR2-FH ejemplares y se ejemplifican, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente internacional n.º WO 2007/149567 y WO 2011/143637. En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento comprende un dominio de dirección tal como CR2 o un anticuerpo anti C3d como se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2011/163412. Pueden usarse fusiones de dominios de dirección con otros inhibidores del complemento tales como CD59, CD55 y moléculas de tipo factor H en los métodos descritos en el presente documento como un inhibidor del complemento. Véase documento WO 2011/163412, anterior.

40 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el inhibidor del complemento es un anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo humanizado, un anticuerpo recombinante, un diacuerpo, un anticuerpo quimerizado o quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo desinmunizado, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fv, un fragmento Fd, un fragmento Fab, un fragmento Fab' y un fragmento F(ab')₂.

50 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el anticuerpo antagonista es un anticuerpo anti C5 tal como eculizumab. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista es pexelizumab, un fragmento de unión a C5 del anticuerpo anti C5.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el inhibidor del complemento se selecciona del grupo que consiste en MB 12/22, MB12/22-RGD, ARC187, ARC1905, SSL7 y OmCI.

55 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el subconjunto de proteínas biomarcadoras asociadas con SUH a partir de las que un practicante puede determinar la concentración de una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10 o más) puede ser: Ba, trombomodulina, VCAM-1, TNFR1, F1+2, D-dímero, CXCL10, IL-6, clusterina, TIMP-1, FABP-1, β2M y cistatina C.

60 La divulgación presenta una matriz que comprende una pluralidad de agentes de unión, en la que cada agente de unión de la pluralidad tiene una dirección única en la matriz, en la que la matriz no comprende más de 500 direcciones únicas, en la que cada agente de unión de la pluralidad se une con una proteína de analito biológico diferente y en la que la matriz comprende agentes de unión que se unen con cuatro o más proteínas de análisis expuestas en la Tabla 1, por ejemplo, seleccionadas del grupo que consiste en: un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), trombomodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), ligando de CD40 soluble (sCD40L), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN-γ, ICAM-1, IL-1 beta, IL-12 p70, componente del complemento C5a, microglobulina β2 (β2M),

65

clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, factor del crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), IL-6, albúmina, IL-8 y CCL5. La matriz es útil en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. La matriz puede ser una microplaca proteica. En algunas realizaciones, cada dirección de la matriz es un pocillo de una placa de ensayo. Cada dirección de la matriz puede ser una partícula (por ejemplo, una perla) que tenga inmovilizada en la misma un agente de unión.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente de unión" incluye cualquier agente de origen natural, sintético o modificado por ingeniería genética, tal como una proteína, que se une con un antígeno (por ejemplo, una proteína biomarcadora de SUHa). Los agentes de unión pueden ser o derivar de anticuerpos de origen natural. Una proteína o un agente de unión puede actuar de forma similar a un anticuerpo mediante unión con un antígeno específico para formar un complejo. Los agentes o las proteínas de unión pueden incluir fragmentos de unión a antígeno aislados de anticuerpos.

La matriz puede comprender anticuerpos que se unen con al menos dos (por ejemplo, al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25) de las proteínas de analitos. Por ejemplo, la matriz puede comprender agentes de unión/anticuerpos que se unen con al menos dos (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12 o 13) de un fragmento proteolítico del factor del componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), C5a, trombomodulina, VCAM-1, fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, sTNFR1, microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$), clusterina, cistatina C, TIMP-1 y proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1).

En algunas realizaciones de la matriz desvelada en el presente documento, la matriz no comprende más de 200 (por ejemplo no más de 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25 o 20) direcciones únicas.

La divulgación presenta un kit de diagnóstico que comprende una o más de cualquiera de las matrices descritas en el presente documento y, opcionalmente, instrucciones para (a) obtener y/o procesar una muestra biológica (por ejemplo, un líquido biológico) de un sujeto y/o (b) medir uno o más analitos en una muestra biológica (por ejemplo, un líquido biológico) de un sujeto.

La divulgación presenta un kit de diagnóstico que comprende: (a) una placa de ensayo y (b) al menos tres agentes de unión, siendo cada agente de unión capaz de unirse con un analito biológico diferente, en el que los analitos son los representados en la Tabla 1, por ejemplo, seleccionados del grupo que consiste en: un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), trombomodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), ligando de CD40 soluble (sCD40L), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1 beta, IL-12 p70, componente del complemento C5a, microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), IL-6, albúmina, IL-8 y CCL5. El kit de diagnóstico puede comprender uno o más medios para medir la actividad de vWF en plasma humano.

La divulgación presenta un método para diagnosticar que un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa). El método incluye: medir en un líquido biológico la concentración de al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa seleccionadas del grupo que consiste en: un fragmento proteolítico de factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), trombomodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), ligando de CD40 soluble (sCD40L), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1 beta, IL-12 p70, componente del complemento C5a, microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), IL-6, albúmina, IL-8 y CCL5. El líquido biológico es uno obtenido de un sujeto que se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar SUHa. De acuerdo con los métodos, una concentración elevada, en comparación con la concentración en un líquido biológico de control normal del mismo tipo, de al menos uno de Ba, sC5b-9, C5a, sCD40L, fragmento de protrombina F1+2, d-dímero, trombomodulina, VCAM-1, vWF, FABP-1, $\beta 2M$, clusterina, cistatina C, TIMP-1, albúmina, NGAL, CXCL10, CXCL9, IL-18, TNFR1, VCAM-1, MCP-1, VEGF, CCL5, IL-6 o IFN γ , indica que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, SUHa. Los al menos dos biomarcadores asociados con SUHa pueden seleccionarse de la Tabla 11, es decir, al menos dos (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12 o 13) de un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), C5a, trombomodulina, VCAM-1, fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, sTNFR1, microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$), clusterina, cistatina C, TIMP-1 y proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1).

Como se usa en el presente documento, el término "normal", cuando se usa para modificar el término "individuo" o "sujeto" se refiere a un individuo o grupo de individuos que no tiene una enfermedad o afección particular (por ejemplo, SUHa) y tampoco se sospecha que tenga o esté en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección. El término "normal" también se usa en el presente documento para cualificar una muestra o muestra de ensayo biológica (por ejemplo, un líquido biológico) aislado de un individuo o sujeto normal o sano (o grupo de dichos sujetos), por ejemplo, una "muestra de control normal" o un "líquido biológico de control normal".

La divulgación presenta un método para determinar si un paciente experimenta una primera manifestación de

síndrome urémico hemolítico atípico agudo (SUHa). El método comprende: medir uno o ambos de la concentración de D-dímero (por ejemplo, la concentración en plasma de D-dímero) y la concentración de proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1) (por ejemplo, la concentración en orina de FABP-1), en el que un aumento de la concentración de d-dímero, en relación con la concentración de d-dímero en una muestra de control normal, y un aumento de la concentración de FABP-1, en relación con la concentración de FABP-1 en una muestra de control normal, indica que el paciente con SUHa experimenta una primera manifestación de SUHa aguda. El aumento de uno o ambos de D-dímero y FABP-1 pueden ser aumentos significativos.

La divulgación presenta un método para tratar el síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa), comprendiendo el método administrar a un sujeto que tenga, se sospeche que tiene o esté en riesgo de desarrollar SUHa un inhibidor del complemento (por ejemplo, un inhibidor del componente del complemento C5) en una cantidad y con una frecuencia suficiente para efectuar un cambio fisiológico en al menos una (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25) proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa, en el que el cambio fisiológico se selecciona del grupo que consiste en: (a) una concentración reducida, en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor, de al menos uno de CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , un fragmento proteolítico o factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), fragmento de protrombina F1+2, d-dímero, trombosmodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), componente del complemento C5a, sC5b9, microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), albúmina, CXCL10, CXCL9 y KIM-1; o (b) una concentración aumentada, en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido de un sujeto antes del tratamiento con el inhibidor de CCL5. El al menos un biomarcador asociado con SUHa puede seleccionarse de la Tabla 11, es decir, al menos uno (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12 o 13) de un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), C5a, trombosmodulina, VCAM-1, fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, sTNFR1, microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$), clusterina, cistatina C, TIMP-1 y proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1).

La divulgación presenta un método para tratar el síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa) usando un inhibidor del complemento de una manera suficiente para inducir un cambio fisiológico en al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa. El método incluye: (a) determinar la concentración de al menos dos biomarcadores asociados con SUHa en un líquido biológico obtenido del sujeto, en el que las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa se seleccionan del grupo que consiste en: CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , IL-6, un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), fragmento de protrombina F1+2, d-dímero, trombosmodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), componente del complemento C5a, microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), albúmina, CXCL9, KIM-1 y CCL5; y (b) administrar a un sujeto que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar SUHa, un inhibidor del complemento en una cantidad y con una frecuencia suficiente para provocar un cambio fisiológico en al menos cada uno de dos (2) proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa, en el que el cambio fisiológico se selecciona del grupo que consiste en: (a) una concentración reducida, en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor, de al menos uno de CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , IL-6, un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, trombosmodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), componente del complemento C5a, microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), albúmina, CXCL9 o KIM-1; y (b) una concentración aumentada en un líquido biológico obtenido del sujeto, en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor, de CCL5. El método también puede incluir determinar si se han producido los cambios fisiológicos. Los al menos dos biomarcadores asociados con SUHa pueden seleccionarse de la Tabla 11, es decir, al menos dos (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12 o 13) de un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), C5a, trombosmodulina, VCAM-1, fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, sTNFR1, microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$), clusterina, cistatina C, TIMP-1 y proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1).

Los métodos pueden incluir además la etapa de medir las concentraciones de al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa individuales en un líquido biológico, en el que las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa se seleccionan del grupo que consiste en: un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), trombosmodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), ligando de CD40 soluble (sCD40L), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1 beta, IL-12 p70, componente del complemento C5a, microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), IL-6, albúmina, IL-8 y CCL5. El líquido biológico se obtiene del sujeto. Los al menos dos biomarcadores asociados con SUHa pueden seleccionarse de la Tabla 11, es decir, al menos dos (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12 o 13) de un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), C5a, trombosmodulina, VCAM-1, fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, sTNFR1, microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$), clusterina, cistatina C, TIMP-1 y proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1).

5 Cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede incluir determinar si se han producido los al menos dos (por ejemplo, al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25) cambios fisiológicos. En algunas realizaciones, se reducen las concentraciones de al menos dos de IFN- γ , ICAM-1, IL-1 beta e IL-12 p70. En algunas realizaciones, se reducen las concentraciones tanto de Ba como de sC5b9. En algunas realizaciones, se reduce la concentración (por ejemplo, la concentración en orina) de cada uno de C5a y sC5b9. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se reducen las concentraciones (por ejemplo, la concentración en orina) de al menos dos (por ejemplo, al menos tres, cuatro, cinco, seis o todos) de β 2M, clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL y FABP-1. En algunas realizaciones, se reducen las concentraciones (por ejemplo, la concentración en orina) de CXCL10, CXCL9 y/o KIM-1. En algunas realizaciones, se reducen las concentraciones (por ejemplo, concentración en plasma) de uno o ambos de D-dímero y F1+2. En algunas realizaciones, se reducen las concentraciones (por ejemplo, las concentraciones en suero y/o plasma) de al menos dos (por ejemplo, al menos tres, o todos) de sCD40L, fragmento de protrombina F1+2 y D-dímero. En algunas realizaciones, se reducen las concentraciones de trombomodulina, VCAM-1 y/o vWF. En algunas realizaciones, se reducen las concentraciones (por ejemplo, las concentraciones en suero) de CXCL10, MCP-1 y TNFR1. En algunas realizaciones, se reducen las concentraciones (por ejemplo, las concentraciones en suero) de al menos dos (por ejemplo, al menos tres, cuatro o todos) de IFN- γ , ICAM-1, IL-1 beta e IL-12 p70. En algunas realizaciones, los al menos dos cambios fisiológicos pueden ser una reducción de la concentración de al menos dos biomarcadores asociados con SUHa seleccionados de la Tabla 11, es decir, al menos dos (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12 o 13) de un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), C5a, trombomodulina, VCAM-1, fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, sTNFR1, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, TIMP-1 y proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1).

25 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de Ba (por ejemplo, concentración de Ba en plasma) se reduce en al menos 10 % a la semana 6 después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de Ba (por ejemplo, concentración de Ba en plasma) se reduce en al menos 30 % a la semana 12 después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de C5a (por ejemplo, concentración de C5a en orina) se reduce en al menos 40 % a la semana 3 después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de C5a (por ejemplo, concentración de C5a en orina) se reduce en al menos 70 % a la semana 6 después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de C5b-9 (por ejemplo, concentración de C5b-9 en orina o plasma) se reduce en al menos 50 % a la semana 3 después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de F1+2 (por ejemplo, la concentración en plasma de F1+2) se reduce en al menos 20 % a la semana 6 después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de d-dímero (por ejemplo, la concentración en plasma del d-dímero) se reduce en al menos 40 % a la semana 6 después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de trombomodulina (por ejemplo, la concentración en suero de trombomodulina) se reduce en al menos 20 % a la semana 12 después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de VCAM-1 (por ejemplo, la concentración en suero de VCAM-1) se reduce en al menos 20 % a la semana 12 después del inicio del tratamiento.

45 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el inhibidor del complemento se administra al sujeto en una cantidad y con una frecuencia suficientes para efectuar un cambio fisiológico en tres o más biomarcadores asociados con SUHa. En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento se administra al sujeto en una cantidad y con una frecuencia suficientes para efectuar un cambio fisiológico en al menos cuatro biomarcadores asociados con SUHa. En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento se administra al sujeto en una cantidad y con una frecuencia suficientes para efectuar un cambio fisiológico en al menos cinco biomarcadores asociados con SUHa. En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento se administra al sujeto en una cantidad y con una frecuencia suficientes para efectuar un cambio fisiológico en al menos 10 biomarcadores asociados con SUHa. En algunas realizaciones, el inhibidor del componente del complemento C5 se administra al sujeto en una cantidad y con una frecuencia suficientes para efectuar un cambio fisiológico en 15 o más biomarcadores asociados con SUHa.

60 En algunas realizaciones, un cambio fisiológico en al menos dos (por ejemplo, al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 o más) proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa se produce en dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, seis semanas, dos meses, nueve semanas o tres meses o más después de la administración (por ejemplo, administración crónica) del inhibidor.

65 En algunas realizaciones, se reduce la concentración de al menos una (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25) proteína biomarcadora asociada con SUHa en al menos 5 (por ejemplo, al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o 70 %) después de la administración del inhibidor.

En algunas realizaciones, la concentración de al menos una (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25) proteína biomarcadora asociada con SUHa se reduce a dentro del 50 (por ejemplo, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1) % de la concentración normal de la proteína biomarcadora después de la administración de una o más dosis del inhibidor.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de FABP-1 (por ejemplo, FABP-1 en orina) se reduce en al menos 80 % (por ejemplo, 85, 90, 95 o hasta 100 %) después de la administración de un inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti C5). En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de cistatina C (por ejemplo, cistatina C en orina) se reduce en al menos 80 % (por ejemplo, 85, 90, 95, 99 o hasta 100 %) después de la administración de un inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti C5). En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de clusterina (por ejemplo, clusterina en orina) se reduce en al menos 80 % (por ejemplo, 85, 90, 95, 98 o hasta 100 %) después de la administración de un inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5). En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de un fragmento proteolítico del factor B (por ejemplo, Ba) se reduce en al menos 10 % (por ejemplo, 15, 20, 25, 30 o 40 %) después de la administración de un inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5). En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de sTNFR1 se reduce en al menos 80 % (por ejemplo, 85, 90 o más %) después de la administración de un inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti C5). En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de trombomodulina o sVCAM-1 se reduce en al menos 80 % (por ejemplo, 85, 90, 95 o hasta 100 %) después de la administración de un inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti C5). En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de uno o ambos de F1+2 o D-dímero se reduce en al menos 80 % (por ejemplo, 85, 90, 95 o más %) después de la administración de un inhibidor del complemento humano (por ejemplo, un anticuerpo anti C5).

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de al menos una (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25) de las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa se normaliza después de la administración del inhibidor. En algunas realizaciones, se normalizan las concentraciones (por ejemplo, las concentraciones en orina) de al menos tres de microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL10, CXCL9 y KIM-1.

Como se usa en el presente documento, el término "normalizado" o términos gramaticales similares, cuando se usa en el contexto del efecto de una terapia inhibidora del complemento en la concentración o actividad de una proteína biomarcadora de SUHa, se refiere a una concentración o actividad medida en un líquido biológico de una proteína biomarcadora que se ha llevado a dentro del 50 (por ejemplo, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1) % de la concentración promedio o el intervalo de actividad de la proteína biomarcadora de SUHa como se mide en una muestra del mismo tipo de líquido biológico obtenido de un grupo de individuos sanos (individuos normales). Por ejemplo, el tratamiento de un paciente con SUHa con un inhibidor del complemento puede normalizar una concentración de clusterina en orina elevada hasta dentro de, por ejemplo, 20 % del intervalo de concentración de clusterina en orina promedio normal. En algunas realizaciones, el tratamiento con el inhibidor del complemento restauraría la concentración en orina de clusterina hasta dentro del intervalo de concentración en orina promedio normal de clusterina.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el sujeto ha recibido diálisis al menos una vez (por ejemplo, al menos dos veces, tres, cuatro o cinco veces o más) en los tres meses (por ejemplo, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 semanas) antes del tratamiento con el inhibidor. Por ejemplo, en algunas realizaciones el sujeto recibió diálisis una vez dos meses antes de recibir la terapia inhibidora del complemento. En otro ejemplo, el sujeto puede ser uno que ha recibido diálisis tres veces en el periodo de tres meses justo antes de recibir la terapia inhibidora del complemento. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, en relación con la concentración en un sujeto sano, las concentraciones de uno o más de TNFR1, Ba, el fragmento de trombomodulina F1+2 y sC5b9 están elevadas. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, en relación con las concentraciones (por ejemplo, las concentraciones en orina) en un ser humano sano, las concentraciones de uno o más de $\beta 2M$, sC5b9, C5a, cistatina C, clusterina, TIMP-1 y NGAL están elevadas.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) experimenta una primera manifestación de SUHa aguda. Por ejemplo, antes del tratamiento con el inhibidor del complemento, el sujeto puede tener concentraciones elevadas, en relación con las concentraciones normales, de uno o ambos de D-dímero y FABP-1.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el sujeto (por ejemplo,

un sujeto humano) es uno que tiene SUHa, pero se considera que está en remisión clínica (por ejemplo, el sujeto es uno que tiene niveles normales de plaquetas u otros marcadores hematológicos tales como LDH o haptoglobina). En algunas realizaciones, dicho sujeto es uno que tiene niveles elevados de uno o más de los biomarcadores de SUHa descritos en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación, uno o más de Ba, D-dímero, VCAM-1 y fragmentos de protrombina 1+2.

Se entiende que para cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración y/o actividad de una o más proteínas biomarcadoras de SUHa puede determinarse. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un practicante puede medir la actividad de vWF en una muestra biológica obtenida del sujeto como una representación de la concentración de vWF (u otras proteínas biomarcadoras) en la muestra. Se conocen en la técnica métodos para evaluar la actividad relativa de las proteínas biomarcadoras de SUHa expuestas en la Tabla 1.

Como se analiza en detalle en el presente documento (por ejemplo, en los ejemplos de trabajo), SUHa es una enfermedad con peligro para la vida, genética, que implica disregulación de complemento crónica. Los pacientes aquejados de la enfermedad padecen, entre otras cosas, microangiopatía trombótica (TMA), que puede dar como resultado ictus e insuficiencia renal. Se ha mostrado que eculizumab, un anticuerpo antagonista anti C5, reduce drásticamente TMA, normaliza los niveles de plaquetas y mejora la función renal de pacientes con SUHa. Aun así, incluso con el beneficio clínico claro y robusto de terapia inhibitora del complemento para pacientes de SUHa, algunos pacientes aún experimentan niveles elevados de varias proteínas biomarcadoras de SUHa frente al tratamiento. Por ejemplo, los inventores han descubierto que, en algunos pacientes, los niveles de un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb) (por ejemplo, en plasma) no se normalizan después del tratamiento con un anticuerpo antagonista anti C5. Además, para algunos pacientes, los niveles de fragmento de protrombina 1+2, D-dímero, trombomodulina, VCAM-1, TNFR1 y CXCL10 se reducen pero no se normalizan a lo largo del tiempo. Aunque la divulgación no está ligada a ninguna teoría particular o mecanismo de acción, estas observaciones sugieren que, para algunos pacientes, los niveles bajos de inflamación y coagulopatía pueden persistir incluso con terapia inhibitora del complemento. Por lo tanto, la divulgación contempla métodos en los que se administra un inhibidor del complemento en combinación con una segunda terapia para abordar el nivel bajo de inflamación persistente en algunos pacientes con SUHa.

Por lo tanto, en otro aspecto más, la divulgación presenta un método para tratar síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa). El método comprende administrar (por ejemplo, administrar de forma crónica) a un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar, SUHa una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del complemento (por ejemplo, un inhibidor del componente del complemento C5) y una cantidad terapéuticamente eficaz de: (i) un anticoagulante, (ii) un agente fibrinolítico; (iii) un agente antiinflamatorio; o (iv) un inhibidor de IL-6, IL-8, CXCL-9, IL-18 o VEGF. En algunas realizaciones, pueden usarse dos inhibidores del complemento (por ejemplo, un inhibidor de C5 y un inhibidor de C3, tales como, un anticuerpo anti Factor B, un anticuerpo anti C3 o un anticuerpo anti C3b). En algunas realizaciones, en el momento de detener la terapia con un inhibidor de C5, puede administrarse un inhibidor del componente del complemento C3 al paciente durante un tiempo suficiente para reducir la activación de ruta alternativa corriente arriba.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden incluir supervisar el estado de uno o más biomarcadores SUHa y determinar si iniciar una segunda terapia (además de terapia inhibitora del complemento) o modificar el régimen de dosificación de una o más segundas terapias que se administran a un paciente con SUHa. Por ejemplo, durante el tratamiento (por ejemplo, tratamiento crónico) con un inhibidor del complemento, la concentración de una o más proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa puede medirse en uno o más líquidos biológicos obtenidos del sujeto. Si la concentración de una o más de las proteínas biomarcadoras no se ha normalizado y/o permanece elevada, un practicante médico puede elegir administrar al sujeto uno o más agentes secundarios adicionales (por ejemplo, antiinflamatorios) para abordar cualquier efecto patofisiológico que resulte de los biomarcadores elevados.

El inhibidor del complemento puede ser cualquiera de los descritos en el presente documento. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el inhibidor es anticuerpo o un fragmento de unión a antígenos del mismo, una molécula pequeña, un polipéptido, un análogo polipeptídico, un peptidomimético o un aptámero. En algunas realizaciones, el inhibidor puede ser uno que inhiba uno o más de los componentes del complemento C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, Factor D, Factor B, properdina, MBL, MASP-1, MASP-2 o fragmentos biológicamente activos de cualquiera de los anteriores. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el inhibidor del complemento inhibe uno o ambos de la generación de la actividad anafilatóxica asociada con C5a y/o el ensamblaje del complejo de ataque a membrana asociado con C5b.

Las composiciones también pueden contener formas de origen natural o solubles de compuestos inhibidores del complemento tales como CR1, LEX-CR1, MCP, DAF, CD59, Factor H, factor de veneno de cobra, FUT-175, complestatina y K76 COOH.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el inhibidor del complemento es un anticuerpo antagonista o fragmento de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo o fragmento

de unión a antígeno del mismo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo humanizado, un anticuerpo recombinante, un diacuerpo, un anticuerpo quimerizado o quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo desinmunizado, un anticuerpo complementado humano, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fv, un fragmento Fd, un fragmento Fab, un fragmento Fab' y un fragmento F(ab')₂.

5 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el anticuerpo antagonista es un anticuerpo anti-C5 tal como eculizumab. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista es pexelizumab, un fragmento de unión a C5 de anticuerpo anti-C5.

10 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el inhibidor del complemento se selecciona del grupo que consiste en MB 12/22, MB12/22-RGD, ARC187, ARC1905, SSL7 y OmCI.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el anticoagulante se selecciona del grupo que consiste en: una coumarina, heparina, un inhibidor de factor Xa y un inhibidor de trombina.
15 Los ejemplos de anticoagulantes incluyen, por ejemplo, warfarina (Coumadina), aspirina, heparina, fenindiona, fondaparinux, idraparinux e inhibidores de trombina (por ejemplo, argatroban, lepirudina, bivalirudina o dabigatran).

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el agente fibrinolítico se selecciona del grupo que consiste en ancrod, ácido ϵ -aminocaproico, antiplasmina α_1 , prostaciclina y defibrólido.
20

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el agente antiinflamatorio es un agente anti-citocinas tal como un anticuerpo antagonista (o fragmento de unión a antígeno del mismo) o un receptor de citocina soluble, que se une con una citocina inflamatoria e inhibe la actividad de la citocina. El agente anti-citocinas puede ser, por ejemplo, un inhibidor de TNF (por ejemplo, un anticuerpo anti-TNF o proteína receptora de TNF soluble) o un agente anti-CD20.
25

Los agentes antiinflamatorios también incluyen, por ejemplo, esteroides (por ejemplo, dexametasona), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (por ejemplo, indometacina, naproxeno, sulindac, diclofenac, aspirina, flurbiprofeno, oxaprozina, salsalato, difunisal, piroxicam, etodolac, meclofenamato, ibuprofeno, fenoprofeno, ketoprofeno, nabumetona, tolmetina, salicilato magnésico de colina, inhibidores de COX-2, antagonistas de TNF alfa (etanercept, adalimumab, infliximab, golimumab), fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (FARME) (por ejemplo, sulfasalazina, metotrexato), ciclosporina, retinoides y corticosteroides.
30

La divulgación presenta un método para determinar si la concentración de una o más proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa está elevada en un paciente que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar, síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa), en el que el método comprende: (i) medir en una muestra biológica obtenida del paciente la concentración de cada uno de al menos dos biomarcadores asociados con SUHa de la Tabla 11 (posteriormente), es decir, seleccionados del grupo que consiste en: un fragmento proteolítico del factor B, C5a, C5b-9 soluble (sC5b-9), TNFR1 soluble (sTNFR1), VCAM-1 soluble (sVCAM-1), trombomodulina, fragmentos de protrombina 1 y 2 (F1+2), D-dímero, clusterina, TIMP-1, FABP-1, microglobulina beta-2 (β_2m) y cistatina-C, y (ii) determinar si el paciente tiene una concentración elevada de cada uno de al menos dos de los biomarcadores asociados con SUHa en comparación con una concentración de control normal de los mismos al menos dos biomarcadores. En algunas realizaciones, las al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa se miden usando un inmunoensayo, tal como, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA). El líquido biológico puede ser, por ejemplo, sangre, una fracción sanguínea (por ejemplo, plasma o suero) u orina. Se entiende que cualquier combinación de dos o más (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11 o 12) cualesquiera de los biomarcadores de SUHa anteriormente mencionados puede medirse y analizarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.
35
40
45

La divulgación presenta un método para diagnosticar a un paciente que tiene síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa) (o confirmar un diagnóstico de SUHa), por ejemplo, en el que el paciente ha cumplido dos o más de los criterios de inclusión analizados en el Ejemplo 1), en el que el método comprende: (1) medir en una muestra biológica obtenida de un paciente que se sospecha que tiene SUHa o en riesgo de desarrollar SUHa la concentración de cada uno de al menos dos biomarcadores asociados con SUHa seleccionados del grupo que
50
55
60
65

consiste en: un fragmento proteolítico de factor B, C5a, C5b-9 soluble (sC5b-9), TNFR1 soluble (sTNFR1), VCAM-1 soluble (sVCAM-1), trombomodulina, fragmentos de protrombina 1 y 2 (F1+2), D-dímero, clusterina, TIMP-1, FABP-1, microglobulina beta-2 (β_2m) y cistatina-C, y (ii) diagnosticar que un paciente tiene SUHa (o confirmar un diagnóstico de SUHa) si la concentración de cada uno de al menos dos de los biomarcadores asociados con SUHa está elevada en comparación con una concentración de control normal de los mismos al menos dos biomarcadores. En algunas realizaciones, las al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa se miden usando un inmunoensayo, tal como, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA). El líquido biológico puede ser, por ejemplo, sangre, una fracción sanguínea (por ejemplo, plasma o suero) u orina. Se entiende que cualquier combinación de dos o más cualesquiera (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11 o 12) de los biomarcadores de SUHa anteriormente mencionados puede medirse y analizarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Una concentración de control normal, como se usa en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, puede ser (o puede basarse en), por ejemplo, la concentración de una proteína biomarcadora asociada con SUHa dada en una muestra biológica o muestras biológicas obtenidas de uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 o más) individuos sanos. En algunas realizaciones, una concentración de control normal de un biomarcador puede ser (o puede basarse en), por ejemplo, la concentración del biomarcador en una muestra agrupada obtenida de dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 o más) individuos sanos. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, las muestras agrupadas pueden ser de individuos sanos o, al menos, individuos que no tienen o no se sospecha que tengan (no están en riesgo de desarrollar) SUHa. Por ejemplo, la determinación de si un sujeto es uno que tiene SUHa puede implicar comparar la concentración medida de una o más proteínas componentes del complemento (por ejemplo, Tabla 1 o Tabla 11) en una muestra biológica (o varios tipos diferentes de muestras biológicas) obtenida del paciente y comparar la concentración medida con la concentración promedio de las mismas proteínas en las muestras sanas agrupadas. Dichas concentraciones de control de seres humanos sanos pueden ser, en algunas realizaciones, un intervalo de valores, o una mediana de valores o el valor medio obtenido del intervalo.

En algunas realizaciones, la concentración de al menos un biomarcador asociado con SUHa se mide en dos o más tipos de líquido biológico. En algunas realizaciones, la concentración de la primera de las al menos dos proteínas biomarcadoras de SUHa se mide en un tipo de líquido biológico y la concentración de la segunda de las al menos dos proteínas biomarcadoras de SUHa se miden en un segundo tipo de líquido.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración del fragmento proteolítico del factor B. El fragmento puede ser, por ejemplo, Ba. La muestra biológica puede ser una muestra de plasma. Como se describe en la Tabla 11, la concentración de control normal de Ba puede ser de menos de 1000 ng/ml. La concentración de control normal de Ba puede ser de menos de 600 ng/ml. La concentración de control normal de Ba puede ser de entre 300 y 600 ng/ml.

En algunas realizaciones, la concentración de Ba en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos dos veces mayor que la concentración de control normal de Ba. En algunas realizaciones, la concentración de Ba en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos cinco veces mayor que la concentración de control normal de Ba. En algunas realizaciones, la concentración de Ba en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos 1500 ng/ml. En algunas realizaciones, la concentración de Ba en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos 2500 ng/ml.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de C5a. La muestra biológica en la que se mide C5a puede ser una muestra de orina. Y en algunas realizaciones, la concentración de control normal de C5a es menor de 2 ng por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de C5a es menor de 1 ng por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de C5a es de entre 0 y 0,7 ng por mg de creatinina en orina.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de C5a en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos dos veces mayor que la concentración de control normal de C5a. En algunas realizaciones, la concentración de C5a en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos diez veces mayor que la concentración de control normal de C5a. En algunas realizaciones, la concentración de C5a en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos cuarenta veces mayor que la concentración de control normal de C5a. En algunas realizaciones, la concentración de C5a en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos 5 ng por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de C5a en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos 9 ng por mg de creatinina en orina.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de sC5b-9. La muestra biológica en la que se mide sC5b-9 puede ser una muestra de orina. Y en algunas realizaciones, la concentración de control normal de sC5b-9 es de menos de 2 ng por mg de creatinina en orina. La concentración de control normal de sC5b-9 puede ser de menos de 1 ng por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de sC5b-9 es de entre 0 y 0,6 ng por mg de creatinina en orina.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de sC5b-9 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos diez veces mayor que la concentración de control normal de sC5b-9. En algunas realizaciones, la concentración de sC5b-9 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos cincuenta veces mayor que la concentración de control normal de sC5b-9. En algunas realizaciones, la concentración de sC5b-9 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos cien veces mayor que la concentración de control normal de sC5b-9. En algunas realizaciones, la concentración de sC5b-9 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos 20 ng por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de sC5b-9 en la muestra biológica se considera

elevada cuando es al menos 30 ng por mg de creatinina en orina.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de sTNFR1. La muestra biológica en la que se mide sTNFR1 puede ser una muestra de suero. Y en algunas realizaciones, la concentración de control normal de sTNFR1 es de menos de 2000 pg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de sTNFR1 es de menos de 1500 pg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de sTNFR1 es de entre 400 y 1500 pg/ml.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de sTNFR1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos dos veces mayor que la concentración de control normal de sTNFR1. En algunas realizaciones, la concentración de sTNFR1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos cinco veces mayor que la concentración de control normal de sTNFR1. En algunas realizaciones, la concentración de sTNFR1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos quince veces mayor que la concentración de control normal de sTNFR1. En algunas realizaciones, la concentración de sTNFR1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 10.000 pg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de sTNFR1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 15.000 pg/ml.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de sVCAM-1. La muestra biológica en la que se mide sVCAM-1 puede ser una muestra de suero. Y en algunas realizaciones, la concentración de control normal de sVCAM-1 es de menos de 500 ng/ml. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de sVCAM-1 es de menos de 300 ng/ml. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de sVCAM-1 es de entre 100 y 500 ng/ml.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de sVCAM-1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos 10 % mayor que la concentración de control normal de sVCAM-1. En algunas realizaciones, la concentración de sVCAM-1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos 30 % mayor que la concentración de control normal de sVCAM-1. En algunas realizaciones, la concentración de sVCAM-1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos 50 % mayor que la concentración de control normal de sVCAM-1. En algunas realizaciones, la concentración de sVCAM-1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos de 550 ng/ml. En algunas realizaciones, la concentración de sVCAM-1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos de 650 ng/ml.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de trombomodulina. La muestra biológica en la que se mide la trombomodulina puede ser una muestra de plasma. Y en algunas realizaciones, la concentración de control normal de trombomodulina es de menos de 5 ng/ml. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de trombomodulina es de menos de 3 ng/ml. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de trombomodulina es de entre 2 y 6 ng/ml.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de trombomodulina en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos 10 % mayor que la concentración de control normal de trombomodulina. En algunas realizaciones, la concentración de trombomodulina en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos 30 % mayor que la concentración de control normal de trombomodulina. En algunas realizaciones, la concentración de trombomodulina en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos 50 % mayor que la concentración de control normal de trombomodulina. En algunas realizaciones, la concentración de trombomodulina en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 8 ng/ml. En algunas realizaciones, la concentración de trombomodulina en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 10 ng/ml.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de F1+2. La muestra biológica en la que se mide F1+2 puede ser una muestra de plasma. Y en algunas realizaciones, la concentración de control normal de F1+2 es de menos de 400 pmol/l. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de F1+2 es de menos de 300 pmol/l. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de F1+2 es de entre 50 y 400 pmol/l.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de F1+2 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos 30 % mayor que la concentración de control normal de F1+2. En algunas realizaciones, la concentración de F1+2 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos 50 % mayor que la concentración de control normal de F1+2. En algunas realizaciones, la concentración de F1+2 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos 100 % mayor que la concentración de control normal de F1+2. En algunas realizaciones, la concentración de F1+2 en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 900 pmol/l. En algunas realizaciones, la concentración de F1+2 en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 1000 pmol/l.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la

concentración de D-dímero. La muestra biológica en la que se mide D-dímero puede ser una muestra de plasma. Y en algunas realizaciones, la concentración de control normal de D-dímero es de menos de 500 µg/l. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de D-dímero es de menos de 400 µg/l. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de D-dímero es de entre 100 y 500 µg/l.

5 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de D-dímero en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos dos veces mayor que la concentración de control normal de D-dímero. En algunas realizaciones, la concentración de D-dímero en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos cinco veces mayor que la concentración de control normal de D-dímero. En algunas realizaciones, la concentración de D-dímero en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos diez veces mayor que la concentración de control normal de D-dímero. En algunas realizaciones, la concentración de D-dímero en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 1500 µg/l. En algunas realizaciones, la concentración de D-dímero en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 2500 µg/l.

15 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de clusterina. La muestra biológica en la que se mide clusterina puede ser una muestra de orina. Y en algunas realizaciones, la concentración de control normal de clusterina es de menos de 500 ng por mg de creatinina en orina. La concentración de control normal de clusterina puede ser, por ejemplo, de menos de 400 ng por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de clusterina es de entre 0 y 500 ng por mg de creatinina en orina.

20 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de clusterina en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos dos veces mayor que la concentración de control normal de clusterina. En algunas realizaciones, la concentración de clusterina en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos cinco veces mayor que la concentración de control normal de clusterina. En algunas realizaciones, la concentración de clusterina en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos diez veces mayor que la concentración de control normal de clusterina. En algunas realizaciones, la concentración de clusterina en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 900 ng por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de clusterina en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 1200 ng por mg de creatinina en orina.

25 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de TIMP-1. La muestra biológica en la que se mide TIMP-1 puede ser una muestra de orina. Y en algunas realizaciones, la concentración de control normal de TIMP-1 es de menos de 10 ng por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de TIMP-1 es de menos de 5 ng por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de TIMP-1 es de entre 0 y 10 ng por mg de creatinina en orina.

30 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de TIMP-1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos dos veces mayor que la concentración de control normal de TIMP-1. En algunas realizaciones, la concentración de TIMP-1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos diez veces mayor que la concentración de control normal de TIMP-1. En algunas realizaciones, la concentración de TIMP-1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos veinte veces mayor que la concentración de control normal de TIMP-1. En algunas realizaciones, la concentración de TIMP-1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 15 ng por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de TIMP-1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 20 ng por mg de creatinina en orina.

35 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de FABP-1 (también denominado en el presente documento L-FABP-1). La muestra biológica en la que se mide C5a puede ser una muestra de orina. Y en algunas realizaciones, la concentración de control normal de FABP-1 es de menos de 20 ng por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de FABP-1 es de menos de 15 ng por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de FABP-1 es de entre 0 y 20 ng por mg de creatinina en orina.

40 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de FABP-1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos dos veces mayor que la concentración de control normal de FABP-1. En algunas realizaciones, la concentración de FABP-1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos diez veces mayor que la concentración de control normal de FABP-1. En algunas realizaciones, la concentración de FABP-1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos veinte veces mayor que la concentración de control normal de FABP-1. En algunas realizaciones, la concentración de FABP-1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 40 ng por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de FABP-1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 50 ng por mg de creatinina en orina.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de $\beta 2m$. La muestra biológica en la que se mide $\beta 2m$ puede ser una muestra de orina. Y en algunas realizaciones, la concentración de control normal de $\beta 2m$ es de menos de 5 μg por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de $\beta 2m$ es de menos de 3 μg por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de $\beta 2m$ es de entre 0 y 5 μg por mg de creatinina en orina.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de $\beta 2m$ en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos dos veces mayor que la concentración de control normal de $\beta 2m$. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de $\beta 2m$ en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos diez veces mayor que la concentración de control normal de $\beta 2m$. En algunas realizaciones, la concentración de $\beta 2m$ en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos veinte veces mayor que la concentración de control normal de $\beta 2m$. En algunas realizaciones, la concentración de $\beta 2m$ en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 15 μg por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de $\beta 2m$ en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 20 μg por mg de creatinina en orina.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se mide la concentración de cistatina-C. La muestra biológica en la que se mide cistatina-C puede ser una muestra de orina. Y en algunas realizaciones, la concentración de control normal de cistatina-C es de menos de 400 ng por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de cistatina-C es de menos de 300 ng por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de control normal de cistatina-C es de entre 0 y 400 ng por mg de creatinina en orina.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la concentración de cistatina-C en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos dos veces mayor que la concentración de control normal de cistatina-C. En algunas realizaciones, la concentración de cistatina-C en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos diez veces mayor que la concentración de control normal de cistatina-C. En algunas realizaciones, la concentración de cistatina-C en la muestra biológica se considera elevada cuando es al menos veinte veces mayor que la concentración de control normal de cistatina-C. En algunas realizaciones, la concentración de cistatina-C en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 900 ng por mg de creatinina en orina. En algunas realizaciones, la concentración de cistatina-C en la muestra biológica se considera elevada cuando es de al menos 1200 ng por mg de creatinina en orina.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de dos o más de los fragmentos proteolíticos de factor B, C5a y sC5b-9. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de C5a y sC5b-9. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de sVCAM-1 y trombosmodulina. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de F1+2 y D-dímero. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, se miden las concentraciones de dos o más de clusterina, TIMP-1, $\beta 2m$, FABP-1 y cistatina-C.

La divulgación presenta un método para evaluar el nivel de activación de ruta alternativa en un paciente que tiene SUHa, se sospecha que tiene SUHa o está en riesgo de desarrollar SUHa, antes, durante o después del tratamiento con un inhibidor del complemento, tal como un anticuerpo anti-C5. El método comprende: medir la concentración de un fragmento proteolítico del factor B (por ejemplo, Ba o Bb) en una muestra biológica obtenida de un paciente tratado con un inhibidor del complemento (por ejemplo, un inhibidor del componente del complemento humano C5, tal como un anticuerpo anti-C5).

La divulgación presenta un método para determinar si un paciente ha respondido a terapia con un inhibidor del complemento (por ejemplo, ha tenido una reducción en el riesgo de desarrollar trombosis o ha tenido una reducción en el número, frecuencia o aparición de microangiopatía trombótica), comprendiendo el método medir la concentración de uno o más biomarcadores de trombosis o coagulación expuestos en la Tabla 1 u 11, por ejemplo, F1+2, D-dímero, vWF o trombosmodulina, en una muestra biológica obtenida de un paciente en riesgo elevado de, que padece o se sospecha que tiene microangiopatía trombótica (TMA) y tratado con un inhibidor del complemento; y determinar que el paciente ha respondido a la terapia si se reduce la concentración del o los biomarcadores en la muestra biológica, en comparación con la concentración del o los biomarcadores en una muestra biológica del mismo tipo obtenido del paciente antes del tratamiento con el inhibidor del complemento o determinar que el paciente no ha respondido a la terapia si la concentración del o los biomarcadores en la muestra biológica no se reduce, en comparación con la concentración del o los biomarcadores en una muestra biológica del mismo tipo obtenido del paciente antes del tratamiento con el inhibidor del complemento. En algunas realizaciones, el paciente tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar SUHa.

La divulgación presenta un método para determinar si un paciente con SUHa ha respondido a la terapia con un inhibidor del complemento, comprendiendo el método medir la concentración de uno o más biomarcadores de

activación de complemento terminal expuestos en la Tabla 1 u 11, por ejemplo, C5a y/o sC5b-9, en una muestra biológica obtenida de un paciente que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar SUHa y tratada con un inhibidor del complemento (por ejemplo, un anticuerpo anti-C5); y determinar que el paciente ha respondido a la terapia si la concentración del o los biomarcadores en la muestra biológica se reduce, en comparación con la concentración del o los biomarcadores en una muestra biológica del mismo tipo obtenida del paciente antes del tratamiento con el inhibidor del complemento o determinar que el paciente no ha respondido a la terapia si la concentración del o los biomarcadores en la muestra biológica no se reduce, en comparación con la concentración del o los biomarcadores en una muestra biológica del mismo tipo obtenido del paciente antes del tratamiento con el inhibidor del complemento. Por lo tanto, el método puede usarse para evaluar o supervisar el bloqueo del complemento terminal en un paciente con SUHa tratado con un inhibidor del complemento. En realizaciones en las que el paciente no es sensible, o es menos sensible a la terapia, el método también puede incluir cambiar la cantidad de dosis o frecuencia de dosis del inhibidor del complemento o elegir un inhibidor del complemento diferente (por ejemplo, un inhibidor de activación de C3) para su uso en el tratamiento del paciente.

La divulgación presenta un método para determinar si un paciente con SUHa ha respondido a la terapia con un inhibidor del complemento, comprendiendo el método medir la concentración de uno o más biomarcadores de inflamación vascular o activación endotelial expuestos en la Tabla 1 u 11, por ejemplo, sTNFR1, sVCAM-1, o trombomodulina, en una muestra biológica obtenida de un paciente que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar, SUHa; y determinar que el paciente ha respondido a la terapia si la concentración del o los biomarcadores en la muestra biológica se reduce, en comparación con la concentración del o los biomarcadores en una muestra biológica del mismo tipo obtenido del paciente antes del tratamiento con el inhibidor del complemento o determinar que el paciente no ha respondido a la terapia si la concentración del o los biomarcadores en la muestra biológica no se reduce, en comparación con la concentración del o los biomarcadores en una muestra biológica del mismo tipo obtenida del paciente antes del tratamiento con el inhibidor del complemento. Por lo tanto, el método puede usarse para evaluar o supervisar la inflamación vascular en un paciente con SUHa tratado con un inhibidor del complemento. En realizaciones en las que el paciente no es sensible, o es menos sensible a la terapia, el método también puede incluir cambiar la cantidad de dosis o frecuencia de dosis del inhibidor del complemento o elegir un inhibidor del complemento diferente (por ejemplo, un inhibidor de la activación de C3) para su uso en el tratamiento del paciente.

La divulgación presenta un método para determinar si un paciente con SUHa ha respondido a la terapia con un inhibidor del complemento, comprendiendo el método medir la concentración de uno o más biomarcadores de lesión renal expuestos en la Tabla 1 u 11, por ejemplo, clusterina, TIMP-1, FABP-1, β 2m y/o cistatina-C, en una muestra biológica obtenida de un paciente que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar SUHa; y determinar que el paciente ha respondido a la terapia si se reduce la concentración del o los biomarcadores en la muestra biológica, en comparación con la concentración del o los biomarcadores en una muestra biológica del mismo tipo obtenido del paciente antes del tratamiento con el inhibidor del complemento o determinar que el paciente no ha respondido a la terapia si no se reduce la concentración del o los biomarcadores en la muestra biológica, en comparación con la concentración del o los biomarcadores en una muestra biológica del mismo tipo obtenido del paciente antes del tratamiento con el inhibidor del complemento. Por lo tanto, el método puede usarse para evaluar o supervisar lesión renal en un paciente con SUHa tratado con un inhibidor del complemento. En realizaciones en las que el paciente no es sensible, o es menos sensible a la terapia, el método también puede incluir cambiar la cantidad de dosis o frecuencia de dosis del inhibidor del complemento o elegir un inhibidor del complemento diferente (por ejemplo, un inhibidor de activación de C3) para su uso en el tratamiento del paciente.

Los inventores también han descubierto que, en pacientes con SUHa, el aumento relativo de las concentraciones de marcadores de activación del complemento terminal C5a y sC5b-9 (por ejemplo, concentraciones en orina) son mucho mayores que el aumento relativo de los niveles de marcadores de activación de ruta alternativa del complemento (por ejemplo, Ba) en estos pacientes. Es decir, la mediana de la concentración de C5a y sC5b-9 en pacientes con SUHa fue 45 y 305 veces mayor, respectivamente, que la mediana de la concentración de estos marcadores en seres humanos sanos normales, mientras que la mediana de la concentración de Ba fue solamente aproximadamente 5 veces mayor que la mediana de la concentración de Ba en seres humanos normales sanos. Aunque sin quedar ligado a ninguna teoría particular o mecanismo de acción, los inventores creen que la relación de activación del complemento terminal con respecto a activación de ruta alternativa es una herramienta de diagnóstico útil para SUHa. Por lo tanto, en otro aspecto, la divulgación presenta un método para diagnosticar SUHa o confirmar un diagnóstico de SUHa, incluyendo dicho método comparar el nivel de activación de complemento terminal (por ejemplo, sC5b-9 o C5a) con el nivel de activación de la activación de ruta alternativa corriente arriba (por ejemplo, Ba o Bb) (en relación con seres humanos sanos normales), en el que un mayor grado de activación terminal en relación con la activación de ruta alternativa es una indicación de que el paciente tiene SUHa. Por ejemplo, una relación indicativa de SUHa podría ser, por ejemplo, aproximadamente 45:5 o 305:5, factor de inducción de activación del complemento terminal con respecto a factor de inducción de activación de ruta alternativa. Además, los inventores creen que esta relación puede ser útil para distinguir SUHa de otras enfermedades asociadas con complemento, tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), que puede no mostrar dicha diferencia en complemento terminal y niveles de activación de ruta alternativa corriente arriba.

“Polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente y significan cualquier cadena con enlaces peptídicos de

aminoácidos, independientemente de la longitud o la modificación postraduccional. Las proteínas descritas en el presente documento pueden contener o ser proteínas de tipo silvestre o pueden ser variantes que no tienen más de 50 (por ejemplo, no más de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 50) sustituciones de aminoácidos conservativas. Las sustituciones conservativas incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina, glutamina, serina y treonina; lisina, histidina y arginina; y fenilalanina y tirosina.

Como se usa en el presente documento, el porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos se define como el porcentaje de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los aminoácidos en una secuencia de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el porcentaje de identidad de secuencia máximo. Puede conseguirse alineamiento para fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de diversas maneras que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como software BLAST. Pueden determinarse parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir alineamiento máximo sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan por métodos conocidos.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye tanto anticuerpos completos como fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos completos. Los anticuerpos completos incluyen diferentes isotipos de anticuerpo incluyendo anticuerpos IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. El término "anticuerpo" incluye un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimerizado o quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo primatizado, un anticuerpo desinmunizado y un anticuerpo completamente humano. El anticuerpo puede prepararse en u obtenerse de cualquiera de una diversidad de especies, por ejemplo, mamíferos tales como seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, orangutanes, babuinos o chimpancés), caballos, vacas, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, conejos, cobayas, gerbos, hámsteres, ratas y ratones. El anticuerpo puede ser un anticuerpo purificado o uno recombinante.

Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento de anticuerpo", "fragmento de unión a antígeno" o expresiones similares se refieren a un fragmento de un anticuerpo que conserva la capacidad de unirse con un antígeno diana (por ejemplo, C5 humano) e inhibir la actividad del antígeno diana. Dichos fragmentos incluyen, por ejemplo, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fv monocatenario (scFv), un fragmento Fd, un fragmento Fab, un fragmento Fab' o un fragmento F(ab')₂. Un fragmento scFv es una única cadena polipeptídica que incluye las regiones variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada del anticuerpo del que deriva el scFv. Además, también se incluyen intracuerpos, minicuerpos, triacuerpos y diacuerpos en la definición de anticuerpo y son compatibles para su uso en los métodos descritos en el presente documento. Véase, por ejemplo, Todorovska *et al.* (2001) *J Immunol Methods* 248(1): 47-66; Hudson y Kortt (1999) *J Immunol Methods* 231(1): 177-189; Poljak (1994) *Structure* 2(12):1121-1123; y Rondon y Marasco (1997) *Annual Review of Microbiology* 51: 257-283. El término "anticuerpo" también abarca anticuerpos biespecíficos (incluyendo anticuerpos DVD-Ig; véase posteriormente). Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" también incluye, por ejemplo, anticuerpos de un único dominio tales como anticuerpos de un único dominio camelizados. Véase, por ejemplo, Muyldermans *et al.* (2001) *Trends Biochem Sci* 26: 230-235; Nuttall *et al.* (2000) *Curr Pharm Biotech* 1: 253-263; Riechmann *et al.* (1999) *J Immunol Meth* 231: 25-38; publicaciones de solicitud de PCT n.º WO 94/04678 y WO 94/25591; y patente de Estados Unidos n.º 6.005.079. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona anticuerpos de un único dominio que comprenden dos dominios VH con modificaciones tales que se formen anticuerpos de un único dominio.

A no ser que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Se describen posteriormente métodos y materiales preferidos, aunque pueden usarse también métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de los métodos y las composiciones desvelados en la presente.

Otros elementos y ventajas de la presente divulgación, por ejemplo, métodos para tratar trastornos asociados con el complemento en un sujeto, resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción, los ejemplos y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La **Fig. 1A** es un diagrama de puntos que representa la concentración de C5a (en ng/mg de creatina en orina) en la orina de pacientes con SUHa tanto antes del tratamiento con eculizumab (Pre-Tx) como diversas semanas después del inicio del tratamiento con eculizumab. La concentración de C5a en orina también se midió en la orina de individuos normales, sanos (NORM).

La **Fig. 1B** es un diagrama de puntos que representa la concentración de sC5b-9 (en ng/mg de creatina en orina) en la orina de pacientes con SUHa tanto antes del tratamiento con eculizumab (Pre-Tx) como diversas semanas

después del inicio del tratamiento con eculizumab. También se midió la concentración de C5b9 en orina en la orina de individuos normales, sanos (NORM).

5 La **Fig. 1C** es un diagrama de puntos que representa la concentración del componente del complemento Ba (en ng/ml) en el plasma de pacientes con SUHa tanto antes del tratamiento con eculizumab (Pre-Tx) como diversas semanas después del inicio del tratamiento con eculizumab. También se midió la concentración de Ba en el plasma de individuos normales, sanos (normales).

10 La **Fig. 1D** es una gráfica de barras que representa el porcentaje (%) medio de reducción de los niveles de C5a en orina (eje Y) a lo largo del tiempo en pacientes con SUHa (N = 26) después del inicio del tratamiento con eculizumab. El eje x indica la semana de la visita del paciente con SUHa para evaluación después del inicio del tratamiento, por ejemplo, V3 es la visita del paciente para evaluación en la semana 3 después del inicio del tratamiento.

15 La **Fig. 1E** es una gráfica de barras que representa el porcentaje (%) medio de reducción de los niveles de sC5b-9 en orina (eje Y) a lo largo del tiempo en pacientes con SUHa (N = 23) después del inicio del tratamiento con eculizumab. El eje x indica la semana de la visita del paciente con SUHa para evaluación después del inicio del tratamiento, por ejemplo, V3 es la visita del paciente para evaluación en la semana 3 después del inicio del tratamiento.

20 La **Fig. 1F** es una gráfica de barras que representa el porcentaje (%) medio de reducción de los niveles de Ba en plasma (Eje Y) a lo largo del tiempo en pacientes con SUHa (N = 35) después del inicio del tratamiento con eculizumab. El eje x indica la semana de la visita del paciente con SUHa para evaluación después del inicio del tratamiento, por ejemplo, V3 es la visita del paciente para evaluación en la semana 3 después del inicio del tratamiento.

25 Las **Figs. 2A-2C** son gráficas de barras que representan el porcentaje de pacientes con SUHa que consiguen concentraciones normalizadas de C5a en orina (Fig. 2A), sC5b9 en orina (Fig. 2B) y Ba en plasma (Fig. 2C) en línea basal (pretratamiento con eculizumab) y diversas semanas después del inicio del tratamiento con eculizumab.

30 La **Fig. 3A** es un diagrama de puntos que representa la concentración de fragmento de protrombina 1+2 (en pmol/l) en el plasma de pacientes con SUHa tanto antes del tratamiento con eculizumab (Pre-Tx) como diversas semanas después del inicio del tratamiento con eculizumab. La concentración de F1+2 en plasma también se midió en el plasma de individuos normales, sanos (normales).

35 La **Fig. 3B** es un diagrama de puntos que representa la concentración de D-dímero (en µg/l) en el plasma de pacientes con SUHa tanto antes del tratamiento con eculizumab (Pre-Tx) como diversas semanas después del inicio del tratamiento con eculizumab. La concentración de D-dímero en plasma también se midió en el plasma de individuos normales, sanos (normales).

40 La **Fig. 3C** es una gráfica de barras que representa el porcentaje (%) medio de reducción de los niveles de fragmentos de protrombina F1+2 en plasma (eje Y) a lo largo del tiempo en pacientes con SUHa después del inicio del tratamiento con eculizumab. El eje x indica la semana de la visita del paciente con SUHa para evaluación después del inicio del tratamiento, por ejemplo, V3 es la visita del paciente para evaluación en la semana 3 después del inicio del tratamiento.

45 La **Fig. 3D** es una gráfica de barras que representa el porcentaje (%) medio de reducción de los niveles de d-dímero en plasma (eje Y) a lo largo del tiempo en pacientes con SUHa después del inicio del tratamiento con eculizumab. El eje x indica la semana de la visita del paciente con SUHa para evaluación después del inicio del tratamiento, por ejemplo, V3 es la visita del paciente para evaluación en la semana 3 después del inicio del tratamiento.

50 Las **Figs. 4A y 4B** son gráficas de barras que representan el porcentaje de pacientes con SUHa que consiguen concentraciones normalizadas de fragmento de protrombina en plasma 1+2 (Fig. 4A) y D-dímero en plasma (Fig. 4B) en línea basal (pretratamiento con eculizumab) y diversas semanas después del inicio del tratamiento con eculizumab.

55 La **Fig. 5A** es un diagrama de puntos que representa la concentración de trombomodulina (en ng/ml) en el plasma (plasma tratado con EDTA) de pacientes con SUHa tanto antes del tratamiento con eculizumab (Pre-Tx) como diversas semanas después del inicio del tratamiento con eculizumab. También se midió la concentración de trombomodulina en plasma en el plasma de individuos normales, sanos (normales). EOS designa los resultados de los análisis de muestras obtenidas "al final del estudio".

60 La **Fig. 5B** es un diagrama de puntos que representa la concentración de VCAM-1 (en ng/ml) en el suero de pacientes con SUHa tanto antes del tratamiento con eculizumab (Pre-Tx) como diversas semanas después del

inicio del tratamiento con eculizumab. También se midió la concentración de VCAM-1 en suero en el suero de individuos normales, sanos (grupo normal). EOS designa los resultados del análisis de muestras obtenidas “al final del estudio”.

5 La **Fig. 5C** es un diagrama de puntos que representa la actividad de vWF (en mU/ml) en el plasma (plasma tratado con EDTA) de pacientes con SUHa tanto antes del tratamiento con eculizumab (Pre-Tx) como diversas semanas después del inicio del tratamiento con eculizumab. También se midió la actividad de vWF en el plasma de individuos normales, sanos (normales). EOS designa los resultados del análisis de muestras obtenidas “al final del estudio”.

10 Las **Figs. 6A y 6B** son gráficas de barras que representan el porcentaje de pacientes con SUHa que consiguen concentraciones de trombomodulina en plasma normalizadas (Fig. 6A) y niveles de actividad de vWF en plasma (Fig. 4B) en línea basal (pretratamiento con eculizumab) y diversas semanas después del inicio del tratamiento con eculizumab.

15 La **Fig. 6C** es una gráfica de barras que representa el porcentaje (%) medio de reducción de los niveles de trombomodulina en plasma (eje Y) a lo largo del tiempo en pacientes con SUHa (N = 33) después del inicio del tratamiento con eculizumab. El eje x indica la semana de la visita del paciente con SUHa para evaluación después del inicio del tratamiento, por ejemplo, V3 es la visita del paciente para evaluación en la semana 3 después del inicio del tratamiento.

20 La **Fig. 6D** es una gráfica de barras que representa el porcentaje (%) medio de reducción de los niveles de VCAM-1 en suero (eje Y) a lo largo del tiempo en pacientes con SUHa (N = 36) después del inicio del tratamiento con eculizumab. El eje x indica la semana de la visita del paciente con SUHa para evaluación después del inicio del tratamiento, por ejemplo, V3 es la visita del paciente para evaluación en la semana 3 después del inicio del tratamiento.

25 La **Fig. 7A** es un diagrama de puntos que representa la concentración de TNFR1 (en pg/ml) en el suero de pacientes con SUHa tanto antes del tratamiento con eculizumab (Pre-Tx) como diversas semanas después del inicio del tratamiento con eculizumab. La concentración de TNFR1 en suero también se midió en el suero de individuos normales, sanos (grupo normal). EOS designa los resultados del análisis de muestras obtenidas “al final del estudio”.

30 La **Fig. 7B** es una gráfica de barras que representa el porcentaje de pacientes con SUHa que consiguen concentraciones de TNFR1 en suero normalizadas en línea basal (pretratamiento con eculizumab) y diversas semanas después del inicio del tratamiento con eculizumab.

35 La **Fig. 8A** es un diagrama de puntos que representa la concentración de cistatina C (CysC) (en ng/mg de creatina en orina) en la orina de pacientes con SUHa tanto antes del tratamiento con eculizumab (Pre-Tx) como diversas semanas después del inicio del tratamiento con eculizumab. También se midió la concentración de CysC en orina en la orina de individuos normales, sanos (NORM).

40 La **Fig. 8B** es un diagrama de puntos que representa la concentración de β 2M (en μ g/mg de creatina en orina) en la orina de pacientes con SUHa tanto antes del tratamiento con eculizumab (Pre-Tx) como diversas semanas después del inicio del tratamiento con eculizumab. También se midió la concentración de β 2M en orina en la orina de individuos normales, sanos (NORM).

45 La **Fig. 8C** es un diagrama de puntos que representa la concentración de NGAL (en ng/mg de creatina en orina) en la orina de pacientes con SUHa tanto antes del tratamiento con eculizumab (Pre-Tx) como diversas semanas después del inicio del tratamiento con eculizumab. También se midió la concentración de NGAL en orina en la orina de individuos normales, sanos (NORM).

50 Las **Figs. 9A-9E** son una serie de gráficas de barras que representan los niveles medios de varias proteínas biomarcadoras de SUHa en pacientes con SUHa que se sometieron a diálisis (diálisis), en comparación con los pacientes con SUHa que no se sometieron a diálisis (sin diálisis) antes de su inclusión en el estudio descrito en el presente documento. La Fig. 9A representa la concentración media de TNFR1 en suero (en pg/ml); la Fig. 9B representa la concentración media de β 2M en orina (en μ g/mg de creatina en orina); la Fig. 9C representa la concentración de Ba en plasma (en ng/ml); la Fig. 9D representa la concentración de sC5b9 en orina (en ng/mg de creatina en orina); y la Fig. 9E representa la concentración de C5a en orina (en ng/ml).

55 La **Fig. 10A** es un diagrama de puntos que representa la concentración de TNFR1 en suero (en pg/ml) en pacientes con SUHa que muestran parámetros clínicos estables (remisión clínica) (sin TMA) y los pacientes con SUHa que continúan experimentando niveles de haptoglobina y LDH elevados (y recuentos plaquetarios reducidos) (otros), tanto en línea basal como a las 1 a 2,5 semanas después del inicio del tratamiento con eculizumab. También se muestran las concentraciones de TNFR1 en suero de individuos normales, sanos (Normales).

Las **Figs. 10B-10E** son una serie de gráficas de barras, que representan cada una la concentración de un biomarcador dado en pacientes con marcadores hematológicos normales LDH y haptoglobina ("pacientes normales" o pacientes que se considera que están en remisión clínica), pacientes con marcadores hematológicos anómalos (elevados) ("pacientes anómalos" o pacientes con presentación de SUHa activa) y sujetos sanos ("normales"). La Fig. 10B representa los niveles de Ba en plasma (ng/ml) en estas poblaciones de sujetos. La Fig. 10C representa el nivel de VCAM-1 en suero (ng/ml) en las poblaciones de sujetos. La Fig. 10E representa el nivel de fragmentos de protrombina 1+2 en plasma (pmol/l) en las poblaciones y la Fig. 10D representa el nivel de D-dímero en plasma (en µg/l). Los P valores para las comparaciones de grupos respectivos se muestran en las figuras.

Las **Figs. 10F-10I** son una serie de gráficas de barras, que representan cada una la concentración de un biomarcador dado en pacientes con niveles plaquetarios normales ("pacientes normales"), pacientes con niveles plaquetarios anómalos (reducidos) (pacientes anómalos"), y sujetos sanos ("normales"). La Fig. 10F representa los niveles de Ba en plasma (ng/ml) en estas poblaciones de sujetos. La Fig. 10G representa el nivel de VCAM-1 en suero (ng/ml) en las poblaciones de sujetos. La Fig. 10I representa el nivel de fragmentos de protrombina 1+2 en plasma (pmol/l) en las poblaciones y la Fig. 10H representa el nivel de D-dímero en plasma (en µg/l). Los P valores para las comparaciones de grupos respectivas se muestran en las figuras.

La **Fig. 11** es una gráfica de barras que representa el porcentaje medio de cambio de los niveles de TNFR1 en suero y clusterina, C5a y C5b9 en orina en los pacientes con SUHa que consiguen una respuesta de TMA completa y los pacientes que aún experimentan acontecimientos de TMA (respuesta incompleta). (Como se ha observado y elaborado en los ejemplos de trabajo, una respuesta de TMA completa se refiere a una normalización de parámetros hematológicos y conservación de la función renal.)

La **Fig. 12** es una gráfica de barras que representa el porcentaje medio de cambio de los niveles de Ba en plasma en pacientes con SUHa tratados con eculizumab que experimentan una respuesta de TMA completa y los pacientes con SUHa tratados con eculizumab que no (otros).

La **Fig. 13** es una gráfica de barras que representa el cambio medio desde la línea basal (visita inicial, antes del tratamiento con eculizumab) en el recuento plaquetario ($10^9/l$) en las semanas 12-17 y la semana 26 después del inicio del tratamiento con eculizumab en pacientes con SUHa con niveles normalizados de Ba en plasma frente a niveles de BA en plasma persistentemente elevados. Los p valores para cada observación también se proporcionan en la figura.

Las **Figs. 14A-14D** son una serie de gráficas de barras que representan la observación de que ciertos biomarcadores asociados con SUHa están elevados en pacientes con SUHa con marcadores de TMA anómalos en línea basal. La Fig. 14A representa la concentración de cistatina C (CysC) (en ng/mg de creatina en orina) en la orina de pacientes con SUHa con recuentos plaquetarios normales (> 150.000 por µl de sangre) en comparación con pacientes con recuentos plaquetarios reducidos (< 150.000 por µl de sangre). La Fig. 14B representa la concentración de clusterina (en ng/mg de creatina en orina) en la orina de pacientes con SUHa con recuentos plaquetarios normales (> 150.000 por µl de sangre) en comparación con pacientes con recuentos plaquetarios reducidos (< 150.000 por µl de sangre). La Fig. 14C representa la concentración de VCAM-1 en el suero de pacientes con SUHa con niveles de LDH normales en comparación con pacientes con niveles de LDH elevados. La Fig. 14D representa la concentración de d-dímero (en µg/l) en el plasma de pacientes con SUHa con niveles de LDH normales en comparación con pacientes con niveles de LDH elevados. Los p valores para cada observación se indican en las figuras.

La **Fig. 15** es una gráfica de barras que representa el nivel de cistatina C (ng/mg de creatina en orina) en la orina de pacientes con SUHa en línea basal que tienen terapia de plasma repetida (PT repetida; N = 23), sin terapia de plasma (sin PT; N = 3) o en pacientes normales (N = 9).

La **Fig. 16** es una serie de gráficas de barras que representan el cambio medio de eGFR de línea basal ($ml/min/1,73 m^2$) en pacientes con SUHa que consiguen niveles normalizados de diversos biomarcadores (Ba en plasma, VCAM-1 en suero, F1+2 en plasma, d-dímero en plasma y cistatina C en orina) después del tratamiento con eculizumab en comparación con pacientes con SUHa en los que la concentración de estos biomarcadores permanece elevada.

Las **Figs. 17A-E** son una serie de gráficas de barras que representan la observación de que ciertos biomarcadores asociados con SUHa están elevados en pacientes con SUHa antes de tratamiento con un inhibidor del complemento, independientemente de si los pacientes han recibido terapia de intercambio de plasma (PE) o infusión de plasma (PI). La Fig. 17A representa la concentración del fragmento proteolítico de factor B Ba (en ng/ml) en el plasma de voluntarios sanos normales (VSN), pacientes con SUHa que reciben terapia de PE o PI (PE/PI) o pacientes con SUHa que no reciben terapia de PE/PI (sin PE/PI). La Fig. 17B representa la concentración de sTNFR1 (en pg/ml) en el suero de voluntarios sanos normales (VSN), pacientes con SUHa que reciben terapia de PE o PI (PE/PI), o pacientes con SUHa que no reciben terapia de PE/PI (no PE/PI). La Fig. 17C representa la concentración de sVCAM-1 (en ng/ml) en el suero de voluntarios sanos

normales (VSN), pacientes con SUHa que reciben terapia de PE o PI (PE/PI) o pacientes con SUHa que no reciben terapia de PE/PI (sin PE/PI). La Fig. 17D representa la concentración de D-dímero (en $\mu\text{g/L}$) en el plasma de voluntarios sanos normales (VSN), pacientes con SUHa que reciben terapia de PE o PI (PE/PI) o pacientes con SUHa que no reciben terapia de PE/PI (sin PE/PI). La Fig. 17E representa la concentración de cistatina-C (en ng/mg de creatinina en orina) en la orina de voluntarios sanos normales (VSN), pacientes con SUHa que reciben terapia de PE o PI (PE/PI) o pacientes con SUHa que no reciben terapia de PE/PI (sin PE/PI). Los p valores para cada observación se indican en las figuras.

Las **Figs. 18A-E** son una serie de gráficas de barras que representan la observación de que ciertos biomarcadores asociados con SUHa están elevados en pacientes con SUHa antes del tratamiento con un inhibidor del complemento, independientemente de los niveles plaquetarios en los pacientes. La Fig. 18A representa la concentración del fragmento proteolítico de factor B Ba (en ng/ml) en el plasma de voluntarios sanos normales (VSN), pacientes con SUHa que tienen niveles plaquetarios normales ($> 150 \times 10^9$) o pacientes con SUHa que tienen recuentos plaquetarios reducidos ($< 150 \times 10^9$). La Fig. 18B representa la concentración de sTNFR1 (en pg/ml) en el suero de voluntarios sanos normales (VSN), pacientes con SUHa que tienen niveles plaquetarios normales ($> 150 \times 10^9$) o pacientes con SUHa que tienen recuentos plaquetarios reducidos ($< 150 \times 10^9$). La Fig. 18C representa la concentración de sVCAM-1 (en ng/ml) en el suero de voluntarios sanos normales (VSN), pacientes con SUHa que tienen niveles plaquetarios normales ($> 150 \times 10^9$) o pacientes con SUHa que tienen recuentos plaquetarios reducidos ($< 150 \times 10^9$). La Fig. 18D representa la concentración de D-dímero (en $\mu\text{g/l}$) en el plasma de voluntarios sanos normales (VSN), pacientes con SUHa que tienen niveles plaquetarios normales ($> 150 \times 10^9$) o pacientes con SUHa que tienen recuentos plaquetarios reducidos ($< 150 \times 10^9$). La Fig. 18E representa la concentración de cistatina-C (en ng/mg de creatinina en orina) en la orina de voluntarios sanos normales (VSN), pacientes con SUHa que tienen niveles plaquetarios normales ($> 150 \times 10^9$) o pacientes con SUHa que tienen recuentos plaquetarios reducidos ($< 150 \times 10^9$). Los p valores para cada observación se indican en las figuras.

Las **Figs. 19A-E** son una serie de gráficas de barras que representan la observación de que ciertos biomarcadores asociados con SUHa están elevados en pacientes con SUHa antes del tratamiento con un inhibidor del complemento, independientemente de los niveles de haptoglobina (Hp) o lactato deshidrogenasa (LDH). La Fig. 19A representa la concentración del fragmento proteolítico del factor B Ba (en ng/ml) en el plasma de voluntarios sanos normales (VSN), pacientes con SUHa que tienen niveles de Hp y LDH normales, o pacientes con SUHa que tienen Hp/LDH elevado (anómalo). La Fig. 19B representa la concentración de sTNFR1 (en pg/ml) en el suero de voluntarios sanos normales (VSN), pacientes con SUHa que tienen niveles de Hp y LDH normales, o pacientes con SUHa que tienen Hp/LDH elevado (anómalo). La Fig. 19C representa la concentración de sVCAM-1 (en ng/ml) en el suero de voluntarios sanos normales (VSN), pacientes con SUHa que tienen niveles de Hp y LDH normales, o pacientes con SUHa que tienen Hp/LDH elevado (anómalo). La Fig. 19D representa la concentración de D-dímero (en $\mu\text{g/l}$) en el plasma de voluntarios sanos normales (VSN), pacientes con SUHa que tienen niveles de Hp y LDH normales, o pacientes con SUHa que tienen Hp/LDH elevado (anómalo). La Fig. 19E representa la concentración de cistatina-C (en ng/mg de creatinina en orina) en la orina de voluntarios sanos normales (VSN), pacientes con SUHa que tienen niveles de Hp y LDH normales, o pacientes con SUHa que tienen Hp/LDH elevado (anómalo). Los p valores para cada observación se indican en las figuras.

Las **Figs. 20A-B** son diagramas de caja-bigotes que representan los efectos longitudinales del tratamiento con eculizumab sostenido en la activación del complemento terminal en pacientes con SUHa. La Fig. 20A representa el cambio a lo largo del tiempo en la concentración de C5a en orina (ng/mg de creatinina en orina) de pacientes con SUHa después del tratamiento con eculizumab, en comparación con la concentración de C5a en orina en la orina de voluntarios sanos normales (VSN). La Fig. 20B representa el cambio a lo largo del tiempo en la concentración de sC5b-9 en orina (ng/mg de creatinina en orina) de pacientes con SUHa después del tratamiento con eculizumab, en comparación con la concentración de sC5b-9 en orina en la orina de voluntarios sanos normales (VSN). Los diagramas de caja-bigotes muestran la mediana, los percentiles 25 y 75 y el intervalo. *El primer punto temporal en el que los niveles se redujeron significativamente frente a la línea basal (LB); los P valores frente a la línea basal en cada punto temporal se calcularon usando un enfoque de medidas repetidas basadas en máxima probabilidad restringido (modelo mixto). Los P valores en comparación con VSN se calcularon usando el ensayo de suma de rangos de Wilcoxon.

Las **Figs. 21A-C** son diagramas de caja-bigotes que representan los efectos longitudinales del tratamiento con eculizumab sostenido en la concentración de proteínas biomarcadoras asociadas con lesión renal en pacientes con SUHa. La Fig. 20A representa el cambio a lo largo del tiempo en la concentración de FABP-1 en orina (ng/mg de creatinina en orina) de pacientes con SUHa después del tratamiento con eculizumab, en comparación con la concentración de FABP-1 en orina en la orina de voluntarios sanos normales (VSN). La Fig. 21B representa el cambio a lo largo del tiempo en la concentración de cistatina C en orina (ng/mg de creatinina en orina) de pacientes con SUHa después del tratamiento con eculizumab, en comparación con la concentración de cistatina C en orina en la orina de voluntarios sanos normales (VSN). La Fig. 21C representa el cambio a lo largo del tiempo en la concentración de clusterina en orina (ng/mg de creatinina en orina) de pacientes con SUHa después del tratamiento con eculizumab, en comparación con la concentración de clusterina en orina en la orina

de voluntarios sanos normales (VSN). Los diagramas de caja-bigotes muestran la mediana, los percentiles 25 y 75 y el intervalo. *El primer punto temporal en el que los niveles se redujeron significativamente frente a la línea basal (LB); los P valores frente a la línea basal en cada punto temporal se calcularon usando un enfoque de medidas repetidas basadas en máxima probabilidad restringido (modelo mixto). Los P valores en comparación con VSN se calcularon usando el ensayo de suma de rangos de Wilcoxon.

La **Fig. 22** es un diagrama de caja-bigotes que representa los efectos longitudinales del tratamiento con eculizumab sostenido en la activación de la ruta alternativa del complemento en pacientes con SUHa. El cambio a lo largo del tiempo en la concentración de Ba (ng/ml) en el plasma de pacientes con SUHa después del tratamiento con eculizumab se muestra junto con la concentración de Ba en plasma en voluntarios sanos normales (VSN). El diagrama de caja-bigotes muestra la mediana, los percentiles 25 y 75 y el intervalo. *El primer punto temporal en el que los niveles se redujeron significativamente frente a la línea basal (LB); los P valores frente a la línea basal en cada punto temporal se calcularon usando un enfoque de medidas repetidas basado en máxima probabilidad restringido (modelo mixto). Los P valores en comparación con VSN se calcularon usando el ensayo de suma de rangos de Wilcoxon.

Las **Figs. 23A-C** son diagramas de caja-bigotes que representan los efectos longitudinales del tratamiento con eculizumab sostenido en la concentración de proteínas biomarcadoras asociadas con inflamación, activación de células endoteliales y daño tisular en pacientes con SUHa. La Fig. 23A representa el cambio a lo largo del tiempo en la concentración de sTNFR1 (pg/ml) en el suero de pacientes con SUHa después del tratamiento con eculizumab, en comparación con la concentración de sTNFR1 en el suero de voluntarios sanos normales (VSN). La Fig. 23B representa el cambio a lo largo del tiempo en la concentración de sVCAM-1 (ng/ml) en el suero de pacientes con SUHa después del tratamiento con eculizumab, en comparación con la concentración del analito en el suero de voluntarios sanos normales (VSN). La Fig. 23C representa el cambio a lo largo del tiempo en la concentración de trombomodulina (ng/ml) en el plasma de pacientes con SUHa después del tratamiento con eculizumab, en comparación con la concentración del analito en el plasma de voluntarios sanos normales (VSN). Los diagramas de caja-bigotes muestran la mediana, los percentiles 25 y 75 y el intervalo. *El primer punto temporal en el que los niveles se redujeron significativamente frente a la línea basal (LB); los P valores frente a la línea basal en cada punto temporal se calcularon usando un enfoque de medidas repetidas basado en máxima probabilidad restringido (modelo mixto). Los P valores en comparación con VSN se calcularon usando el ensayo de suma de rangos de Wilcoxon.

Las **Figs. 24A-B** son diagramas de caja-bigotes que representan los efectos longitudinales del tratamiento con eculizumab sostenido en la concentración de proteínas biomarcadoras asociadas con la trombosis y coagulación en pacientes con SUHa. La Fig. 24A representa el cambio a lo largo del tiempo en la concentración de F1+2 (pmol/l) en el plasma de pacientes con SUHa después del tratamiento con eculizumab, en comparación con la concentración del analito en el plasma de voluntarios sanos normales (VSN). La Fig. 24B representa el cambio a lo largo del tiempo en la concentración de D-dímero (mg/l) en el plasma de pacientes con SUHa después del tratamiento con eculizumab, en comparación con la concentración del analito en el plasma de voluntarios sanos normales (VSN). Los diagramas de caja-bigotes muestran la mediana, los percentiles 25 y 75 y el intervalo. *El primer punto temporal en el que los niveles se redujeron significativamente frente a la línea basal (LB); los P valores frente a la línea basal en cada punto temporal se calcularon usando un enfoque de medidas repetidas basadas en máxima probabilidad restringido (modelo mixto). Los P valores en comparación con VSN se calcularon usando el ensayo de suma de rangos de Wilcoxon.

Visión de conjunto del sistema del complemento

El sistema de complemento actúa junto con otros sistemas inmunológicos del cuerpo para defender contra la intrusión de patógenos celulares y víricos. Hay al menos 25 proteínas del complemento, que se encuentran como una colección compleja de proteínas del plasma y cofactores de membrana. Las proteínas del plasma componen aproximadamente el 10 % de las globulinas en el suero de vertebrados. Los componentes del complemento consiguen sus funciones defensivas inmunitarias interaccionando en una serie de acontecimientos de unión a membrana y escisión enzimática intrincados pero precisos. La cascada del complemento resultante conduce a la producción de productos con funciones opsónicas, inmunorreguladoras y líticas. Se proporciona un sumario conciso de las actividades biológicas asociadas con la activación del complemento, por ejemplo, en The Merck Manual, 16ª edición.

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

La ruta clásica (RC) se inicia típicamente por el reconocimiento por parte de los anticuerpos de, y unión a, un sitio antigénico en una célula diana. La ruta alternativa (RA) puede ser independiente de anticuerpo, y puede iniciarse por ciertas moléculas en superficies de patógenos. Adicionalmente, la ruta de lectina se inicia típicamente con la unión de lectina de unión a manosa (LUM) con sustratos de alta manosa. Estas rutas convergen en el punto en el que el componente del complemento C3 se escinde por una proteasa activa para producir C3a y C3b. Otras rutas que

activan el ataque al complemento pueden actuar posteriormente en la secuencia de acontecimientos que conducen a diversos aspectos de la función del complemento. C3a es una anafilatoxina. C3b se une con células bacterianas y otras, así como con ciertos virus y complejos inmunitarios, y los marca para retirada de la circulación. Esta función opsonica de C3b se considera en general la acción antiinfecciosa más importante del sistema del complemento. C3b también forma un complejo con otros componentes únicos de cada ruta para formar convertasa C5 clásica o alternativa, que escinde el componente del complemento C5 (denominado en lo sucesivo en el presente documento "C5") en C5a y C5b.

La escisión de C5 libera especies biológicamente activas tales como C5a, una potente anafilatoxina y factor quimiotáctico y C5b que mediante una serie de interacciones proteicas conduce a la formación del complejo del complemento terminal lítico, C5b-9. C5a y C5b-9 también tienen propiedades activadoras de células pleiotrópicas, amplificando la liberación de factores inflamatorios corriente abajo, tales como enzimas hidrolíticas, especies de oxígeno reactivas, metabolitos de ácido araquidónico y diversas citocinas.

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

Como se ha mencionado anteriormente, C3a y C5a son componentes de complemento activados. Estos pueden desencadenar desgranulación de mastocitos, que libera histamina de basófilos y mastocitos, y otros mediadores de la inflamación, dando como resultado contracción del músculo liso, aumento de la permeabilidad vascular, activación de leucocitos y otros fenómenos inflamatorios incluyendo proliferación celular que da como resultado hiperplasia. C5a también actúa como un péptido quimiotáctico que actúa para atraer granulocitos proinflamatorios al sitio de activación del complemento. Se encuentran receptores de C5a en las superficies de células epiteliales bronquiales y alveolares y células del músculo liso bronquiales. También se han descubierto receptores de C5a en eosinófilos, mastocitos, monocitos, neutrófilos y linfocitos activados.

Descripción detallada

Como se ha descrito en el presente documento y se ejemplifica en los ejemplos de trabajo, los inventores han identificado biomarcadores para SUHa. Por ejemplo, se ha descubierto que una concentración elevada o, en algunos casos, reducida de ciertas proteínas está asociada con la presencia de SUHa. De forma similar, una concentración (o actividad) elevada o reducida de ciertas proteínas en un líquido biológico obtenido de un paciente con SUHa tratado con un inhibidor del complemento indica que el paciente ha respondido a la terapia con el inhibidor. En consecuencia, el análisis de la concentración y/o el nivel de actividad de dichas proteínas puede emplearse para evaluar, entre otras cosas, el riesgo de SUHa, diagnóstico de SUHa, supervisión de la progresión o reducción de SUHa, y/o supervisión de la respuesta al tratamiento a un inhibidor del complemento.

Proteínas biomarcadoras de SUHa y aplicaciones

Se exponen proteínas biomarcadoras de SUHa (así como líquidos biológicos ejemplares en los que se encuentran) en la Tabla 1. La secuencia proteica asociada con el nombre de cada uno de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 en GenBank (Centro Nacional Para la Información Biotecnológica (NCBI)) está disponible en la fecha de presentación de la presente solicitud.

Tabla 1.

Biomarcador	Abr.	Fuente tisular			Seq no. de referencia del NCBI*
		Suero	Plasma	Orina	
Marcadores de inflamación/activación de plaquetas o endotelial					
Ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 9	CXCL9	X			NP_002407.1
Ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 10	CXCL-10	X			NP_001556.2
Interleucina-1 beta	IL-1β	X			NP_000567.1
Interleucina-6	IL-6	X			NP_000591.1
Interleucina-8	IL-8	X			NP_000575.1
Interleucina-12 p70	IL-12p70	X			NP_000873.2 (p35) NP_002178.2 (p40)
Interferón-gamma	IFN-γ	X			NP_000610.2
Selectina de plaquetas	p-selectina	X			NP_002996.2

Biomarcador	Abr.	Fuente tisular			Seq no. de referencia del NCBI*
		Suero	Plasma	Orina	
Selectina endotelial	e-selectina	X			NP_000441.2
Molécula de adhesión intercelular 1	ICAM-1	X			NP_000192.2
Molécula de adhesión de células vasculares 1	VCAM-1	X			NP_001069.1
Proteína quimiotáctica de monocitos 1	MCP-1	X			NP_002973.1
Factor de crecimiento endotelial vascular	VEGF	X			NP_001020537.2
Regulado en activación, expresado en linfocitos T normales y secretado (CCL5)	CCL5	X			NP_002976.2
Ligando de CD40 soluble	sCD40L	X			NP_000065.1**
Receptor de factor de necrosis tumoral soluble 1	sTNFR1	X			NP_001056.1**
Interleucina-18	IL-18	X			NP_001553.1
Marcadores de inflamación/lesión renal					
Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos	NGAL			X	NP_005555.2
Molécula de lesión renal 1	KIM-1			X	NP_001092884.1
Osteopontina	OPN			X	NP_001035147.1
Inhibidor tisular de metaloproteinasas 1	TIMP-1			X	NP_003245.1
Interleucina-18	IL-18			X	Mencionado anteriormente
Ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 9	CXCL9			X	Mencionado anteriormente
Ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 10	CXCL10			X	Mencionado anteriormente
Clusterina	CLU			X	NP_001822.3
Cistatina C	CyC			X	NP_000090.1
Albúmina	ALB			X	NP_000468.1
Proteína de unión a ácidos grasos del hígado	L-FABP			X	NP_001434.1
Microglobulina beta 2	β2M			X	NP_004039.1
Factor de trébol 3	TFF-3			X	NP_003217.3
N-acetil-beta-D-glucosaminidasa	NAG			X	NP_000511.2
π-glutación S-transferasa	%-GST			X	NP_000843.1
Alfa-glutación S-transferasa	α-GST			X	NP_665683.1
Complemento					
Complemento Ba	Ba		X		SEQ ID NO: 1; Véase, también Fig. 2 de Morley y Campbell (1984) EMBO J 3(1): 153-157.
Complemento C3a	C3a		X		SEQ ID NO :2
Complemento C5a	C5a		X	X	SEQ ID NO: 3
CAM soluble	sC5b9		X	X	ND
CH ₅₀ (hemólisis)	CH50	X			ND
Complemento C5	C5	X	X		NP_001726.2
Trombosis/coagulación					
D-dímero	D-dímero		X		P02671***
Protrombina F1+2	F1+2		X		El fragmento de activación 1 (SEQ ID NO: 4) corresponde a los aminoácidos 44-198 de SEQ ID NO: 6. El fragmento de activación 2 (SEQ ID NO: 5) corresponde a los aminoácidos 199-327 de SEQ ID NO: 4.
Factor de Von Willebrand	vWF		X		NP_000543.2
Actividad de factor de Von Willebrand	actividad de vWF		X		Misma referencia
Trombomodulina	TM		X		NP_000352.1

Biomarcador	Abr.	Fuente tisular			Seq no. de referencia del NCBI*
		Suero	Plasma	Orina	
<p>* El número de referencia de NCBI para una secuencia humana ejemplar se proporciona para cada proteína biomarcadora enumerada en la Tabla.</p> <p>** La forma soluble del receptor se genera por procesamiento proteolítico de la forma unida a membrana del receptor.</p> <p>*** Designación UniProtKB (consorcio: Instituto de Bioinformática Europeo, Cambridge, Reino Unido; Instituto Suizo de Bioinformática; Ginebra, Suiza; y Servicio de Información de Proteínas, Washington, D.C.) para fibrinógeno alfa humano, que se escinde por trombina para formar fibrina. D-dímero es un producto de degradación de fibrina. Se expone una descripción de la transición basada en escisión de fibrinógeno a fibrina a D-dímero en Soheir <i>et al.</i> (2009) Blood 113(13): 2878-2887.</p>					

5 Los biomarcadores proporcionados en el presente documento pueden usarse solos o en combinación como un indicador para, por ejemplo, evaluar el riesgo de desarrollar SUHa, diagnosticar SUHa, determinar si un sujeto está experimentando la primera presentación aguda de SUHa, supervisar la progresión o la reducción de SUHa, y/o supervisar la respuesta a tratamiento con un inhibidor del complemento u optimizar dicho tratamiento. En algunas realizaciones, puede usarse una proteína biomarcadora de SUHa individual descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, pueden usarse al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,22, 23, 24 o 25 o más) proteínas biomarcadoras de SUHa de la Tabla 1 en combinación como un panel.

10 En algunas realizaciones, las proteínas biomarcadoras de SUHa se seleccionan de un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B (por ejemplo, Ba o Bb), C5b9 soluble (sC5b9), trombomodulina, VCAM-1, factor de von Willebrand (vWF), ligando de CD40 soluble (sCD40L), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, CXCL10, MCP-1, sTNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1 beta, IL-12 p70, componente del complemento C5a, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), IL-6, albúmina, IL-8 e incluyen sTNFR1. Pueden medirse la concentración y/o actividad de uno o más de los biomarcadores en la Tabla 1 (o cualquiera de los subconjuntos de biomarcadores mencionados en el presente documento).

20 En algunas realizaciones, un aumento de la concentración de d-dímero, en relación con la concentración de d-dímero en una muestra de control normal, y un aumento de la concentración de FABP-1, en relación con la concentración de FABP-1 en una muestra de control normal, indica que el paciente con SUHa experimenta una primera manifestación de SUHa aguda. En algunos casos, ese aumento de una o ambas de estas proteínas biomarcadoras de SUHa es un aumento significativo en comparación con el control normal.

25 En algunas realizaciones, un aumento en la concentración de uno o más de sTNFR1, Ba, C5b-9, F1+2, β 2M, clusterina, TIMP-1, NGAL, CysC y C5a (véase Tabla 7) en una muestra biológica obtenida de un paciente con SUHa, en relación con la concentración de control de los analitos obtenidos, por ejemplo, de un grupo de muestras de pacientes con SUHa que no han recibido diálisis repetida, indica que el paciente es uno que ha recibido diálisis repetida.

35 En algunas realizaciones, un aumento en la concentración de uno o ambos de C5a y FABP-1 (por ejemplo, C5a y FABP-1 en orina) en una muestra biológica obtenida de un paciente con SUHa, en relación con la concentración de control de los analitos obtenidos, por ejemplo, de un grupo de muestras de pacientes con SUHa que no han recibido un trasplante de riñón, indica que el paciente es uno que ha recibido un trasplante de riñón.

40 En algunas realizaciones, un aumento en la concentración de cistatina C (por ejemplo, cistatina C en orina) en una muestra biológica obtenida de un paciente con SUHa, en relación con la concentración de control de los analitos obtenidos, por ejemplo, de un grupo de muestras de pacientes con SUHa que no han recibido terapia de plasma repetida, indica que el paciente es uno que ha recibido terapia de plasma repetida.

45 En algunas realizaciones, una reducción después del tratamiento de la concentración de Ba (por ejemplo, concentración de Ba en plasma) de al menos 10 (por ejemplo, al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50) %, en relación con la concentración de Ba en una muestra del mismo tipo de fluido biológico obtenido del sujeto antes del tratamiento, indica que el sujeto tiene o es probable que consiga una respuesta de trombomicroangiopatía (TMA) completa (es decir, cese de acontecimientos de TMA). En algunas realizaciones, la reducción se produce a la semana 12 después del primer tratamiento con el inhibidor del complemento. En algunas realizaciones, la reducción se produce en las semanas 12-17 después del primer tratamiento con el inhibidor del complemento. En algunas realizaciones, la reducción se produce a la semana 26 después del primer tratamiento con el inhibidor del complemento.

55 En algunas realizaciones, una reducción después del tratamiento en uno o ambos de CCL5 y sCD40L de al menos 10 (por ejemplo, al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50) %, en relación con la concentración respectiva en una muestra o muestras del mismo tipo de líquido biológico obtenido del sujeto antes del tratamiento, indica que el sujeto tiene o es probable que consiga recuentos plaquetarios aumentados (por ejemplo, recuperación plaquetaria). En

5 algunas realizaciones, una reducción después del tratamiento de la concentración de Ba (por ejemplo, concentración de Ba en plasma) de al menos 10 (por ejemplo, al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50) % (o normalización de las concentraciones de Ba), en relación con la concentración de Ba en una muestra del mismo tipo de líquido biológico obtenido del sujeto antes del tratamiento, indica que el sujeto tiene o es probable que haya conseguido una respuesta de trombomicroangiopatía (TMA) completa (es decir, cese de acontecimientos de TMA).

10 En algunas realizaciones, el estado de uno o más de los biomarcadores de SUHa descritos en el presente documento puede ser predictivo de mejora en la tasa de filtración glomerular estimada (eGFR) para un paciente con SUHa tratado con un inhibidor del complemento. Por ejemplo, una reducción de la concentración de protrombina F1+2 (por ejemplo, en 4, 5 o 6 semanas después del tratamiento inicial en un régimen de tratamiento crónico) y/o d-
 15 dímero (por ejemplo, en 12, 13, 14, 15, 16 o 17 semanas después del tratamiento inicial en un régimen de tratamiento crónico) indica que un paciente con SUHa tratado con un inhibidor del complemento ha conseguido o es probable que consiga una mejora clínicamente significativa en eGFR. La consecución o probable consecución de una mejora clínicamente significativa en eGFR también está indicada por una normalización de la concentración de IL-6 e IFN- γ (por ejemplo, en 4, 5 o 6 semanas después del tratamiento inicial con un inhibidor del complemento en un régimen de tratamiento crónico). La consecución o probable consecución de una mejora clínicamente significativa de eGFR también está indicada por una normalización de la concentración de Ba, CXCL9, CXCL10 y vWF (por ejemplo, en 12, 13, 14, 15, 16 o 17 semanas después del tratamiento inicial con un inhibidor del complemento en un régimen de tratamiento crónico). En algunas realizaciones, la consecución o probable consecución de una mejora clínicamente significativa de eGFR también está indicada por una normalización de la concentración de Ba, CXCL9, CXCL10 β 2M (por ejemplo, en orina), CysC (por ejemplo, en orina), vWF, d-
 20 dímero, clusterina (por ejemplo, en orina) y/o FABP-1 (por ejemplo, en orina) (por ejemplo, en 26 semanas después del tratamiento inicial con un inhibidor del complemento en un régimen de tratamiento crónico).

25 Los métodos para supervisar o evaluar el estado de una o más proteínas biomarcadoras asociadas con síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa) en un sujeto (por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano) incluyen: medir en un líquido biológico obtenido del sujeto uno o ambos de (i) la concentración de al menos una (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) proteína biomarcadora asociada con SUHa en el líquido biológico.

30 Puede realizarse medición o determinación de los niveles de expresión de proteínas en una muestra biológica por cualquier método adecuado (véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY). En general, los niveles de proteína se determinan poniendo en contacto una muestra biológica obtenida de un sujeto con agentes de unión para una o más de las proteínas biomarcadoras de SUHa; detectando, en la muestra (por ejemplo, el líquido biológico), los niveles de una o más de las proteínas biomarcadoras de SUHa que se unen con los agentes de unión; y comparando los niveles de una o más de las proteínas biomarcadoras de SUHa en la muestra con los niveles de los biomarcadores proteicos correspondientes en una muestra de control (por ejemplo, una muestra normal). En ciertas realizaciones, un agente de unión adecuado es un ribosoma, con o sin un componente peptídico, una molécula de ARN o un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia polipeptídica de un marcador proteico, una variante peptídica del mismo o un mimético no peptídico de dicha secuencia).

45 Los agentes de unión adecuados también incluyen un anticuerpo específico para una proteína biomarcadora de SUHa descrita en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo específico para cualquier biomarcador enumerado en la Tabla 1). Los anticuerpos adecuados para uso en los métodos de la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales y fragmentos de unión a antígeno (por ejemplo, fragmentos Fab o scFvs) de anticuerpos. Pueden prepararse anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales y policlonales, fragmentos y quimeras, usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495-497; Kozbor *et al.* (1985) J Immunol Methods 81: 31-42; Cote *et al.* (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-203; y Zhang *et al.* (2002) J Biol Chem 277: 39379-39387). Los anticuerpos para usar en los métodos de la invención pueden purificarse por métodos bien conocidos en la técnica. También pueden obtenerse anticuerpos de fuentes comerciales.

55 En ciertas realizaciones, el agente de unión se marca directa o indirectamente con un resto detectable. El papel de un agente detectable es facilitar la etapa de detección del método de diagnóstico permitiendo la visualización del complejo formado por la unión del agente de unión con el marcador proteico (o fragmento del mismo). El agente detectable puede seleccionarse de modo que genera una señal que pueda medirse y cuya intensidad esté relacionada (preferentemente sea proporcional) con la cantidad de marcador proteico presente en la muestra que se analiza. Se conocen bien en la técnica métodos para marcar moléculas biológicas tales como polipéptidos y anticuerpos. Puede usarse cualquiera de una amplia diversidad de agentes detectables en la práctica de la presente invención. Los agentes detectables adecuados incluyen, pero sin limitación: diversos ligandos, radionúclidos, colorantes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, micropartículas (tales como, por ejemplo, puntos cuánticos, nanocristales, fósforos y similares), enzimas (tales como, por ejemplo, las usadas en un ELISA, es decir, peroxidasa de rábano rusticano, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores colorimétricos, marcadores magnéticos y biotina, digoxigenina u otros haptenos y proteínas para los que están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales.

En ciertas realizaciones, los agentes de unión (por ejemplo, anticuerpos) pueden inmovilizarse en un vehículo o soporte (por ejemplo, un perla, una partícula magnética, una partícula de látex, un pocillo de placa de microtitulación, una cubeta u otro vaso de reacción). Los ejemplos de materiales de vehículo o soporte adecuados incluyen agarosa, celulosa, nitrocelulosa, dextrano, Sephadex®, Sepharose®, liposomas, carboximetilcelulosa, poliacrilamidas, poliestireno, gabbros, papel de filtro, magnetita, resina de intercambio iónico, película de plástico, tubo de plástico, vidrio, copolímero de poliamina-metil vinil-éter-ácido maleico, copolímero de aminoácidos, copolímero de etileno-ácido maleico, nailon, seda y similares. Los agentes de unión pueden inmovilizarse indirectamente usando agentes de unión secundarios específicos para los primeros agentes de unión (por ejemplo, los anticuerpos de ratón específicos para los marcadores proteicos pueden inmovilizarse usando anticuerpo de oveja específico anti fragmento Fc IgG de ratón aplicado sobre el vehículo o soporte).

Los niveles de expresión de proteínas en una muestra biológica pueden determinarse usando inmunoensayos. Los ejemplos de dichos ensayos son inmunoensayos de fluorescencia resueltos a lo largo del tiempo (TR-FIA), radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos (por ejemplo, ELISA), inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, aglutinación de látex, hemaglutinación, transferencia de Western y ensayos histoquímicos, que son métodos convencionales bien conocidos en la técnica. Los métodos de detección y cuantificación de la señal generada por el complejo formado por unión del agente de unión con el marcador proteico dependerán de la naturaleza del ensayo y del resto detectable (por ejemplo, resto fluorescente).

En un ejemplo, la presencia o cantidad de expresión proteica de un gen (por ejemplo, una proteína biomarcadora de SUHa representada en la Tabla 1) puede determinarse usando una técnica de transferencia de Western. Por ejemplo, puede prepararse un lisado a partir de una muestra biológica, o la muestra biológica (por ejemplo, líquido biológico) en sí misma, puede ponerse en contacto con tampón de Laemmli y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Las proteínas resueltas por SDS-PAGE, separadas por tamaño, pueden transferirse a una membrana de filtro (por ejemplo, nitrocelulosa) y someterse a técnicas de inmunotransferencia usando un anticuerpo marcado de forma detectable específico para la proteína de interés. La presencia o cantidad de anticuerpo marcado de forma detectable unido indica la presencia o cantidad de proteína en la muestra biológica.

En otro ejemplo, puede usarse un inmunoensayo para detectar y/o medir la expresión proteica de una proteína biomarcadora de SUHa (por ejemplo, una representada en la Tabla 1). Como anteriormente, para fines de detección, puede realizarse un inmunoensayo con un anticuerpo que porta un resto de detección (por ejemplo, un agente fluorescente o una enzima). Pueden conjugarse proteínas de una muestra biológica directamente con una matriz de fase sólida (por ejemplo, una placa de ensayo multipocillo, nitrocelulosa, agarosa, Sepharose®, partículas codificadas o perlas magnéticas) o puede conjugarse con un primer miembro de un par de unión específico (por ejemplo, biotina o estreptavidina) que se une con una matriz de fase sólida tras la unión con un segundo miembro del par de unión específico (por ejemplo, estreptavidina o biotina). Dicha unión con una matriz de fase sólida permite que las proteínas se retiren por purificación de otros componentes interferentes o irrelevantes de la muestra biológica antes del contacto con el anticuerpo de detección y también permite el lavado posterior de anticuerpo no unido. Aquí, como anteriormente, la presencia o cantidad de anticuerpo marcado de forma detectable unido indica la presencia o cantidad de proteína en la muestra biológica.

Como alternativa, los niveles de expresión de proteínas pueden determinarse usando métodos basados en espectrometría de masas o métodos basados en captura de imágenes conocidos en la técnica para la detección de proteínas. Otros métodos adecuados incluyen electroforesis en gel bidimensional, métodos basados en proteómica, tales como la identificación de proteínas individuales recuperadas del gel (por ejemplo, por espectrometría de masas o secuenciación N terminal) y/o bioinformática.

Pueden realizarse, opcionalmente, métodos para detectar o medir la expresión proteica en formatos que permitan la preparación rápida, el procesamiento y análisis de múltiples muestras. Esto puede ser, por ejemplo, en placas de ensayo multipocillo (por ejemplo, 96 pocillos o 386 pocillos) o matrices (por ejemplo, microplacas proteicas). Pueden proporcionarse soluciones de reserva para diversos reactivos manualmente o robóticamente, y puede realizarse preparación de muestras, pipeteo, dilución, mezclado, distribución, lavado, incubación (por ejemplo, hibridación), lectura de muestras, recogida de datos (datos ópticos) y/o análisis (análisis de imágenes asistido por ordenador) posterior de forma robótica usando software de análisis, robótica e instrumentación de detección disponibles en el mercado capaces de detectar la señal generada a partir del ensayo. Los ejemplos de dichos detectores incluyen, pero sin limitación, espectrofotómetros, luminómetros, fluorímetros y dispositivos que miden la degradación radioisotópica. Los ensayos basados en células de alto rendimiento ejemplares (por ejemplo, detectar la presencia o el nivel de una proteína diana en una célula) pueden utilizar el Lector de VTI HCS ArrayScan® o tecnología Lectora de HCS KineticScan® (Cellomics Inc., Pittsburg, PA).

También se conocen en la técnica métodos para determinar la actividad de vWF y se describen en el presente documento (por ejemplo, los ejemplos de trabajo). Véase también, por ejemplo, Horvath *et al.* (2004) *Exp Clin Cardiol* 9 (10): 31-34. También están disponibles kits comerciales, Instrumentation Laboratory (Bedford, MA; número de catálogo: 0020004700) y Quest Diagnostics (Madison, NJ).

5 En algunas realizaciones, puede evaluarse y/o medirse el nivel de expresión (o actividad) de proteínas de al menos dos proteínas biomarcadoras de SUHa (por ejemplo, al menos tres proteínas, al menos cuatro proteínas, al menos cinco proteínas, al menos seis proteínas, al menos siete proteínas, al menos ocho proteínas, al menos nueve proteínas, al menos 10 proteínas, al menos 11 proteínas, al menos 12 proteínas, al menos 13 proteínas, al menos 14 proteínas, al menos 15 proteínas, al menos 16 proteínas, al menos 17 proteínas, al menos 18 proteínas, al menos 19 proteínas, al menos 20 proteínas, al menos 21 proteínas, al menos 22 proteínas, al menos 23 proteínas, o al menos 24 proteínas o más).

10 En algunas realizaciones, el líquido biológico en el que se miden las proteínas biomarcadoras de SUHa es la sangre. En algunas realizaciones, el líquido biológico es una fracción de sangre, por ejemplo, suero o plasma. En algunas realizaciones, el líquido biológico es orina. En algunas realizaciones, todas las mediciones se realizan en una muestra de líquido biológico (por ejemplo, una muestra de suero). En algunas realizaciones, se realizan mediciones en al menos dos líquidos biológicos diferentes obtenidos del sujeto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la concentración o actividad de una o más proteínas biomarcadoras de SUHa se mide en una muestra de suero
15 obtenida del paciente. En algunas realizaciones, están disponibles una muestra de sangre y una muestra de orina para permitir el ensayo de diferentes analitos en dos matrices de muestra diferentes.

20 El sujeto puede ser, por ejemplo, un ser humano que tenga, se sospeche que tiene o esté en riesgo de desarrollar SUHa. El sujeto puede ser uno que se ha tratado (o se está tratando) con un inhibidor del complemento (por ejemplo, un inhibidor del componente del complemento C5 tal como un anticuerpo anti C5). El tratamiento puede haberse producido menos de un mes (por ejemplo, menos de 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 días) antes de obtener la muestra del sujeto.

25 El método puede incluir además la etapa de determinar si el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar SUHa. Cuando el sujeto se haya tratado o se esté tratando con un inhibidor del complemento (por ejemplo, un anticuerpo anti C5) en un programa de dosificación predeterminado, el método puede incluir además determinar si el paciente es sensible (terapéuticamente) a la terapia inhibidora del complemento.

30 En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el método requiere registrar el valor o los valores medidos de la concentración de la al menos una proteína biomarcadora de SUHa. El registro puede ser escrito o en un medio leíble por ordenador. El método puede incluir también comunicar el valor o los valores medidos de la concentración de la al menos una proteína biomarcadora de SUHa al sujeto y/o a un practicante médico a cuyo cargo se haya puesto al sujeto.

35 En algunas realizaciones, cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede incluir la etapa de administrar al sujeto el inhibidor del complemento a una dosis mayor o con una frecuencia aumentada de dosificación, en relación con el programa de dosificación predeterminado, si el sujeto no es sensible al tratamiento con el inhibidor en el programa de dosificación predeterminado.

40 Algunos de los métodos descritos en el presente documento implican comparar la concentración o actividad medida de una proteína biomarcadora de SUHa (como se mide en una muestra biológica obtenida de un sujeto) con una muestra de control. En algunas realizaciones, se obtiene muestra de control del sujeto antes de administrar al sujeto un inhibidor del complemento (por ejemplo, un inhibidor de C5 tal como eculizumab). En algunas realizaciones, la muestra de control puede ser (o puede estar basada en), por ejemplo, una colección de muestras obtenidas de uno
45 o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 o más) individuos sanos a los que no se ha administrado un inhibidor del complemento. En algunas realizaciones, la muestra de control puede ser (o puede basarse en), por ejemplo, una muestra agrupada obtenida de dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 o más) individuos. En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, las muestras agrupadas pueden ser
50 de individuos sanos o, al menos, individuos que no tienen o no se sospecha que tengan (no estén en riesgo de desarrollar) SUHa. Por ejemplo, la determinación de si un sujeto es uno que tiene SUHa puede implicar comparar la concentración medida de uno o más biomarcadores de suero en el sujeto y comparar la concentración medida con la concentración promedio de los mismos biomarcadores en las muestras sanas agrupadas. De forma similar, la determinación de si la concentración o actividad de un biomarcador asociado con SUHa se ha reducido después del
55 tratamiento con un inhibidor del complemento puede implicar comparar la concentración o actividad de la proteína en un líquido biológico obtenido de un sujeto antes del tratamiento con un inhibidor del complemento con la concentración de proteína en una muestra del mismo líquido biológico obtenido del paciente después del tratamiento con el inhibidor (por ejemplo, un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, un mes, 6 semanas, dos meses o tres meses después del tratamiento (por ejemplo, el primero de una
60 serie de tratamientos en terapia crónica) con el inhibidor).

65 En algunas realizaciones, la determinación de si un inhibidor del complemento ha producido un efecto deseado (por ejemplo, una reducción en la concentración o actividad de una proteína biomarcadora de SUHa) en un ser humano puede realizarse investigando si la concentración postratamiento de la proteína queda dentro de un intervalo predeterminado indicativo de sensibilidad a un inhibidor del complemento por un ser humano. En algunas realizaciones, la determinación de si un inhibidor del complemento ha producido un efecto deseado en un ser

humano puede incluir investigar si la concentración postratamiento o actividad de una o más proteínas biomarcadoras de SUHa queda por encima o debajo de un valor de corte predeterminado. Un valor de corte es típicamente la concentración o actividad de una proteína dada en un líquido biológico dado por encima o por debajo del que se considera indicativo de un cierto fenotipo, por ejemplo, sensibilidad a terapia con un inhibidor del complemento.

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el mismo practicante puede administrar el inhibidor del complemento al sujeto antes de determinar si se ha producido un cambio en la concentración o actividad de una o más proteínas biomarcadoras de SUHa, mientras que en algunas realizaciones, el practicante que administra el inhibidor al sujeto es diferente del practicante que determina si se ha producido una respuesta en el sujeto. En algunas realizaciones, el practicante puede obtener una muestra biológica (por ejemplo, la muestra de sangre) del sujeto antes de administración del inhibidor. En algunas realizaciones, el practicante puede obtener una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre) del sujeto después de la administración del inhibidor al sujeto. En algunas realizaciones, la muestra postratamiento puede obtenerse del sujeto menos de 48 (por ejemplo, menos de 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, nueve, ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o incluso menos de una) horas después de la administración del inhibidor al sujeto. En algunas realizaciones, la muestra postratamiento puede obtenerse del sujeto menos de 20 (por ejemplo, menos de 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, nueve, ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o un) días después de la administración al sujeto del inhibidor. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene del sujeto no más de 20 (por ejemplo, no más de 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, nueve, ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o un) días después de administrarse el inhibidor al sujeto.

En algunas realizaciones, más de un practicante puede realizar diversas etapas de los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, un practicante puede analizar (por ejemplo, medir la concentración o actividad de una o más proteínas biomarcadoras de SUHa en) las muestras pre y postratamiento obtenidas del sujeto. Otro practicante puede recibir información con respecto al análisis de las muestras por el primer practicante para determinar de este modo si, por ejemplo, el sujeto ha respondido al tratamiento con un inhibidor del complemento. En algunas realizaciones, otro practicante más puede obtener una muestra biológica pretratamiento de un paciente y un cuarto practicante puede obtener una muestra biológica postratamiento del sujeto. En algunas realizaciones, todas las etapas se llevan a cabo por el mismo practicante.

Muestras biológicas y recogida de muestras

Las muestras biológicas adecuadas para uso en los métodos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, cualquier líquido biológico. Una muestra biológica puede ser, por ejemplo, una muestra de ensayo obtenida de un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano) o puede derivar de dicho sujeto. Una muestra biológica también puede ser un líquido biológico tal como orina, sangre completa o una fracción de la misma (por ejemplo, plasma o suero), saliva, semen, esputo, líquido cefalorraquídeo, lágrimas o moco. Una muestra biológica puede fraccionarse adicionalmente, si se desea, a una fracción que contiene analitos particulares (por ejemplo, proteínas) de interés. Por ejemplo, una muestra de sangre completa puede fraccionarse en suero o en fracciones que contengan tipos de proteínas particulares. Si se desea, una muestra biológica puede ser una combinación de diferentes muestras biológicas de un sujeto tal como una combinación de dos líquidos diferentes.

Las muestras biológicas adecuadas para la invención pueden ser muestras nuevas o congeladas recogidas de un sujeto, o muestras de archivo con diagnóstico, tratamiento y/o historial de resultados conocidos. Las muestras biológicas pueden obtenerse de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar, un trastorno asociado con el complemento tal como SUHa. Puede emplearse cualquier método adecuado para obtener las muestras biológicas, aunque los métodos ejemplares incluyen, por ejemplo, flebotomía, hisopo (por ejemplo, hisopo bucal), lavado o procedimiento de biopsia por aspirado con aguja fina. Las muestras biológicas también pueden obtenerse de médula ósea.

En algunas realizaciones, puede prepararse un extracto proteico a partir de una muestra biológica. En algunas realizaciones, un extracto de proteína contiene el contenido de proteína total. Se conocen bien en la técnica métodos de extracción de proteínas. Véase, por ejemplo, Roe (2001) "Protein Purification Techniques: A Practical Approach", 2ª Edición, Oxford University Press. Pueden usarse numerosos kits diferentes y versátiles para extraer proteínas de líquidos y tejidos corporales, y están disponibles en el mercado de, por ejemplo, BioRad Laboratories (Hercules, CA), BD Biosciences Clontech (Mountain View, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), Calbiochem (San Diego, CA), Pierce Biotechnology (Rockford, IL) e Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA).

Los expertos en la materia conocen bien métodos para obtener y/o almacenar muestras que conservan la actividad o integridad de células en la muestra biológica. Por ejemplo, una muestra biológica puede ponerse en contacto adicionalmente con uno o más agentes adicionales tales como tampones y/o inhibidores apropiados, incluyendo inhibidores de proteasa, los agentes que se pretende que conserven o minimicen cambios (por ejemplo, cambios en la osmolaridad o pH) en la estructura de proteínas. Dichos inhibidores incluyen, por ejemplo, quelantes, tales como ácido etilendiamin tetraacético (EDTA), ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), inhibidores de proteasa tales como

fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), aprotinina y leupeptina. Se describen tampones y condiciones apropiados para almacenar o manipular de otro modo células completas, por ejemplo, en Pollard y Walker (1997), "Basic Cell Culture Protocols," volumen 75 de Methods in molecular biology, Humana Press; Masters (2000) "Animal cell culture: a practical approach," volumen 232 de Practical approach series, Oxford University Press; y Jones (1996) "Human cell culture protocols," volumen 2 de Methods in molecular medicine, Humana Press.

Una muestra también puede procesarse para eliminar o minimizar la presencia de sustancias interferentes. Por ejemplo, una muestra biológica puede fraccionarse o purificarse para retirar uno o más materiales (por ejemplo, células) que no son de interés. Los métodos para fraccionar o purificar una muestra biológica incluyen, pero sin limitación, citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia y sedimentación.

Inhibidores del complemento

Puede utilizarse cualquier compuesto que se una con e inhiba, o inhiba de otro modo, la generación y/o actividad de cualquiera de los componentes del complemento humanos de acuerdo con la presente divulgación. Por ejemplo, un inhibidor del complemento puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico, un peptidomimético o una macromolécula que no sea un ácido nucleico o una proteína. Estos agentes incluyen, pero sin limitación, moléculas orgánicas pequeñas, aptámeros de ARN, aptámeros de ARN L, Spiegelmers, compuestos antisentido, ARN bicatenario, ARN de interferencia pequeño, inhibidores de ácido nucleico bloqueados e inhibidores de ácido nucleico peptídicos. En algunas realizaciones, un inhibidor del complemento puede ser una proteína o un fragmento proteico.

En algunas realizaciones, las composiciones contienen anticuerpos específicos de un componente del complemento humano. Algunos compuestos incluyen anticuerpos dirigidos contra los componentes del complemento C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, Factor D, Factor B, Factor P, MBL, MASP-1, MASP-2, properdina o un fragmento biológicamente activo de cualquiera de los anteriores, evitando de este modo la generación de la actividad anafilotóxica asociada con C5a y/o evitar el ensamblaje del complejo de ataque a membrana C5b-9.

Las composiciones también pueden contener formas de origen natural o solubles de compuestos inhibidores del complemento tales como CR1, LEX-CR1, MCP, DAF, CD59, factor H, factor de veneno de cobra, FUT-175, complestatina y K76 COOH. Otros compuestos que pueden utilizarse para unirse con o bloquear de otro modo la generación y/o actividad de cualquiera de los componentes del complemento humanos incluyen, pero sin limitación, proteínas, fragmentos proteicos, péptidos, moléculas pequeñas, aptámeros de ARN incluyendo ARC187 (que está disponible en el mercado de Archemix Corporation, Cambridge, MA), aptámeros de ARN-L, spiegelmers, compuestos antisentido, inhibidores de serina proteasa, moléculas que pueden utilizarse en interferencia de ARN (iARN) tales como ARN bicatenario incluyendo ARN de interferencia pequeño (ARNip), inhibidores de ácido nucleico bloqueado (LNA), inhibidores de ácido nucleico peptídico (PNA), etc.

En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento inhibe la activación del complemento. Por ejemplo, el inhibidor del complemento puede unirse con e inhibir la actividad de activación del complemento de C1 (por ejemplo, C1q, C1r o C1s) o el inhibidor del complemento puede unirse con e inhibir (por ejemplo, inhibir la escisión de) C2, C3 o C4. En algunas realizaciones, el inhibidor inhibe la formación o el ensamblaje de la C3 convertasa y/o C5 convertasa de las rutas alternativa y/o clásica del complemento. En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento inhibe la formación del complemento terminal, por ejemplo, formación del complejo de ataque a membrana C5b-9. Por ejemplo, un inhibidor del complemento de anticuerpo puede incluir un anticuerpo anti C5. Dichos anticuerpos anti C5 pueden interactuar directamente con C5 y/o C5b, para inhibir la formación de y/o la función fisiológica de C5b.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento pueden contener un inhibidor del componente del complemento humano C5 (por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une con una proteína componente del complemento humano C5 o un fragmento biológicamente activo de la misma tal como C5a o C5b). Como se usa en el presente documento, un "inhibidor del componente del complemento C5" es cualquier agente que inhiba: (i) la expresión, o el tráfico intracelular apropiado o secreción por una célula, de una proteína componente del complemento C5; (ii) la actividad de los fragmentos de escisión de C5 C5a o C5b (por ejemplo, la unión de C5a con sus receptores celulares afines o la unión de C5b con C6 y/u otros componentes del complejo de complemento terminal; véase anteriormente); (iii) la escisión de una proteína C5 humana para formar C5a y C5b; (iv) el tráfico intracelular apropiado, o la secreción por una célula, de una proteína componente del complemento C5; o (v) la estabilidad de la proteína C5 o el ARNm que codifica la proteína C5. La inhibición de la expresión de la proteína componente del complemento C5 incluye: inhibición de la transcripción de un gen que codifica una proteína C5 humana; degradación aumentada de un ARNm que codifica una proteína C5 humana; inhibición de la traducción de un ARNm que codifica una proteína C5 humana; degradación aumentada de una proteína C5 humana; inhibición del procesamiento apropiado de una pre-pro proteína C5 humana; o inhibición del tráfico o la secreción apropiados por una célula de una proteína C5 humana. Se conocen en la técnica y se describen en el presente documento métodos para determinar si un agente candidato es un inhibidor del componente del complemento humano C5.

Un inhibidor del componente del complemento humano C5 puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, un polipéptido, un análogo polipeptídico, un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico.

Se entiende que "molécula pequeña" como se usa en el presente documento, se refiere a un agente, que tiene un peso molecular preferentemente de menos de aproximadamente 6 kDa y más preferentemente menos de aproximadamente 2,5 kDa. Muchas compañías farmacéuticas tienen bibliotecas extensas de mezclas químicas y/o biológicas que comprenden matrices de moléculas pequeñas, con frecuencia extractos fúngicos, bacterianos o de algas, que pueden explorarse con cualquiera de los ensayos de la solicitud. Esta solicitud contempla usar, entre otras cosas, bibliotecas químicas pequeñas, bibliotecas peptídicas o colecciones de productos naturales. Tan *et al.* han descrito una biblioteca con más de dos millones de compuestos sintéticos que es compatible con ensayos basados en células miniaturizados (J Am Chem Soc (1998) 120: 8565-8566). Está dentro del alcance de la presente solicitud que dicha biblioteca puede usarse para explorar con respecto a agentes que se unan con un antígeno diana de interés (por ejemplo, componente del complemento C5). Existen numerosas bibliotecas de compuestos disponibles en el mercado, tales como la Chembridge DIVERSet. También están disponibles bibliotecas de investigadores académicos, tales como el conjunto Diversity del programa terapéutico de desarrollo de NCI. También puede emplearse diseño racional de fármacos. Por ejemplo, el diseño racional de fármacos puede emplear el uso de información estructural cristalina o de solución sobre la proteína componente del complemento humano C5. Véase, por ejemplo, las estructuras descritas en Hagemann *et al.* (2008) J Biol Chem 283 (12): 7763-75 y Zuiderweg *et al.* (1989) Biochemistry 28 (1): 172-85. El diseño racional de fármacos puede conseguirse también basándose en compuestos conocidos, por ejemplo, un inhibidor conocido de C5 (por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une con una proteína componente del complemento humano C5).

Los peptidomiméticos pueden ser compuestos en los que al menos una parte de un polipéptido objeto está modificada, y la estructura tridimensional del peptidomimético permanece sustancialmente igual que la del polipéptido objeto. Los peptidomiméticos pueden ser análogos de un polipéptido objeto de la divulgación que son, en sí mismos, polipéptidos que contienen una o más sustituciones u otras modificaciones dentro de la secuencia polipeptídica objeto. Como alternativa, al menos una parte de la secuencia polipeptídica objeto puede reemplazarse con una estructura no peptídica, de modo que la estructura tridimensional del polipéptido objeto se conserva sustancialmente. En otras palabras, uno, dos o tres restos de aminoácidos dentro de la secuencia polipeptídica objeto pueden reemplazarse por una estructura no peptídica. Además, otras partes peptídicas del polipéptido objeto pueden reemplazarse, aunque no es necesario que se reemplacen, con una estructura no peptídica. Los peptidomiméticos (análogos tanto peptídicos como no peptídicos) pueden tener propiedades mejoradas (por ejemplo, proteólisis reducida, retención aumentada o biodisponibilidad aumentada). Los peptidomiméticos tienen en general disponibilidad oral mejorada, lo que los hace especialmente adecuados para el tratamiento de trastornos en un ser humano o animal. Debería observarse que los peptidomiméticos pueden tener o no estructuras químicas bidimensionales similares, pero comparten elementos y geometría estructurales tridimensionales comunes. Cada peptidomimético puede tener además uno o más elementos de unión adicionales únicos.

Pueden usarse inhibidores de ácidos nucleicos para unirse con e inhibir un antígeno diana de interés. El antagonista de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un aptámero. Los aptámeros son secuencias oligonucleotídicas cortas que pueden usarse para reconocer y unirse específicamente con casi cualquier molécula, incluyendo proteínas de superficie celular. La evolución sistemática de ligandos por proceso de enriquecimiento exponencial (SELEX) es potente y puede usarse para identificar fácilmente dichos aptámeros. Pueden prepararse aptámeros para una amplia serie de proteínas importantes para la terapia y el diagnóstico, tales como factores de crecimiento y antígenos de superficie celular. Estos oligonucleótidos se unen con sus dianas con afinidades y especificidades similares a los anticuerpos (véase, por ejemplo, Ulrich (2006) Handb Exp Pharmacol. 173: 305-326).

En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento es una proteína de armazón distinta de anticuerpo. Estas proteínas se obtienen, en general, mediante adaptación basada en química combinatoria de proteínas de unión a antígeno preexistentes. Por ejemplo, el sitio de unión de transferrina humana para receptor de transferrina humana puede modificarse usando química combinatoria para crear una biblioteca diversa de variantes de transferrina, algunas de las cuales han adquirido afinidad por diferentes antígenos. Ali *et al.* (1999) J Biol Chem 274: 24066-24073. La parte de transferrina humana no implicada en la unión con el receptor permanece sin cambios y actúa como un armazón, como regiones marco conservadas de anticuerpos, para presentar los sitios de unión variantes. Las bibliotecas se exploran después, al igual que una biblioteca de anticuerpos, frente a un antígeno diana de interés para identificar las variantes que tienen selectividad y afinidad óptimas para el antígeno diana. Se plantea que las proteínas de armazón distintas de anticuerpo, aunque son similares en su función a los anticuerpos, tienen varias ventajas en comparación con los anticuerpos, incluyendo dichas ventajas, entre otras cosas, solubilidad y penetración tisular potenciadas, menor coste de fabricación y facilidad de conjugación con otras moléculas de interés. Hey *et al.* (2005) TRENDS Biotechnol 23 (10): 514-522.

Un experto en la materia apreciaría que la parte de armazón de la proteína de armazón distinta de anticuerpo puede incluir, por ejemplo, todo o una parte de: el dominio Z de proteína A de *S. aureus*, transferrina humana, décimo dominio de fibronectina de tipo III humano, dominio kunitz de un inhibidor de tripsina humana, CTLA-4 humana, una proteína de repetición de anquirina, una lipocalina humana, cristalina humana, ubiquitina humana o un inhibidor de tripsina de *E. elaterium*. Misma referencia.

En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento es un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une con una proteína componente del complemento humana C5. (En lo sucesivo en el presente documento, el anticuerpo puede denominarse en ocasiones "anticuerpo anti C5").

- 5 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti C5 puede unirse con un epítipo en la cadena alfa de la proteína componente del complemento humana C5. Se describen anticuerpos que se unen con la cadena alfa de C5, por ejemplo, en la publicación de solicitud de PCT n.º WO 2010/015608 y la patente de Estados Unidos n.º 6.355.245. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti C5 puede unirse con un epítipo en la cadena beta de la proteína componente del complemento humana C5. Se describen anticuerpos que se unen con la cadena beta de C5, por ejemplo, en Moongkarndi *et al.* (1982) *Immunobiol* 162: 397; Moongkarndi *et al.* (1983) *Immunobiol* 165: 323; y Mollnes *et al.* (1988) *Scand J Immunol* 28: 307-312.

Se desvelan fragmentos antigénicos ejemplares adicionales del componente del complemento humano C5, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 6.355.245.

- 15 Se describen anticuerpos anti C5 adicionales, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, adecuados para su uso en las proteínas de fusión descritas en el presente documento, por ejemplo, en la publicación de solicitud de PCT n.º WO 2010/015608.

- 20 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti C5 se une específicamente con una proteína componente del complemento humano C5 (por ejemplo, la proteína C5 humana que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 1). Las expresiones "unión específica" o "se une específicamente" se refieren a dos moléculas que forman un complejo (por ejemplo, un complejo entre un anticuerpo y una proteína componente del complemento C5) que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. Típicamente, la unión se considera específica cuando la constante de asociación (K_a) es mayor de $10^6 M^{-1}$. Por lo tanto, un anticuerpo puede unirse específicamente con una proteína C5 con un K_a de al menos (o más de) 10^6 (por ejemplo, al menos o más de 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} o 10^{15} o mayor) M^{-1} . Se describen ejemplos de anticuerpos que se unen específicamente con una proteína componente del complemento humano C5 en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.355.245.

- 30 Los anticuerpos anti C5 descritos en el presente documento pueden tener actividad en el bloque de la generación o actividad de los fragmentos activos C5a y/o C5b de una proteína componente del complemento C5 (por ejemplo, una proteína C5 humana). Mediante este efecto de bloqueo, los anticuerpos anti C5 inhiben, por ejemplo, los efectos proinflamatorios de C5a y la generación del complejo de ataque a membrana (CAM) C5b-9 en la superficie de una célula. Se describen anticuerpos anti C5 que tienen la capacidad de bloquear la generación de C5a, por ejemplo, en Moongkarndi *et al.* (1982) *Immunobiol* 162: 397 y Moongkarndi *et al.* (1983) *Immunobiol* 165: 323.

- 40 En algunas realizaciones, un anticuerpo anti C5, o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede reducir la capacidad de una proteína C5 para unirse con el componente del complemento humano C3b (por ejemplo, C3b presente en un complejo de convertasa C5 RA o RC) en más de 50 (por ejemplo, más de 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 o más) %. En algunas realizaciones, tras la unión con una proteína C5, el anticuerpo anti C5 o fragmento de unión a antígeno del mismo puede reducir la capacidad de la proteína C5 para unirse con el componente del complemento C4b (por ejemplo, C4b presente en una convertasa C5 RC) en más del 50 (por ejemplo, más del 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 o más) %. Se conocen en la técnica métodos para determinar si un anticuerpo puede bloquear la generación o actividad de los fragmentos activos C5a y/o C5b de una proteína componente del complemento C5, o unión con componente del complemento C4b o C3b, y se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 6.355.245 y Wurzner *et al.* (1991) *Complement Inflamm* 8: 328-340.

- 50 En algunas realizaciones, la composición comprende, y/o el anticuerpo es, eculizumab (Soliris®, Alexion Pharmaceuticals, Inc., Cheshire, CT). (Véase, por ejemplo, Kaplan (2002) *Curr Opin Investig Drugs* 3(7): 1017-23; Hill (2005) *Clin Adv Hematol Oncol* 3(11): 849-50; y Rother *et al.* (2007) *Nature Biotechnology* 25(11): 1256-1488). En algunas realizaciones, la composición comprende, y/o el anticuerpo es, pexelizumab (Alexion Pharmaceuticals, Inc., Cheshire, CT). (Véase, por ejemplo, Whiss (2002) *Curr Opin Investig Drugs* 3(6): 870-7; Patel *et al.* (2005) *Drugs Today (Barc)* 41(3): 165-70; y Thomas *et al.* (1996) *Mol Immunol* 33(17-18): 1389-401.)

- 55 En algunas realizaciones, el inhibidor de C5 es un anticuerpo que se une con C5a (denominado en ocasiones en el presente documento "anticuerpo anti C5a"). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une con C5a, pero no con C5 de longitud completa. En algunas realizaciones, la unión de un anticuerpo con C5a puede inhibir la actividad biológica de C5a. Los métodos para medir la actividad de C5a incluyen, por ejemplo, ensayos de quimiotaxis, RIA o ELISA (véase, por ejemplo, Ward y Zvaifler (1971) *J Clin Invest* 50 (3): 606-16 y Wurzner *et al.* (1991) *Complement Inflamm* 8: 328-340). En algunas realizaciones, la unión de un anticuerpo con C5a puede inhibir la interacción entre C5a y C5aR1. Se conocen en la técnica métodos adecuados para detectar y/o medir la interacción entre C5a y C5aR1 (en presencia y ausencia de un anticuerpo) y se describen, por ejemplo, en Mary y Boulay (1993) *Eur J Haematol* 51(5): 282-287; Kaneko *et al.* (1995) *Immunology* 86(1): 149-154; Giannini *et al.* (1995) *J Biol Chem* 270(32): 19166-19172; y Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20060160726. Por ejemplo, la unión de C5a marcado de forma detectable (por ejemplo, marcado con radiactividad) con células mononucleares de sangre periférica que expresan C5aR1 puede evaluarse en presencia y ausencia de un anticuerpo. Una reducción

de la cantidad de C5a marcado de forma detectable que se une con C5aR1 en presencia del anticuerpo, en comparación con la cantidad de unión en ausencia del anticuerpo, es una indicación de que el anticuerpo inhibe la interacción entre C5a y C5aR1. En algunas realizaciones, la unión de un anticuerpo con C5a puede inhibir la interacción entre C5a y C5L2 (véase posteriormente). Se conocen en la técnica métodos para detectar y/o medir la interacción entre C5a y C5L2 y se describen, por ejemplo, en Ward (2009) *J Mol Med* 87 (4): 375-378 y Chen *et al.* (2007) *Nature* 446 (7132): 203-207 (véase posteriormente).

En algunas realizaciones, el inhibidor de C5 es un anticuerpo que se une con C5b (denominado en ocasiones en el presente documento "un anticuerpo anti C5b"). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une con C5b, pero no se une con C5 de longitud completa. La estructura de C5b se describe, por ejemplo, en Müller-Eberhard (1985) *Biochem Soc Symp* 50: 235-246; y Yamamoto y Gewurz (1978) *J Immunol* 120 (6): 2008-2015. Como se ha descrito anteriormente, C5b se combina con C6, C7 y C8 para formar el complejo C5b-8 en la superficie de la célula diana. Los intermedios de complejos de proteínas formados durante la serie de combinaciones incluyen C5b-6 (incluyendo C5b y C6), C5b-7 (incluyendo C5b, C6 y C7) y C5b-8 (incluyendo C5b, C6, C7 y C8). Tras la unión de varias moléculas de C9, se forma el complejo de ataque a membrana (CAM, complejo de complemento terminal (CCT) C5b-9). Cuando se insertan números suficientes de CAM en membranas de células diana, las aberturas que crean (poros CAM) median en la lisis osmótica rápida de las células diana.

En algunas realizaciones, la unión de un anticuerpo con C5b puede inhibir la interacción entre C5b y C6. En algunas realizaciones, la unión del anticuerpo con C5b puede inhibir el ensamblaje o la actividad del CAM-CCT C5b-9. En algunas realizaciones, la unión de un anticuerpo con C5b puede inhibir la lisis celular dependiente del complemento (por ejemplo, *in vitro* y/o *in vivo*). Los métodos adecuados para evaluar si un anticuerpo inhibe la lisis dependiente del complemento incluyen, por ejemplo, ensayos hemolíticos u otros ensayos funcionales para detectar la actividad de C5b-9 soluble. Por ejemplo, una reducción en la capacidad de lisis celular del complemento en presencia de un anticuerpo puede medirse por un ensayo de hemólisis descrito en Kabat y Mayer (eds.), *Experimental Immunochimistry*, 2ª Edición, "135-240, Springfield, IL, CC Thomas (1961), páginas 135-139, o una variación convencional de ese ensayo tal como el método de hemólisis de eritrocitos de pollo como se describe, por ejemplo, en Hillmen *et al.* (2004) *N Engl J Med* 350 (6): 552.

Se conocen en la técnica anticuerpos que se unen con C5b así como métodos para preparar dichos anticuerpos. Están disponibles anticuerpos anti C5b disponibles en el mercado de varios proveedores incluyendo, por ejemplo, Hycult Biotechnology (número de catálogo: HM2080, clon 568) y Abcam™ (ab46151 o ab46168).

Se describen en el presente documento métodos para determinar si un agente particular es un inhibidor del componente del complemento humano C5 y se conocen en la técnica. Por ejemplo, la concentración y/o actividad fisiológica de C5a y C5b en un líquido biológico puede medirse por métodos bien conocidos en la técnica. Los métodos para medir la concentración o actividad de C5a incluyen, por ejemplo, ensayos de quimiotaxis, RIA o ELISA (véase, por ejemplo, Ward y Zvaifler (1971) *J Clin Invest.* 50 (3): 606-16 y Wurzner *et al.* (1991) *Complement Inflamm.* 8: 328-340). Para C5b, pueden usarse ensayos hemolíticos o ensayos para C5b-9 soluble como se analiza en el presente documento. También pueden usarse otros ensayos conocidos en la técnica. Usando ensayos de estos tipos u otros adecuados, pueden explorarse agentes candidatos capaces de inhibir el componente del complemento humano C5 tales como un anticuerpo anti C5, para, por ejemplo, identificar compuestos que sean útiles en los métodos descritos en el presente documento y determinar los niveles de dosificación apropiados de dichos compuestos.

Se conocen en la técnica métodos para determinar si un compuesto candidato inhibe la escisión de C5 humano en formas C5a y C5b y se describen, por ejemplo, en Moongkarndi *et al.* (1982) *Immunobiol* 162: 397; Moongkarndi *et al.* (1983) *Immunobiol* 165: 323; Isenman *et al.* (1980) *J Immunol* 124 (1): 326-31; Thomas *et al.* (1996) *Mol. Immunol* 33 (17-18): 1389-401; y Evans *et al.* (1995) *Mol. Immunol* 32 (16): 1183-95.

La inhibición del componente del complemento humano C5 también puede reducir la capacidad de lisis celular del complemento en los líquidos corporales de un sujeto. Dichas reducciones de la capacidad de lisis celular del complemento presente pueden medirse por métodos bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, por un ensayo hemolítico convencional tal como el ensayo de hemólisis descrito en Kabat y Mayer (eds), "Experimental Immunochimistry, 2ª Edición, "135-240, Springfield, IL, CC Thomas (1961), páginas 135-139, o una variación convencional de ese ensayo tal como el método de hemólisis de eritrocitos de pollo como se describe, por ejemplo, en Hillmen *et al.* (2004) *N Engl J Med* 350 (6): 552.

También se conocen bien en la técnica anticuerpos que se unen con C3b y, por ejemplo, inhiben la C3b convertasa. Véase por ejemplo, publicaciones de solicitud de PCT n.º WO 2010/136311, WO 2009/056631 y WO 2008/154251. Se han descrito anticuerpos antagonistas anti C6 y anti C7, por ejemplo, en Brauer *et al.* (1996) *Transplantation* 61 (4): 588 - 594 y patente de Estados Unidos n.º 5.679.345.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti factor B (tal como el anticuerpo monoclonal 1379 producido por el Depósito de ATCC n.º PTA-6230). También se describen anticuerpos anti factor B, por ejemplo, en Ueda *et al.* (1987) *J Immunol* 138 (4): 1143-9; Tanhehco *et al.* (1999) *Transplant Proc* 31 (5): 2168-71; patentes de

Estados Unidos n.º 7.999.082 y 7.964.705; y publicación de PCT n.º WO 09/029669.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti factor D, por ejemplo, un anticuerpo descrito en Pascual *et al.* (1990) *J Immunol Methods* 127: 263-269; Sahu *et al.* (1993) *Mol Immunol* 30 (7): 679 - 684; Pascual *et al.* (1993) *Eur J Immunol* 23: 1389-1392; Niemann *et al.* (1984) *J Immunol* 132 (2): 809-815; patente de Estados Unidos n.º 7.439.331; o publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20080118506.

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo antiproperdina. También se conocen bien en la técnica anticuerpos antiproperdina adecuados e incluyen, por ejemplo, publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20110014614 y publicación de solicitud de PCT n.º WO2009110918.

Métodos para el tratamiento

15 También se proporcionan en el presente documento composiciones para uso en métodos para tratar o prevenir SUHa en un sujeto (por ejemplo, un ser humano). Las composiciones (por ejemplo, inhibidores del complemento y/o agentes secundarios) pueden administrarse a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, usando una diversidad de métodos que dependen, en parte, de la vía de administración. La vía puede ser, por ejemplo, inyección o infusión intravenosa (IV), inyección subcutánea (SC), inyección intraperitoneal (IP) o inyección intramuscular.

20 Puede conseguirse administración mediante, por ejemplo, infusión local, inyección o por medio de un implante. El implante puede ser de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas o fibras. El implante puede configurarse para liberación sostenida o periódica de la composición al sujeto. Véase, por ejemplo, publicación de patente de Estados Unidos n.º 20080241223; patentes de Estados Unidos n.º 5.501.856; 4.863.457; y 3.710.795; y patentes europeas n.º EP488401 y EP430539. La composición puede
25 suministrarse al sujeto por medio de un dispositivo implantable basado en, por ejemplo, sistemas difusivos, erosionables o convectivos, por ejemplo, bombas osmóticas, implantes biodegradables, sistemas de electrodifusión, sistemas de electroósmosis, bombas de presión de vapor, bombas electrolíticas, bombas efervescentes, bombas piezoeléctricas, sistemas basados en erosión o sistemas electromecánicos.

30 Una dosis adecuada de un inhibidor del complemento (por ejemplo, un anticuerpo anti C5 o fragmento del mismo), cuya dosis puede tratar o prevenir SUHa en un sujeto, puede depender de una diversidad de factores incluyendo, por ejemplo, la edad, el sexo y el peso de un sujeto para tratar y el compuesto inhibidor particular usado. Por ejemplo, puede requerirse una dosis diferente de un ARNip específico para C5 humano para tratar un sujeto con SUHa en comparación con la dosis de un anticuerpo anti C5 requerido para tratar al mismo paciente. Otros factores
35 que afectan a la dosis administrada al sujeto incluyen, por ejemplo, el tipo o la gravedad del SUHa. Por ejemplo, un sujeto que tiene SUHa asociado con CFH puede requerir administración de una dosificación diferente del inhibidor que un sujeto con SUHa asociado con MCP. Otros factores pueden incluir, por ejemplo, otros trastornos médicos que afectan de forma simultánea o han afectado previamente al sujeto, la salud general del sujeto, la disposición genética del sujeto, la dieta, el momento de administración, la tasa de excreción, la combinación farmacológica y cualquier otro producto terapéutico adicional que se administra al sujeto. También debería entenderse que un
40 régimen de dosificación y tratamiento específico para cualquier sujeto particular dependerá del criterio del prácticamente médico tratante (por ejemplo, médico o enfermero).

45 El inhibidor puede administrarse como una dosis fija, o en una dosis de miligramo por kilogramo "mg/kg". En algunas realizaciones, la dosis también puede elegirse para reducir o evitar la producción de anticuerpos u otras respuestas inmunitarias del hospedador contra uno o más agentes activos en la composición. Aunque no se pretende que sea limitante de ningún modo, las dosificaciones ejemplares de un inhibidor, tal como un anticuerpo anti C5, incluyen, por ejemplo, 1-100 mg/kg, 0,5-50 mg/kg, 0,1-100 mg/kg, 0,5- 25 mg/kg, 1-20 mg/kg y 1-10 mg/kg de peso corporal.

50 Puede administrarse a un ser humano por vía intravenosa un anticuerpo anti C5 (por ejemplo, eculizumab) a una dosis de aproximadamente 900 mg cada aproximadamente 12 (por ejemplo, cada aproximadamente 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 30, 42, o 49 o más) días. Véase, por ejemplo, Hill *et al.* (2005) *Blood* 106 (7): 2559.

55 Puede administrarse a un ser humano por vía intravenosa un anticuerpo anti C5 (por ejemplo, eculizumab) a una dosis de aproximadamente 600 (por ejemplo, aproximadamente 625, 650, 700, 725, 750, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950 o 1.000 o más) mg cada semana, opcionalmente, durante dos o más (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho o más) semanas. Después del tratamiento inicial, puede administrarse al ser humano el anticuerpo a una dosis de aproximadamente 900 mg cada aproximadamente 14 (por ejemplo, cada aproximadamente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 30, 42 o 49 o más) días, por ejemplo, como una dosis de mantenimiento. Véase, por ejemplo, Hillmen *et al.* (2004) *N Engl J Med.* 350 (6): 552-9 y Dmytrijuk *et al.* (2008) *The Oncologist* 13(9): 993.
60

Puede administrarse a un ser humano por vía intravenosa un anticuerpo anti C5 (por ejemplo, eculizumab) a una dosis de aproximadamente 900 (por ejemplo, 925, 950, 975, 1000, 1100 o 1200 o más) mg cada semana, opcionalmente, durante dos o más (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho o más) semanas. Después del
65 tratamiento inicial, puede administrarse al ser humano el anticuerpo a una dosis de aproximadamente 1200 mg cada aproximadamente 14 (por ejemplo, cada aproximadamente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 30, 42 o 49

o más) días, por ejemplo, como una dosis de mantenimiento. Véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2010/054403.

5 Como se usa en el presente documento, “administrado de forma crónica”, “tratamiento crónico”, “tratar de forma crónica” o variaciones gramaticales similares de los mismos se refieren a un régimen de tratamiento que se emplea para mantener una cierta concentración umbral de un agente terapéutico en la sangre de un paciente para suprimir completa o sustancialmente la actividad sistémica del complemento en el paciente durante un periodo de tiempo prolongado. En consecuencia, un paciente tratado crónicamente con un inhibidor del complemento puede tratarse durante un periodo de tiempo que es mayor de o igual a 2 semanas (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 10 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 o 52 semanas; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses; o 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5 o 12 años o durante el resto de la vida del paciente) con el inhibidor en una cantidad y con una frecuencia de dosificación que son suficientes para mantener una concentración del inhibidor en la sangre del paciente que inhibe o inhibe sustancialmente la actividad sistémica del complemento en el paciente. En algunas realizaciones, el inhibidor del complemento puede administrarse de forma crónica a un paciente que lo necesite en una cantidad y con una frecuencia que son eficaces para mantener la actividad hemolítica en suero a menos de o igual a 20 (por ejemplo, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5) %. Véase, por ejemplo, Hill *et al.* (2005) Blood 106 (7): 2559. El inhibidor del complemento puede administrarse a un paciente en una cantidad y con una frecuencia que son eficaces para mantener los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) en suero dentro de al menos 20 (por ejemplo, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5) % del intervalo normal para LDH. Véase Hill *et al.* (2005) mencionado anteriormente. El inhibidor del complemento puede administrarse al paciente en una cantidad y con una frecuencia que son eficaces para mantener un nivel de LDH en suero menor de 550 (por ejemplo, menor de 540, 530, 520, 510, 500, 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 400, 390, 380, 370, 360, 350, 340, 330, 320, 310, 300, 290, 280 o menor de 270) UI/l. Para mantener la inhibición sistémica del complemento en un paciente, el inhibidor del complemento puede administrarse de forma crónica al paciente, por ejemplo, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, dos veces a la semana, una vez al día, una vez al mes o una vez cada tres semanas.

30 Una composición farmacéutica puede incluir una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del componente del complemento humano C5 (por ejemplo, un anticuerpo anti C5 o fragmento de unión a antígeno del mismo). Dichas cantidades eficaces pueden determinarse fácilmente por un experto habitual en la materia basándose, en parte, en el efecto del inhibidor administrado, o el efecto combinatorio del anticuerpo y uno o más agentes activos adicionales, si se usa más de un agente. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del componente del complemento humano C5 (por ejemplo, un anticuerpo anti C5) también puede variar según factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo (y uno o más agentes activos adicionales) para inducir una respuesta deseada en el individuo, por ejemplo, alivio de al menos un parámetro de afección, por ejemplo, alivio de al menos un síntoma de SUHa. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del componente del complemento humano C5 (por ejemplo, un anticuerpo anti C5) puede inhibir (reducir la gravedad de o eliminar la aparición de) y/o prevenir la trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática, insuficiencia renal y/o uno cualquiera de los síntomas de SUHa conocidos en la técnica o descritos en el presente documento. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la composición se compensa por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

45 Se pretende que las expresiones “cantidad terapéuticamente eficaz” o “dosis terapéuticamente eficaz” o expresiones similares usadas en el presente documento signifiquen una cantidad de un agente (por ejemplo, un inhibidor del componente del complemento humano C5) que induzca la respuesta biológica o médica deseada (por ejemplo, una mejora en uno o más síntomas de SUHa). En algunas realizaciones, una composición descrita en el presente documento contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor del componente del complemento humano C5. En algunas realizaciones, una composición descrita en el presente documento contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une con una proteína componente del complemento C5. En algunas realizaciones, la composición contiene dos o más (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10 u 11 o más) inhibidores diferentes del componente del complemento humano C5 de modo que la composición en su conjunto sea terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, una composición puede contener un anticuerpo que se une con una proteína C5 humana y un ARNip que se une con, y promueve la degradación de un ARNm que codifica una proteína C5 humana, en el que el anticuerpo y ARNip están cada uno a una concentración que cuando se combinan son terapéuticamente eficaces. En algunas realizaciones, la composición contiene el inhibidor y uno o más segundos agentes activos de modo que la composición en su conjunto sea terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, la composición puede contener un anticuerpo que se una con una proteína C5 humana y otro agente útil para tratar o prevenir SUHa.

60 La toxicidad y eficacia terapéutica de dichas composiciones pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos conocidos en cultivos celulares o animales experimentales (modelos animales de SUHa). Estos procedimientos pueden usarse, por ejemplo, para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren composiciones, o inhibidores (por ejemplo, anticuerpos anti C5) de las composiciones, que muestren índices terapéuticos altos. Aunque pueden

usarse composiciones que muestran efectos secundarios tóxicos, debería tenerse cuidado de diseñar un sistema de suministro que dirija dichos compuestos al sitio de tejido afectado y minimice el daño potencial a células normales y, por lo tanto, reduzca efectos secundarios.

- 5 Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. Se conocen en la técnica modelos animales adecuados de SUHa y se describen, por ejemplo, Atkinson *et al.* (2007) *Journal of Experimental Medicine* 204(6): 1245-1248. La dosificación de dichos inhibidores queda generalmente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación de los inhibidores (por ejemplo, un anticuerpo anti C5 o fragmento de unión a antígeno del mismo) que incluyen la DE₅₀
- 10 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para un inhibidor del componente del complemento humano C5 (por ejemplo, un anticuerpo anti C5) usado como se describe en el presente documento (por ejemplo, para tratar o prevenir SUHa), la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en
- 15 plasma en circulación que incluye la CI₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición semimáxima de los síntomas) como se determina en el cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar con más precisión dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento.
- 20 En algunas realizaciones, la dosis requerida de un inhibidor del componente del complemento humano C5 puede determinarse basándose en la concentración de la proteína C5 humana en la sangre del sujeto. Por ejemplo, un sujeto que tiene una mayor concentración de niveles de proteína C5 humana en circulación puede requerir una dosis mayor de un inhibidor de C5 humano que un sujeto que tenga niveles menores de C5 humana en circulación. Se conocen en la técnica métodos para determinar la concentración del componente del complemento humano C5 en
- 25 una muestra de líquido derivada de sangre de un sujeto y se describen, por ejemplo, en Rawal *et al.* (1998) *J Biol Chem* 273 (27): 16828-16835.

Los métodos pueden realizarse junto con otras terapias para SUHa. Por ejemplo, la composición puede administrarse a un sujeto al mismo tiempo que, antes de o después de la nefrectomía (por ejemplo, nefrectomía

30 bilateral), diálisis, un intercambio de plasma o una infusión de plasma (véase, por ejemplo, Noris *et al.* (2005) "Non-shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome." En: Zipfel P (ed). *Complement and Kidney Disease*. Basel: Birkhauser-Verlag, 65-83).

Un "sujeto", como se usa en el presente documento, puede ser cualquier mamífero. Por ejemplo, un sujeto puede ser un ser humano, un primate no humano (por ejemplo, mono, babuino o chimpancé), un caballo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, un perro, un gato, un conejo, una cobaya, un jerbo, un hámster, una rata o un ratón. En algunas realizaciones, el sujeto es un lactante (por ejemplo, un lactante humano).

35

Como se usa en el presente documento, un sujeto "que necesita prevención", "que necesita tratamiento" o "que lo necesita" se refiere a uno que, según el criterio del practicante médico apropiado (por ejemplo, un médico, un enfermero, o un practicante de enfermería en el caso de seres humanos; un veterinario en el caso de mamíferos no humanos), se beneficiaría razonablemente de un tratamiento dado (tal como un tratamiento con una composición que comprende un inhibidor del componente del complemento humano C5).

40

Como se usa en el presente documento, un sujeto "que está en riesgo de desarrollar SUHa" es un sujeto que tiene uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho o más) factores de riesgo para desarrollar el trastorno. Se conocen bien en la técnica de la medicina factores de riesgo para SUHa e incluyen, por ejemplo, una predisposición a desarrollar la afección, es decir, un historial familiar de la afección o una predisposición genética a desarrollar la afección tal como, por ejemplo, una o más mutaciones en el factor del complemento H (CFH), proteína cofactor de membrana (MCP; CD46), proteína de unión a C4b, factor del complemento B (CFB) o factor del complemento I (CFI). Véase, por ejemplo, Warwicker *et al.* (1998) *Kidney Int* 53: 836-844; Richards *et al.* (2001) *Am J Hum Genet* 68: 485-490; Caprioli *et al.* (2001) *Am Soc Nephrol* 12: 297-307; Neuman *et al.* (2003) *J Med Genet* 40: 676-681; Richards *et al.* (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12966-12971; Fremeaux-Bacchi *et al.* (2005) *J Am Soc Nephrol* 17: 2017-2025; Esparza-Gordillo *et al.* (2005) *Hum Mol Genet* 14: 703-712; Goicoechea de Jorge *et al.* (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104(1): 240-245; Blom *et al.* (2008) *J Immunol* 180(9): 6385-91; y Fremeaux-Bacchi *et al.* (2004) *J Medical Genet* 41:e84). Véase también Kavanagh *et al.* (2006), mencionado anteriormente. Los factores de riesgo también incluyen, por ejemplo, infección con *Streptococcus pneumoniae*, embarazo, cáncer, exposición a agentes antineoplásicos (por ejemplo, quinina, mitomicina C, cisplatino o bleomicina), exposición a agentes inmunoterapéuticos (por ejemplo, ciclosporina, OKT3 o interferón), exposición a agentes antiplaquetarios (por ejemplo, ticlopidina o clopidogrel), infección por VIH, trasplante, enfermedad autoinmunitaria y aciduria metilmalónica y homocistinuria combinadas (cblC). Véase, por ejemplo, Constantinescu *et al.* (2004) *Am J Kidney Dis* 43: 976-982; George (2003) *Curr Opin Hematol* 10: 339-344; Gottschall *et al.* (1994) *Am J Hematol* 47: 283-289; Valavaara *et al.* (1985) *Cancer* 55: 47-50; Miralbell *et al.* (1996) *J Clin Oncol* 14: 579-585; Dragon-Durey *et al.* (2005) *J Am Soc Nephrol* 16: 555-63; y Becker *et al.* (2004) *Clin Infect Dis* 39: S267-S275. Por lo tanto, un ser humano en riesgo de desarrollar SUHa puede ser, por ejemplo, uno que tiene un historial familiar de SUHa y/o uno que tiene una infección por VIH. A partir de lo anterior resultará evidente que los sujetos "en riesgo de desarrollar SUHa" no

45

50

55

60

65

son todos los sujetos dentro de una especie de interés.

Un sujeto "que se sospecha que tiene SUHa" es uno que tiene uno o más síntomas de la afección. Los expertos en la técnica médica conocen bien síntomas de esta afección y estos incluyen, por ejemplo, hipertensión grave, proteinuria, uremia, letargo/fatiga, irritabilidad, trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática y alteración de la función renal (por ejemplo, insuficiencia renal aguda). Resultará evidente a partir del pasaje anterior que los sujetos "que se sospecha que tienen SUH" no son todos los sujetos dentro de una especie de interés.

SUHa puede ser genético, adquirido o idiopático. SUHa puede considerarse genético cuando dos o más (por ejemplo, tres, cuatro, cinco o seis o más) miembros de la misma familia están aquejados de la enfermedad con al menos seis meses de diferencia y se ha excluido la exposición a un agente desencadenante común, o cuando una o más mutaciones génicas asociadas con SUHa (por ejemplo, una o más mutaciones en CFH, MCP/CD46, CFB o CFI) se identifican en un sujeto. Por ejemplo, un sujeto puede tener SUHa asociado con CFH, SUHa asociado con CFB, SUHa asociado con CFI o SUHa asociado con MCP. Hasta el 30 % del SUHa genético está asociado con mutaciones en CFH, 12 % con mutaciones en MCP, 5-10 % con mutaciones en CFI y menos del 2 % con mutaciones en CFB. El SUHa genético puede ser múltiple (es decir, familiar; dos o más miembros de la familia afectados) o simple (es decir, un único caso en una familia). SUHa puede considerarse adquirido cuando puede identificarse un factor ambiental subyacente (por ejemplo, un fármaco, enfermedad sistémica, o agentes víricos o bacterianos que no dan como resultado exotoxina de tipo Shiga). SUHa puede considerarse idiopático cuando no es evidente ningún desencadenante (genético o ambiental).

Los métodos pueden incluir identificar al sujeto como uno que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar SUHa. Además del uso de los perfiles de biomarcadores de SUHa descritos en el presente documento, pueden realizarse ensayos de laboratorio para determinar si un sujeto humano tiene trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática o insuficiencia renal aguda. La trombocitopenia puede diagnosticarse por un profesional médico como uno o más de: (i) un recuento plaquetario que es menor de 150.000/mm³ (por ejemplo, menor de 60.000/mm³); (ii) una reducción en el tiempo de supervivencia de plaquetas que se reduce, que refleja la alteración de plaquetas potenciada en la circulación; y (iii) plaquetas gigantes observadas en un frotis periférico, que es coherente con la activación secundaria de la trombocitopenia. Puede diagnosticarse anemia hemolítica microangiopática por un profesional médico como uno o más de: (i) concentraciones de hemoglobina que son menores de 10 mg/dl (por ejemplo, menores de 6,5 mg/dl); (ii) concentraciones de lactato deshidrogenasa (LDH) en suero aumentadas (> 460 U/l); (iii) hiperbilirrubinemia, reticulocitosis, hemoglobina libre en circulación y concentraciones de haptoglobina bajas o indetectables; y (iv) la detección de glóbulos rojos fragmentados (esquistocitos) con el aspecto típico de células espinosas o en forma de casco en el frotis periférico junto con un ensayo de Coombs negativo. Véase, por ejemplo, Kaplan *et al.* (1992) "Hemolytic Uremic Syndrome and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura," *Informa Health Care* (ISBN 0824786637) y Zipfel (2005) "Complement and Kidney Disease," Springer (ISBN 3764371668).

También pueden usarse las concentraciones en sangre de C3 y C4 como una medida de la activación o la desregulación del complemento. Además, la condición de un sujeto puede caracterizarse adicionalmente identificando que el sujeto alberga una o más mutaciones en un gen asociado con SUHa tal como CFI, CFB, CFH o MCP (mencionado anteriormente). Los métodos adecuados para detectar una mutación en un gen incluyen, por ejemplo, secuenciación de ADN y técnicas de matrices de ácidos nucleicos. Véase, por ejemplo, Breslin *et al.* (2006) *Clin Am Soc Nephrol* 1:88-99 y Goicoechea de Jorge *et al.* (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 240-245.

El inhibidor del componente del complemento humano C5 (por ejemplo, un anticuerpo anti C5 o fragmento de unión a antígeno del mismo) puede administrarse a un sujeto como una monoterapia. Como alternativa, como se ha descrito anteriormente, el inhibidor puede administrarse a un sujeto como una terapia de combinación con otro tratamiento, por ejemplo, otro tratamiento para SUHa. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir administrar al sujeto (por ejemplo, un paciente humano) uno o más agentes adicionales (por ejemplo, antihipertensivos) que proporcionan un beneficio terapéutico al sujeto que tiene, o está en riesgo de desarrollar, SUHa. El inhibidor del componente del complemento humano C5 y el o los agentes activos adicionales pueden administrarse al mismo tiempo. Como alternativa, el inhibidor puede administrarse el primero y el o los agentes activos adicionales pueden administrarse los segundos. Por el contrario, el o los agentes activos adicionales pueden administrarse los primeros y el inhibidor puede administrarse el segundo.

El inhibidor del componente del complemento humano C5 puede reemplazar o aumentar una terapia administrada previamente o simultáneamente. Por ejemplo, tras tratar con un anticuerpo anti C5 o fragmento de unión a antígeno del mismo, la administración del o los agentes activos adicionales puede detenerse o reducirse, por ejemplo, administrarse a niveles más bajos. Puede mantenerse la administración de la terapia previa. Una terapia previa puede mantenerse hasta que el nivel de inhibidor de C5 humano alcance un nivel suficiente para proporcionar un efecto terapéutico. Las dos terapias pueden administrarse en combinación.

La supervisión de un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) para una mejora en SUHa, como se define en el presente documento, significa evaluar el sujeto con respecto a un cambio en un parámetro de enfermedad, por ejemplo, una mejora en uno o más síntomas de la enfermedad. Dichos síntomas incluyen cualquiera de los síntomas

de SUHa descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la evaluación se realiza al menos 1 hora, por ejemplo, al menos 2, 4, 6, 8, 12, 24 o 48 horas, o al menos 1 día, 2 días, 4 días, 10 días, 13 días, 20 días o más, o al menos 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 10 semanas, 13 semanas, 20 semanas o más, después de comenzar el tratamiento. El sujeto puede evaluarse en uno o más de los siguientes periodos; antes del comienzo del tratamiento; durante el tratamiento; o después de haberse administrado uno o más elementos del tratamiento. La evaluación puede incluir evaluar la necesidad de tratamiento adicional, por ejemplo, evaluar si debería alterarse una dosificación, frecuencia de administración o duración del tratamiento. También puede incluir evaluar la necesidad de añadir o reducir una modalidad terapéutica seleccionada, por ejemplo, añadir o reducir cualquiera de los tratamientos para SUHa descritos en el presente documento.

Kits

También se proporciona el uso de kits que comprenden diversos reactivos y materiales para llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento. Los procedimientos para medir, diagnosticar, evaluar y/o valorar descritos en el presente documento pueden realizarse por laboratorios de diagnóstico, laboratorios experimentales o practicantes individuales. La invención proporciona el uso de kits en cualquiera de o en todos estos escenarios.

En algunas realizaciones, los kits descritos en el presente documento comprenden materiales y reactivos para, entre otras cosas, caracterizar o procesar muestras biológicas (por ejemplo, líquidos biológicos), medir los niveles de biomarcadores (por ejemplo, niveles de proteínas o ácidos nucleicos), diagnosticar SUHa en un sujeto o supervisar la respuesta al tratamiento de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento. En ciertas realizaciones, un kit de la invención comprende al menos uno o más reactivos que detectan específicamente niveles de proteínas de una o más proteínas biomarcadoras de SUHa (por ejemplo, las seleccionadas de la Tabla 1) y, opcionalmente, instrucciones para usar el kit. El kit puede incluir, por ejemplo, cualquiera de las matrices descritas en el presente documento.

En algunas realizaciones, los kits pueden incluir muestras de control adecuadas (por ejemplo, líquidos biológicos de individuos sanos normales o una solución que comprende una cantidad de control conocida de un analito particular de interés). En algunas realizaciones, los kits de la invención pueden incluir instrucciones para usar el kit de acuerdo con uno o más métodos descritos en el presente documento y pueden comprender instrucciones para procesar la muestra biológica (por ejemplo, un líquido biológico) obtenida del sujeto y/o para realizar el ensayo o instrucciones para interpretar los resultados.

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren, no limiten, la invención.

Ejemplos

Para entender mejor la patología de SUHa, los inventores han recogido muestras de líquidos biológicos (sangre completa, suero, plasma y orina) de pacientes que tienen SUHa o se sospecha que tienen SUHa tanto antes como, en varios puntos, después de iniciar el tratamiento con un inhibidor del complemento (el anticuerpo anti C5 eculizumab). Un objetivo de este estudio fue definir una serie de parámetros clínicamente definibles que pueden usarse para supervisar la sensibilidad de los pacientes al tratamiento con el inhibidor del complemento así como marcadores de la enfermedad y progresión o reducción de la misma. Los inventores han identificado varias proteínas cuya expresión y/o actividad estaba correlacionada con la patología de SUHa y/o la sensibilidad de un paciente con SUHa a tratamiento con un inhibidor del complemento. Las proteínas fueron las implicadas o asociadas con el complemento y/o la activación de células endoteliales, inflamación, lesión renal y coagulación (véase Tabla 1).

Para el estudio, se reclutó un total de 41 sujetos adultos (27 mujeres y 12 hombres) con un diagnóstico confirmado de SUHa así como voluntarios adultos sanos normales. Todos los pacientes tuvieron SUHa confirmado en la exploración basándose en una o más de las siguientes características: recuento de plaquetas menor de $150 \times 10^9/l$; niveles de hemoglobina a menos que el límite inferior de lo normal; niveles de LDH que fueron mayores que o iguales a 1,5 veces el límite superior de lo normal; niveles de creatinina en suero que fueron mayores que o iguales al límite superior de lo normal; y un nivel de actividad de ADAMTS 13 que fue mayor del 5 %. Todos los pacientes tuvieron resultados negativos para ensayo de toxina Shiga.

La edad media de los pacientes en el momento de inclusión fue de 40,3 años de edad. El 68 % de los pacientes fueron mujeres; 2 (4,8 %) fueron negros o afroamericanos; y 1 paciente (2,4 %) fue de descendencia asiática. Seis pacientes (14,6 %) informaron de una historia familiar de SUHa. Veinte (48,7 %) tuvieron al menos una mutación de proteína reguladora del complemento identificada o tuvieron un resultado positivo para un ensayo de un autoanticuerpo que se une con una proteína reguladora del complemento. Treinta pacientes (73,2 %) presentaron una primera manifestación clínica de SUHa. Seis pacientes (14 %) iniciaron inmediatamente eculizumab sin el uso de intercambio/infusión de plasma (PE/PI). Veinticuatro pacientes (58,5 %) recibieron diálisis en línea basal (antes de tratamiento con eculizumab). Nueve pacientes (22 %) hubieron experimentado previamente un trasplante renal. Veintisiete (66 %) tuvieron un recuento plaquetario que era de menos de $150 \times 10^9/l$. Treinta y dos (78 %) pacientes tuvieron un nivel de LDH en suero que era mayor que el límite superior de lo normal. Los niveles medios de haptoglobina (Hp) para los pacientes en esta cohorte fue de $0,6 \pm 0,4 \text{ g/l}$; mientras que los niveles de creatinina en

suero medios en esta cohorte de pacientes fue de $411 \pm 264,6 \mu\text{mol/l}$ (N=40).

Se recogieron líquidos biológicos en el momento de la admisión en el estudio (antes del tratamiento) y a continuación después del tratamiento en cada administración del fármaco. Se administró eculizumab a los sujetos en el siguiente programa: 900 mg una vez por semana durante cuatro semanas; 1200 mg como la quinta dosis; y 1200 mg una vez cada dos semanas a continuación durante hasta 55 semanas como parte de un ensayo clínico de fase 2.

Ejemplo 1. Materiales y métodos

Muestras de orina

La orina recién recogida se mezcló inmediatamente con inhibidores de proteasa. Las concentraciones de varios analitos incluyendo NGAL, cistatina C, clusterina, TIMP-1, microglobulina β_2 , C5b9, C5a y creatinina en orina recogida de los sujetos se inhibieron usando kits disponibles en el mercado como se describe brevemente posteriormente.

Los niveles de NGAL se midieron en orina usando un kit disponible en el mercado (R&D Systems, Minneapolis, MN; número de catálogo: DLCN20). Brevemente, las muestras de orina se diluyeron 1:3 usando un diluyente calibrador proporcionado en el kit RD5-24. Se añadieron 50 μl de cada muestra o control convencional del kit (lipocalina 2 humana recombinante expresada en NS0) a pocillos de una placa de ensayo por duplicado, conteniendo cada pocillo 100 μl de diluyente de ensayo proporcionado en el kit RD1-52. Después de una incubación de dos horas a 4 °C en la nevera, los pocillos se lavaron cuatro veces con 200 μl por pocillo de solución de lavado. Se añadió un conjugado anti NGAL marcado con enzima (peroxidasa de rábano rusticano) a 200 μl por pocillo y se incubó durante dos horas a 4 °C en la nevera. Los pocillos se lavaron cuatro veces con 200 μl por pocillo de solución de lavado y se revelaron añadiendo 200 μl por pocillo de solución de sustrato de TMB proporcionado en el kit (sustrato para la enzima del conjugado anti NGAL) y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos. TMB es un sustrato de peroxidasa de rábano rusticano usado con frecuencia en ELISA. La reacción entre el sustrato y peroxidasa de rábano rusticano (HRP) inmovilizada conjugada con anticuerpos en los pocillos de ELISA produce una solución de color azul. Después de alcanzar la intensidad de color deseada, la reacción se termina por adición de la solución de terminación (ácida), que cambia el color de la solución de azul a amarillo. Por tanto, las reacciones se detuvieron después de la incubación añadiendo 50 μl por pocillo de solución de terminación proporcionada en el kit a cada pocillo y la absorbancia se leyó a 450 nm.

Se midieron los niveles de cistatina C con un kit disponible en el mercado (R&D Systems, Minneapolis, MN; número de catálogo: DSCTC0). Brevemente, se diluyeron muestras de orina 1:3 usando diluyente calibrador proporcionado en el kit RD5-24. Se añadieron 50 μl de cada muestra o control convencional del kit (CysC humano recombinante) a pocillos de una placa de ensayo por duplicado, conteniendo cada pocillo 100 μl de diluyente de ensayo proporcionado en el kit RD1-52. Después de una incubación de dos horas a 4 °C en la nevera, los pocillos se lavaron cuatro veces con 200 μl por pocillo de solución de lavado. Se añadió un conjugado anti CysC marcado con enzima a 200 μl por pocillo y se incubó durante dos horas a 4 °C en la nevera. Los pocillos se lavaron cuatro veces con 200 μl por pocillo de una solución de lavado y se revelaron añadiendo 200 μl por pocillo de solución de sustrato de TMB proporcionado en el kit (sustrato para la enzima del conjugado anti CysC) y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos. Las reacciones se detuvieron después de la incubación añadiendo 50 μl por pocillo de solución de terminación proporcionada en el kit a cada pocillo y se leyó la absorbancia a 450 nm.

Se midieron los niveles de clusterina con un kit disponible en el mercado (R&D Systems, Minneapolis, MN; número de catálogo: DCLU00). Brevemente, se diluyeron muestras de orina 1:3 usando diluyente calibrador proporcionado en el kit RD5T. Se añadieron 50 μl de cada muestra o control convencional del kit (clusterina humana recombinante) a pocillos de una placa de ensayo por duplicado, conteniendo cada pocillo 100 μl de diluyente de ensayo proporcionado en el kit RD1-19. Después de una incubación de dos horas a temperatura ambiente en el agitador orbital ajustado a 500 rpm, los pocillos se lavaron cuatro veces con 200 μl por pocillo de solución de lavado. Se añadió un conjugado anti clusterina marcado con enzima a 200 μl por pocillo y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente en el agitador orbital ajustado a 500 rpm. Los pocillos se lavaron cuatro veces con 200 μl por pocillo de solución de lavado y se revelaron añadiendo 200 μl por pocillo de solución de sustrato TMB y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos. Las reacciones se detuvieron después de la incubación añadiendo 50 μl por pocillo de solución de terminación a cada pocillo y se leyó la absorbancia a 450 nm.

Los niveles de TIMP-1 se midieron con un kit disponible en el mercado (R&D Systems, Minneapolis, MN; número de catálogo: DTM100). Brevemente, se diluyeron muestras de orina 1:2 usando diluyente calibrado proporcionado en el kit RD5P. Se añadieron 50 μl de cada muestra o control convencional del kit (TIMP-1 humana recombinante) a pocillos de una placa de ensayo por duplicado, conteniendo cada pocillo 100 μl de diluyente de ensayo proporcionado en el kit RD1X. Después de una incubación de dos horas a temperatura ambiente en el agitador orbital ajustado a 500 rpm, los pocillos se lavaron tres veces con 200 μl por pocillo de solución de lavado. Se añadió un conjugado anti TIMP-1 marcado con enzima a 200 μl por pocillo y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente en el agitador orbital ajustado a 500 rpm. Los pocillos se lavaron cuatro veces con 200 μl por pocillo de

solución de lavado y se revelaron añadiendo 200 µl por pocillo de solución de sustrato TMB y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos. Las reacciones se detuvieron después de la incubación añadiendo 50 µl por pocillo de solución de terminación a cada pocillo y se leyó la absorbancia a 450 nm.

5 Se midieron los niveles de β2M con un kit disponible en el mercado (R&D Systems, Minneapolis, MN; número de catálogo: DBM200). Brevemente, las muestras de orina se diluyeron 1:10 usando diluyente de muestra proporcionado en el kit. Se añadieron 20 µl de cada muestra, controles de kit o patrones de kit a pocillos por duplicado, que contenían 100 µl de una solución que contenía conjugado anti β2M marcado con enzima. Después de una incubación de una hora a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron seis veces con 200 µl por pocillo de solución de lavado. Los pocillos se revelaron añadiendo 100 µl por pocillo de solución de sustrato TMB y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 minutos. Las reacciones se detuvieron después de incubación añadiendo 100 µl por pocillo de solución de terminación a cada pocillo y se leyó la absorbancia a 450 nm.

15 Se midieron los niveles de creatinina con un kit disponible en el mercado (R&D Systems, Minneapolis, MN; número de catálogo: KGE005). Brevemente, se diluyeron muestras de orina 1:20 usando agua y se añadieron 50 µl de muestras, controles de kit o patrones de kit a pocillos por duplicado, que contenían 100 µl de la solución de picrato alcalina proporcionada en el kit. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 490 nm.

20 Se midieron los niveles de C5b-9 con un kit disponible en el mercado (BD Biosciences, San Jose, CA; número de catálogo: 558315) y un conjunto de reactivo optEIA B (BD Biosciences, San Jose, CA; número de catálogo: 550534). Brevemente, se diluyó un anticuerpo de captura anti C5b-9 1:250 en tampón de recubrimiento, 100 µl del cual se añadieron a cada pocillo de una placa maxisorp de 96 pocillos (Nunc; número de catálogo: 439454) y se incubó durante una noche a 4 °C en la nevera. Los pocillos se lavaron tres veces con 200 µl por pocillo de solución de lavado y se bloquearon añadiendo 200 µl por pocillo de diluyente de ensayo proporcionado en el kit durante una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con 200 µl por pocillo de solución de lavado y se añadieron 100 µl de muestras de orina o patrones de kit a pocillos por duplicado. Después de una incubación de dos horas a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron tres veces con 200 µl por pocillo de solución de lavado. Se añadieron 100 µl de la solución de trabajo de anticuerpos detectores de C5b-9 proporcionada en el kit a cada pocillo y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron siete veces con 200 µl por pocillo de solución de lavado y se revelaron añadiendo 100 µl por pocillo de solución de sustrato TMB y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos. Las reacciones se detuvieron después de la incubación añadiendo 50 µl por pocillo de una solución de terminación a cada pocillo y se leyó la absorbancia a 450 nm.

35 Los niveles de C5a se midieron con un kit disponible en el mercado (BD Biosciences, San Jose, CA; número de catálogo: 557965). Brevemente, se añadieron 100 µl de muestras de orina o patrones de kit a pocillos por duplicado que contenían 50 µl de diluyente de ELISA proporcionado en el kit. Después de una incubación de dos horas a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron cinco veces con 200 µl por pocillo de solución de lavado. Se añadieron 100 µl de la solución de trabajo de anticuerpos detectores de C5a proporcionada en el kit a cada pocillo y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron siete veces con 200 µl por pocillo de solución de lavado y se revelaron añadiendo 100 µl por pocillo de solución de sustrato TMB y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos. Las reacciones se detuvieron después de la incubación añadiendo 50 µl por pocillo de solución de terminación a cada pocillo y se leyó la absorbancia a 450 nm.

45 Plasma

Se prepararon muestras de plasma de la siguiente manera. Se recogió sangre en un tubo BD™ P100 de 10 ml (Becton Dickinson) que contenía EDTA. Se centrifugó sangre completa no más de 60 minutos después de la recogida en una centrífuga refrigerada (ajustada para mantener 4-8 °C) durante 10 minutos a 3.000 rpm. A continuación se obtuvo plasma de la muestra después de la centrifugación. Se descartaron muestras hemolizadas.

La concentración de varios analitos incluyendo Ba, fragmento de protrombina 1+2, trombomodulina, vWF, sC5b-9 y C5a en fracciones de plasma de sangre recogida de los sujetos se midió usando kits disponibles en el mercado como se describe brevemente posteriormente.

55 Se midieron los niveles de Ba con un kit disponible en el mercado (Quidel, San Diego, CA; número de catálogo: A033). Brevemente, los pocillos de una placa de ensayo se lavaron tres veces con solución de lavado. Se diluyeron muestras de plasma 1:1.000 con diluyente de muestra de ensayo proporcionado en el kit y se añadieron 100 µl de las muestras de plasma diluidas, controles y patrones de kit a pocillos por duplicado. Después de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron cinco veces con 200 µl por pocillo de solución de lavado. Se añadieron 100 µl de un conjugado de anticuerpo anti Ba marcado con enzima a cada pocillo y se incubó durante sesenta minutos a temperatura ambiente. Después de cinco lavados con solución de lavado, se añadieron 100 µl de sustrato de TMB a cada pocillo y se incubó durante quince minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. La reacción se detuvo con la adición de 100 µl por pocillo de solución de terminación y se leyó la absorbancia a 450 nm.

65 Se midieron los niveles de fragmento de protrombina 1+2 en plasma con EDTA con el kit Enzygnost F1+2 (Siemens

- Healthcare; número de catálogo: OPBD03). Brevemente, se diluyeron muestras de plasma 1:2 con tampón de muestras y se añadieron 50 µl de las muestras diluidas, o patrón (que contenía una concentración conocida de fragmento de protrombina 1+2 humana recombinante) a los pocillos. Después de una incubación de 30 minutos a 37 °C, los pocillos se lavaron tres veces con 200 µl por pocillo de solución de lavado. Se añadieron 100 µl de un conjugado de anticuerpo anti fragmento de protrombina 1+2 marcado con enzima a cada pocillo y se incubó durante 15 minutos a 37 °C. Después de tres lavados adicionales, se añadieron 100 µl de sustrato cromogénico a cada pocillo y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de solución de terminación a cada pocillo y se leyó la absorbancia a 450 nm.
- 10 Se evaluaron los niveles de trombomodulina (TM) en plasma con EDTA con el kit de ELISA de TM (American Diagnostica, Stamford, CT; número de catálogo: 837). Brevemente, se diluyeron muestras de plasma 1:4 con tampón de muestras y se añadieron 200 µl de muestras diluidas o patrón (que contenía una concentración conocida de TM recombinante) a los pocillos. Después de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, se lavaron los pocillos de la placa de ensayo cuatro veces con 200 µl/pocillo de solución de lavado. Se añadió una solución de un anticuerpo anti TM marcado con enzima (200 µl por pocillo) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de 4 lavados, se añadieron 200 µl de sustrato a cada pocillo y los pocillos se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. La reacción se detuvo con 100 µl de H₂SO₄ 0,5 M y se midió la absorbancia a 450 nm.
- 20 Se determinaron los niveles de actividad del factor de von Willebrand (vWF) en plasma con EDTA por un kit de ELISA utilizando anticuerpo de captura específico para sitios de unión a colágeno de vWF (American Diagnostica; número de catálogo: 885). Se diluyeron muestras de plasma y controles de kit 1:20 con diluyente de ensayo y se añadieron 100 µl de las muestras diluidas y los controles a pocillos por duplicado. Después de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron 5 veces con solución de lavado y se añadieron 100 µl de un conjugado anti vWF marcado con enzima a cada pocillo. Los pocillos se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 5 veces con solución de lavado. Se añadieron 100 µl de sustrato de TMB (que, tras la escisión por la enzima, genera una señal detectable) a cada pocillo. Los pocillos se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz seguido de la adición de 100 µl de solución de terminación proporcionada en el kit a cada pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm en un periodo de 30 minutos desde la adición de solución de terminación.
- 35 Se determinaron los niveles en circulación de sC5b-9 con un conjunto de ELISA de C5b-9 humano (BD Biosciences, San Diego, CA; número de catálogo: 558315) y un conjunto de reactivos optEIA BD B (BD Biosciences; número de catálogo: 550534). Brevemente, se diluyó un anticuerpo de captura anti C5b-9 1:250 en tampón de recubrimiento proporcionado en el kit, 100 µl del cual se añadieron a pocillos de una placa maxisorp de 96 pocillos (Nunc) y se incubó durante una noche a 4 °C. Después de tres lavados en solución de lavado, los pocillos se bloquearon con 200 µl de diluyente de ensayo proporcionado en el kit durante una hora a temperatura ambiente. Después de 3 lavados más con solución de lavado, se añadieron 100 µl de las muestras de plasma (diluidas 1:100 en diluyente de ensayo) o patrones (que contenían una concentración conocida de sC5b-9 purificada) y se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con solución de lavado y se añadieron 100 µl de detector de trabajo (que contenía un anticuerpo de detección anti C5b-9 marcado con biotina y peroxidasa de rábano rusticano marcada con estreptavidina diluida 1:250 en diluyente de ensayo) a cada pocillo. Después de una incubación de una hora a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron siete veces con solución de lavado y se añadieron 100 µl de soluciones de TMB de sustrato a cada pocillo. Se permitió que la reacción se desarrollara durante 30 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. Después de la adición de 50 µl de solución de terminación a cada pocillo, se determinó la absorbancia a 450 nm.
- 50 Se determinaron los niveles en circulación de C5a con un ELISA de tipo sándwich utilizando el conjunto de reactivos optEIA BD B (BD Biosciences; número de catálogo: 550534). Todas las incubaciones se realizaron en presencia de futano (BD Biosciences; número de catálogo: 550236). Brevemente, se diluyó un anticuerpo de captura anti C5a a 2 µg/ml en tampón de recubrimiento proporcionado en el kit, 100 µl del cual se añadieron a pocillos de una placa maxisorp de 96 pocillos (Nunc) seguido de una incubación durante una noche a 4 °C. Después de tres lavados en solución de lavado, los pocillos se bloquearon con 200 µl de diluyente de ensayo durante una hora a temperatura ambiente. Después de 3 lavados más con solución de lavado, se añadieron 50 µl de muestras de plasma (diluidas 1:5 en diluyente de ensayo) o patrones (que contenían una concentración conocida de C5a) y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 4 veces con solución de lavado y se añadieron 100 µl de detector de trabajo añadiendo a cada pocillo (que contenía un anticuerpo de detección anti C5a marcado con biotina y peroxidasa de rábano rusticano marcada con estreptavidina diluida 1:250 en diluyente de ensayo). Después de una incubación durante una hora a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron siete veces con solución de lavado y se añadieron 100 µl de soluciones de TMB de sustrato a cada pocillo. Se permitió que la reacción se desarrollara durante 30 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. Después de la adición de 50 µl de solución de terminación a cada pocillo, se midió la absorbancia a 450 nm.

Suero

- 65 Se procesaron muestras de suero de la siguiente manera. Se recogió sangre en un tubo separador de suero (SST)

vacutainer de 10 ml. El tubo se invirtió cinco veces y se permitió que la sangre se coagulara a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos, pero no más de dos horas. El tubo se sometió a centrifugación a 1.800 rcf con el freno puesto. Se descartaron las muestras hemolizadas.

- 5 Se llevó a cabo la determinación cuantitativa de diversos analitos en suero usando kits de conjuntos Flex de matriz de perlas citométricas (CBA) humanos (conjunto Flex CBA; Becton Dickinson Biosciences, San Diego, CA), y se adquirieron por citómetro en flujo (FACS LSR II, Becton Dickinson) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una perla de captura de conjunto Flex es una única población de perlas con intensidad de fluorescencia definida y está recubierta con un anticuerpo de captura específico para una proteína soluble. A cada población de perlas se le proporciona una designación de posición alfanumérica, que indica su posición en relación con otras perlas en el sistema del conjunto Flex CBA BD. Pueden combinarse perlas con diferentes posiciones en ensayos para crear un ensayo múltiple. En un ensayo de conjunto Flex la perla de captura, el reactivo de detección conjugado con PE y el patrón o las muestras de ensayo se incuban juntas para formar complejos de tipo sándwich.
- 10
- 15 Brevemente, se mezclaron patrones para cada analito y se realizó una dilución en serie usando el diluyente de ensayo. Se prepararon perlas de captura para cada analito y se agruparon usando diluyente de perlas de captura para suero/plasma. Las muestras de suero se diluyeron apropiadamente y junto con los patrones se incubaron con las perlas de captura mixtas en un volumen total de 100 µl durante una hora a temperatura ambiente. Se mezclaron reactivos de ficoeritrina (PE) de detección para todos los analitos y se añadieron a los tubos (50 µl). Las muestras se lavaron con tampón de lavado después de una incubación de dos horas a temperatura ambiente en oscuridad y se adquirieron por citómetro de flujo después de reconstitución del sedimento en el tampón de lavado.
- 20

Se incubaron los siguientes conjuntos de perlas con muestras de suero diluidas 1:4 en diluyente de ensayo proporcionado en el kit (en el que la proteína biomarcadora especificada indica el anticuerpo de captura conjugado con la perla): IFN-γ (Perla E7; número de catálogo: 558283); IL-12 p70 (Perla E5; número de catálogo: 558283); IL-1β (Perla B4; número de catálogo: 558279); IL-6 (Perla A7; número de catálogo: 558276); IL-8 (Perla A9; número de catálogo: 558277); CXCL-9 (Perla E8; número de catálogo: 558286); CXCL-10 (Perla B5; número de catálogo: 558280); MCP-1 (Perla D8; número de catálogo: 558287); VEGF (Perla B8; número de catálogo: 558336); y sCD40L (Perla C7; número de catálogo 560305). Los siguientes conjuntos de perlas se incubaron con muestras de suero diluidas 1:50 en diluyente proporcionado en el kit: ICAM-1 (Perla A4; número de catálogo: 560269); VCAM-1 (Perla D6; número de catálogo: 560427); TNFR1 (Perla C4; número de catálogo: 560156); E-selectina (Perla D9; número de catálogo: 560419); P-selectina (Perla D7; número de catálogo: 560426); y CCL5 (Perla D4; número de catálogo: 558324).

25

30

35 Ejemplo 2: Resultados

Marcadores de la activación del complemento continuada

40 Como se resume en la Tabla 2 a continuación, en relación con la concentración en una muestra de líquido biológico de voluntarios sanos, la concentración en plasma de componente del complemento Ba y sC5b9 y la concentración en orina de C5a y sC5b-9 estaban elevadas en la mayoría de pacientes con SUHa. Véase también Fig. 1.

Tabla 2.

Proteína biomarcadora de SUHa	n/N (%) elevado en línea basal	P valor
Ba en plasma	35/35 (100,0)	<0,0001
SC5b-9 en plasma	37/38 (97,4)	<0,0001
C5a en orina	26/29 (89,7)	0,0007
SC5b-9 en orina	23/27 (85,2)	0,0025

* "N" indica el número total de pacientes evaluados para un biomarcador dado, y "n" indica el número de los "N" pacientes con niveles elevados de la proteína biomarcadora.

45 Estos resultados indican que se está produciendo una activación significativa del complemento de la ruta alternativa sistémica en pacientes con SUHa.

Después del tratamiento con eculizumab, los niveles medios (concentraciones) de estos biomarcadores de SUHa se redujeron (Figs. 1A-C). Los niveles medios de C5 y sC5b-9 en orina se redujeron significativamente a entre 1 y 2,5 semanas después del inicio del tratamiento y permanecieron así. El porcentaje de reducción medio en los niveles de C5a en orina fue mayor del 40 % a la semana 3 después del tratamiento y más del 70 % a la semana 6 (Fig. 1D). Los niveles de sC5b-9 en orina se redujeron en más del 60 % a la semana 3 (Fig. 1E). Estos marcadores se normalizaron con el tiempo. Los niveles de Ba en plasma también se redujeron significativamente (p = 0,0053) a aproximadamente de cuatro a seis semanas después del tratamiento con eculizumab, lo que sugiere que con el tiempo eculizumab reduce el inicio o la amplificación de la ruta del complemento clásica (Fig. 1C). Sin embargo, el porcentaje de reducción medio en niveles de Ba en plasma fue de aproximadamente el 10 % a la semana 6 y más del 30 % a la semana 12 (Fig. 1F).

50

55

El porcentaje de pacientes con SUHa tratados que experimentan niveles de proteína biomarcadora del complemento normalizados a lo largo del tiempo se muestran en las Figs. 2A-C. Por ejemplo, como se muestra en la Fig. 2B, el 50 % de pacientes con SUHa tratados muestran niveles normalizados de sC5b-9 en orina a las 2,5 semanas después del inicio del tratamiento con eculizumab. A las 17 semanas después del inicio de tratamiento, el 79 % de los pacientes con SUHa tratados mostraron niveles de sC5b-9 normalizados. Sin embargo, los niveles de BA no se normalizan en la mayoría de los pacientes (Figs. 1C y 2C). Estos datos indican que incluso con terapia de eculizumab puede haber, en algunos pacientes, activación del complemento continuada de bajo nivel.

Marcadores de activación de plaquetas y hemostática

Como se resume en la Tabla 3 a continuación, en relación con la concentración en una muestra de líquido biológico de voluntarios sanos, la concentración en suero de sCD40L y los niveles en plasma de fragmento de protrombina 1+2 y de D-dímero estuvieron significativamente elevados en la mayoría de pacientes con SUHa. Véase también Figs. 3A-B.

Tabla 3.

Proteína biomarcadora de SUHa	n/N (%) elevado en línea basal	P valor
sCD40L	36/38 (94,7)	<0,0001
Fragmento de protrombina F1+2	36/38 (94,7)	<0,0001
D-dímero	34/36 (94,4)	=0,0002

* "N" indica el número total de pacientes evaluados para un biomarcador dado, y "n" indica el número de los "N" pacientes con niveles elevados de la proteína biomarcadora.

La liberación de sCD40L está generalmente asociada con el metabolismo y la actividad plaquetarios. Se generan fragmentos de protrombina F1+2 durante la conversión de protrombina a trombina, mientras que el D-dímero es un producto de degradación de fibrina que indica fibrinólisis.

Después del tratamiento con eculizumab, se redujeron los niveles medios (concentraciones) de estos biomarcadores de SUHa. Los niveles medios de niveles en plasma de F1+2 y D-dímero se redujeron significativamente a entre 1 y 2,5 semanas (p= 0,0078 y 0,0083, respectivamente) después del inicio del tratamiento y permanecieron así. Como se muestra en la Fig. 3C, el porcentaje de reducción medio en F1+2 fue de aproximadamente el 15 % a la semana 3 y más del 50 % a la semana 12. El porcentaje de reducción medio en los niveles de D-dímero fue de aproximadamente 40 % a la semana 6, pero mayor del 60 % a la semana 12. Estos datos indican que la terapia de eculizumab tiene un efecto inmediato en las rutas de coagulación y fibrinólisis. Como se muestra en Figs. 4A-B, el 32 % de los pacientes con SUHa tratados muestran normalización de niveles de F1+2 a la semana 26 después del inicio de tratamiento y el 46 % de los pacientes tienen niveles normalizados de D-dímero. Por el contrario, los niveles de sCD40L permanecieron elevados a lo largo del estudio.

Marcadores de daño y/o activación de células endoteliales

Como se resume en la Tabla 4 a continuación, en relación con la concentración en una muestra de líquido biológico de voluntarios sanos, la concentración en plasma de trombomodulina y vWF y la concentración en suero de VCAM-1 estaban significadamente elevadas en pacientes con SUHa. Véase también Figs. 5A-C.

Tabla 4.

Proteína biomarcadora de SUHa	n/N (%) elevado en línea basal	P valor
Trombomodulina	33/34 (97,1)	<0,0001
VCAM-1	36/38 (94,7)	<0,0001
Antígeno de factor de Von Willebrand	15/38 (39,5)	<0,02

* "N" indica el número total de pacientes evaluados para un biomarcador dado, y "n" indica el número de esos "N" pacientes con niveles elevados de la proteína biomarcadora, n.s. indica no significativo.

Una alta concentración de trombomodulina y VCAM-1 en líquidos biológicos de pacientes con SUHa indica activación significativa de células endoteliales. La trombomodulina se libera en respuesta a C3a, que subraya adicionalmente la activación del complemento continuada en pacientes con SUHa. La concentración de vWF también está significativamente elevada. vWF tiene varios papeles fisiológicos incluyendo adhesión de plaquetas y coagulación y también es un marcador de daño y activación endotelial.

Después del tratamiento con eculizumab, se redujeron los niveles medios (concentraciones) de estos biomarcadores de SUHa (Figs. 5A-C). Los niveles medios de trombomodulina y VCAM-1 se redujeron significativamente desde la línea basal en la semana 17 (p=0,0007 y <0,0001, respectivamente) después del inicio del tratamiento (véase Figs. 6C y 6D). A la semana 26, los niveles de VCAM-1 y vWF también se habían reducido. Sin embargo, aunque vWF se normalizó en aproximadamente el 70 % de los pacientes con SUHa tratados a la semana 17 después del inicio del tratamiento (Fig. 6B), los niveles de trombomodulina y VCAM-1 permanecieron elevados. Resulta interesante que del 10 % de los pacientes que normalizaron los niveles de trombomodulina (Fig. 6A), solamente un paciente tuvo

niveles tanto de trombomodulina como de vWF normalizados. Estos datos indican que la terapia con eculizumab tiene un efecto positivo rápido y robusto para corregir el daño y activación de células endoteliales.

Marcadores de inflamación

5 La Tabla 5 (a continuación) expone una serie de analitos detectados en plasma y/o suero e indica el porcentaje de pacientes con SUHa en los que los analitos respectivos estaban elevados antes del tratamiento con terapia inhibidora del complemento.

10

Tabla 5

Proteína biomarcadora de SUHa	n/N (%) elevado en línea basal	P valor
CXCL10 en suero	23/38 (60,5)	P<0,0001
CXCL9 en suero	33/38 (86,8)	P<0,0001
IL-18	19/38 (50,0)	P<0,0001
MCP-1	34/38 (89,5)	P<0,0001
TNFR1	38/38 (100,0)	P<0,0001
VEGF	25/38 (65,8)	P<0,0001
IL-6	21/34 (61,8)	P=0,0019
CCL5	4/38 (10,5)	P=0,0045
IFN- γ	5/34 (14,7)	P=0,0353
IL-8	22/38 (57,9)	n.s. (P=0,0640)
ICAM-1	2/34 (5,9)	n.s
IL-1 β	1/38 (2,6)	n.s
IL-12p70	2/34 (5,9)	n.s

* "N" indica el número total de pacientes evaluados para un biomarcador dado, y "n" indica el número de esos "N" pacientes con niveles elevados de la proteína biomarcadora.
 ** Las concentraciones de los dos analitos marcados como "suero" se midieron en suero. Las concentraciones de todos los otros analitos en la tabla se midieron en plasma. n.s. indica no significativo.

15

20

25

30

Antes de la terapia con eculizumab, los pacientes con SUHa tuvieron niveles elevados de citocinas y quimiocinas inflamatorias en circulación incluyendo, por ejemplo, CXCL-10, CXCL-9, IL-18, TNFR1, MCP-1, VEGF, IL-6 e IL-8. Después del inicio del tratamiento, sin embargo, TNFR1 era el marcador inflamatorio más temprano en reducirse significativamente (a la semana 6, $p=0,0012$) (Fig. 7A). La concentración media de TNFR1 permaneció significativamente menor que la línea basal en todas las visitas posteriores ($P<0,0001$), pero solamente se normalizó en el 6 % de los pacientes con SUHa (Fig. 7B). De forma similar, los niveles medios de CXCL10 se redujeron significativamente a la semana 26 ($p=0,0055$), pero no se normalizaron en todos los pacientes con SUHa (31 % de los pacientes no se normalizaron). A la semana 26, los niveles medios de IFN- γ se normalizaron en aproximadamente 50 % de los pacientes; sin embargo, sin embargo, los niveles medios de IL-8 ($p=0,01$), CXCL-9 ($p=0,01$), IL-18 ($p<0,0001$) y VEGF ($p<0,0001$) en suero permanecieron elevados en la mayoría de pacientes con SUHa, en comparación con controles normales, y no fueron significativamente diferentes con respecto a la línea basal. IL-6 en suero se redujo significativamente ($p=0,04$) desde la línea basal a la semana 26 y permaneció elevada a la semana 26 en comparación con el control normal.

Por el contrario, los niveles medios de CCL-5 se elevaron significativamente a la semana 17 después del inicio del tratamiento y a continuación ($p=0,0072$ y $0,0021$ en las semanas 12-17 y la semana 26, respectivamente). En respuesta a lesión vascular en ratones, CCL5 está regulado positivamente, lo que promueve la infiltración en células T selectiva como parte de una respuesta de curación de heridas vasculares. Véase, por ejemplo, Rookmaaker *et al.* (2007) *Am J Physiol Renal Physiol* 293(2): F624-630. Estos datos indican que la terapia con eculizumab tiene un efecto positivo rápido y robusto en la inflamación de muchos pacientes con SUHa, pero que puede existir inflamación de nivel bajo en estos pacientes incluso durante el tratamiento.

35

Marcadores de lesión renal tubular y glomerular

La Tabla 6A (a continuación) expone una serie de analitos detectados en orina recogida de pacientes e indica el porcentaje de pacientes con SUHa en los que los analitos respectivos estaban elevados antes del tratamiento con terapia inhibidora del complemento.

40

Tabla 6A.

Biomarcador	n/N (%) elevado en línea basal	P valor
Microglobulina beta-2 ($\beta 2M$)	20/28 (71,4)	P<0,0001
Clusterina	24/29 (82,8)	P<0,0001
Cistatina C	18/29 (62,1)	P=0,0002
TIMP-1	22/29 (75,9)	P=0,0003
FABP-1	22/29 (75,9)	P=0,0130
NGAL	5/29 (17,2)	P=0,0151

Biomarcador	n/N (%) elevado en línea basal	P valor
NAG	3/23 (13,0)	P=0,0413
CXCL10	2/29 (6,9)	n.s.
CXCL9	2/29 (6,9)	n.s.
KIM-1	2/29 (6,9)	n.s.

* "N" indica el número total de pacientes evaluados para un biomarcador dado, y "n" indica el número de esos "N" pacientes con niveles elevados de la proteína biomarcadora. n.s. indica no significativo.

Antes del tratamiento con eculizumab, las moléculas de bajo peso molecular que normalmente son filtradas por el riñón estaban elevadas en la orina de pacientes con SUHa incluyendo β 2M, clusterina, cistatina C y NAG. Las moléculas producidas por células epiteliales tubulares renales en respuesta a lesión también estaban elevadas, tales como TIMP-1, NGAL y L-FABP. Sin embargo, después del tratamiento con eculizumab, CysC ($p=0,0012$) (Fig. 8A), clusterina ($p=0,0446$) y TIMP-1 ($p=0,0353$) se reducen significativamente a 1-2,5 semanas después del inicio de tratamiento y permanecieron significativamente reducidas a lo largo del transcurso del estudio. NGAL ($p=0,0003$) (Fig. 8C), L-FABP ($p=0,0366$) y NAG ($p=0,0369$) se redujeron significativamente desde la línea basal a las 4-6 semanas después del inicio del tratamiento y permanecieron así a continuación. β 2M se redujo significativamente a las 12-17 semanas ($p=0,0008$) y en lo sucesivo (Fig. 8B). En la semana 26, los niveles medios en orina de todos los analitos se habían normalizado en los pacientes con SUHa tratados.

Estos datos indican que la terapia con eculizumab tiene un efecto positivo rápido, robusto y duradero que repara la lesión renal tubular y glomerular experimentada por muchos pacientes con SUHa.

Sumario

La siguiente tabla proporciona un sumario de biomarcadores de SUHa ejemplares (aunque no una lista exhaustiva), que están elevados en pacientes con SUHa antes del tratamiento con eculizumab, pero que están significativamente reducidos después del tratamiento con eculizumab. También se proporciona en la tabla (Tabla 6B) el tiempo promedio después del inicio del tratamiento con eculizumab en el que se produjo reducción significativa del biomarcador de SUHa.

Tabla 6B.

Biomarcador	Semana 1-2,5	Semana 4-6	Semana 12-17	Semana 26
U-C5a	X			
U-C5b-9	X			
F1+2	X			
D-dímero	X			
U-Cys-C	X			
U-TIMP-1	X			
Ba en plasma		X		
TNFR1		X		
U-CLU		X		
U-NGAL		X		
Trombomodulina			X	
VCAM			X	
L-FABP			X	
B2M			X	
CXCL10				X
IFN- γ				X

Niveles de marcador de SUHa de línea basal en pacientes con SUHa que reciben diálisis y/o reciben trasplante de riñón

También se evaluó la concentración del complemento, inflamación y marcadores de lesión renal en plasma y orina en pacientes con SUHa que recibieron diálisis antes de terapia con eculizumab. Como se muestra en la Tabla 7 (a continuación), la concentración media de TNFR1 en suero, Ba en plasma, C5b9, fragmentos de protrombina 1+2, β 2M, clusterina, sC5b9, TIMP-1, NGAL, CysC y C5a estuvo significativamente elevada en pacientes con SUHa que se sometieron a diálisis repetida (por ejemplo, dos o más veces en los 6 meses previos a tratamiento) en comparación con pacientes con SUHa que no experimentaron diálisis repetida antes de su inclusión en el estudio (antes del tratamiento). Véase también Figs. 9A-E.

Tabla 7.

Analito	Mayor con diálisis repetida
TNFR1 (suero)	$p=<0,0001$
β 2m (en orina)	$p=0,0009$

Análito	Mayor con diálisis repetida
Clusterina (en orina)	p=0,0020
Ba (plasma)	p= 0,0021
C5b-9 (en orina)	p= 0,0042
TIMP-1 (en orina)	p= 0,0070
NGAL (en orina)	p= 0,0110
CysC (en orina)	p= 0,020
F1+2 (plasma)	p=0,0191
C5b-9 (plasma)	p=0,0476
C5a (en orina)	p=0,0477

** La concentración del analito marcado "suero" se midió en suero. La concentración de analitos designados con "en orina" se midieron en orina, mientras que la concentración de analitos marcados con "plasma" se midieron en plasma obtenido de los pacientes.

Además, los pacientes con SUHa que habían recibido un trasplante de riñón antes del tratamiento con eculizumab tuvieron menor C5b-9 en orina y FABP-1 en orina en línea basal en comparación con pacientes que no habían recibido un trasplante de riñón.

5

Niveles de marcador de SUHa de línea basal frente a marcadores de TMA

Los niveles de algunos biomarcadores asociados con SUHa en algunos pacientes con SUHa se correlacionaron con marcadores de microangiopatía trombótica (TMA) anómalos tales como recuentos plaquetarios reducidos, LDH elevada y niveles de haptoglobina aumentados. Por ejemplo, los pacientes con SUHa con recuentos plaquetarios reducidos en línea basal (<150.000 por μ l de sangre), mostraron niveles elevados de cistatina C en orina (P=0,0276) y clusterina en orina (P=0,0401). Véase Figs. 14A-B. Los pacientes con SUHa que tenían niveles de LDH elevados mostraron niveles aumentados de VCAM-1 (P=0,0226) (Fig. 14C), d-dímero (P=0,0369) (Fig. 14D), IL-18, trombomodulina y TNFR1 (véase posteriormente). En pacientes con SUHa que tenían niveles de IL-18 elevados estaban con frecuencia presentes niveles elevados de haptoglobina.

10

15

Niveles de marcador de SUHa de línea basal en pacientes con SUHa que reciben terapia de plasma

Los pacientes con SUHa con terapia de plasma repetida antes del tratamiento con eculizumab mostraron mayores niveles medios de cistatina C en orina en línea basal (véase Fig. 15).

20

Correlaciones entre niveles de biomarcador y parámetros clínicos

Plaquetas

25

Un nivel elevado de CCL5 se correlacionó positivamente con mayores recuentos plaquetarios en línea basal (p=<0,0001; cc (coeficiente de correlación) = 0,8106). Un nivel elevado de sCD40L también se correlacionó con mayores recuentos plaquetarios en línea basal (p=<0,001; cc=0,6313).

30

Además, los pacientes con niveles de Ba normalizados después del tratamiento con eculizumab muestran aumentos plaquetarios significativamente mayores que pacientes cuyos niveles de Ba permanecen elevados después del tratamiento. Véase Fig. 13.

Tasa de filtración glomerular estimada (eGFR), LDH y complemento en orina

35

También se observó una correlación entre los niveles de Ba en plasma elevados y eGFR reducido (p<0,0001; cc= -0,7219). Una concentración elevada de TNFR1 en suero de pacientes con SUHa antes del tratamiento se correlacionó con niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) (p= 0,027; cc=0,3586), pero se correlacionó más significativamente con eGFR menor (p<0,0001; cc= -0,6134). Además, los mayores niveles de componentes del complemento en orina C5a y sC5b-9 y marcadores de lesión renal (β 2M, clusterina, cistatina C, NGAL y TIMP-1) se correlacionaron moderadamente con eGFR menor (p=0,0002 a 0,0242; cc= -0,4286 a -0,6714).

40

Los niveles elevados de sC5b-9, clusterina y TIMP-1 en orina se correlacionaron modestamente con proteinuria (p=0,0086 a 0,0284; cc = 0,40 a 0,4788), mientras que los niveles elevados de Ba en plasma (p=0,0017; cc = 0,517), β 2M, clusterina, sC5b-9 en orina y cistatina C se correlacionaron con creatinina aumentada en la orina de pacientes antes del tratamiento con eculizumab (p=0,0440-0,0018; cc = 0,3982-0,6457).

45

Primera presentación clínica de SUHa

50

También se observó una correlación entre los pacientes que experimentaban su primera manifestación de SUHa y niveles de D-dímero en plasma o FABP-1 en orina significativamente elevados en línea basal (antes del tratamiento con eculizumab) (véase Tabla 8).

Tabla 8.

Biomarcador	Biomarcador elevado (% n)		p-valor
	Manifestación de SUHa individual	Manifestaciones múltiples	
D-dímero en plasma (µg/l)	27 (100,0)	7 (77,8)	0,0571
FABP-1 en orina (ng/mg normalizado con respecto a creatinina)	19 (90,5)	3 (37,5)	0,0079

Enfermedad latente

5 Seis de los pacientes con SUHa implicados en el estudio presentaron en el momento de inclusión parámetros hematológicos normalizados (incluyendo niveles de haptoglobina, LDH y plaquetas). Sin embargo, estos pacientes aún mostraron pruebas de inflamación crónica y activación del complemento a pesar de una imagen clínica estable. Los pacientes tuvieron niveles significativamente elevados de TNFR1 en suero (como se muestra en la Fig. 10A) así como niveles significativamente elevados de trombosmodulina, Ba (Fig. 10B), fragmentos de protrombina 1+2 (Fig. 10E), VCAM-1 (Fig. 10C) y d-dímero (Fig. 10D). De forma similar, los pacientes con niveles plaquetarios normales (>150 x 10⁹ plaquetas/µl) en línea basal aún muestran niveles elevados de la mayoría de los biomarcadores (por ejemplo, Ba (Fig. 10F), VCAM-1 (Fig. 10G), D-dímero (Fig. 10H) y F1+2 (Fig. 10I)). Tomados juntos, estos hallazgos indican que, incluso para el subconjunto de pacientes con SUHa que se considera que están en remisión clínica después del tratamiento, probablemente haya niveles bajos continuados de actividad del complemento, coagulopatía e inflamación.

Correlaciones entre niveles de biomarcadores y resultados clínicos

Respuestas hematológicas

20 Los pacientes con respuestas hematológicas completas muestran reducciones más drásticas de TNFR1, clusterina en orina y niveles de complemento en orina (C5a y C5b-9) (Fig. 11). Por ejemplo, el 86 % de los pacientes que muestran una concentración reducida de estas proteínas biomarcadoras de SUHa obtuvieron una respuesta hematológica completa (normalización de plaquetas y LDH) en las semanas 12-17 después del inicio del tratamiento con eculizumab. Además, estos pacientes mostraron una mayor reducción de porcentaje media de TNFR1 en suero, clusterina en orina, C5a en orina y C5b-9 en orina que los pacientes que no consiguieron una respuesta hematológica completa.

30 También se observó que la rapidez de reducción de TNFR1 (por ejemplo, a la semana 12 en comparación con la semana 17 o más allá) se correlacionó con una respuesta hematológica completa (p=0,0008). La tasa de normalización de D-dímero se asoció significativamente con una respuesta hematológica completa (p= 0,0109; cc= 6,26).

35 Además, los datos muestran que se consiguió un aumento significativamente mayor de recuentos plaquetarios en las semanas 12-17 (p=0,0022) y la semana 26 (p=0,0110) en pacientes con SUHa tratados con eculizumab que tienen (en las semanas 12-17 y la semana 26, respectivamente) concentraciones de Ba en plasma normalizadas. La mejora de plaquetas también se correlacionó con una reducción significativa de los niveles de F1+2 medios en la semana 4-6 (P=0,0148; cc= -0,4087) y la semana 12-17 (P=0,0073; cc = - 0,4396) y más modestamente con una reducción de los niveles de d-dímero en la semana 12-17 (P=0,0470; cc = - 0,3381). No obstante, un subconjunto de pacientes, a pesar de demostrar un mayor aumento de recuentos plaquetarios en las semanas cuatro a 26, continuaron mostrando niveles significativamente elevados de fragmentos de protrombina 1+2, trombosmodulina, β2M en orina, clusterina, TIMP-1 y cistatina C, lo que sugiere actividad de enfermedad subyacente continuada.

45 El análisis de los datos recogidos del estudio también reveló una correlación entre el cambio en otra concentración de proteína biomarcadora y recuperación de plaquetas. Por ejemplo, la concentración de CCL5, MCP-1 y sCD40L se correlacionó positivamente con recuentos plaquetarios aumentados en pacientes tratados con eculizumab como se muestra en Tabla 9 a continuación.

Tabla 9.

Semana después del inicio del tratamiento con eculizumab	Biomarcador	P-valor	Coefficiente de correlación
1-2,5	CCL-5	p<0,0001	0,7419
	sCD40L	P=0,0141	0,3950
	VEGF	P=0,0014	0,5002
4-6	CCL-5	p<0,0001	0,7743
	sCD40L	p<0,0001	0,6818
	MCP-1	P=0,0114	0,4169
12-17	CCL5	P=0,0003	0,5656

Semana después del inicio del tratamiento con eculizumab	Biomarcador	P-valor	Coefficiente de correlación
26	CCL-5 sCD40L	p<0,0001 P=0,0012	0,7845 0,5398

Trombomicroangiopatía (TMA)

Los pacientes con SUHa tratados con Eculizumab que tienen una mayor reducción de niveles de Ba en plasma consiguieron más frecuentemente una respuesta de TMA completa (por ejemplo, la normalización de parámetros hematológicos (por ejemplo, recuento plaquetario y niveles de LDH) y conservación de la función renal). Por ejemplo, el 72,7 % de los pacientes obtuvieron una respuesta de TMA completa a las semanas 12-17 y el 85,29 % de los pacientes consiguieron una respuesta de TMA completa a la semana 26. Como se muestra en la Fig. 12, estos pacientes mostraron un mayor porcentaje de reducción medio en la concentración de Ba en plasma que los pacientes que no obtuvieron una respuesta de TMA completa (p=0,0018 y p=0,006, respectivamente).

eGFR después del tratamiento

También se observó una relación entre la reducción y/o normalización de ciertos biomarcadores y una mejora de eGFR. Por ejemplo, se observó una mejora significativamente mayor (Tabla 10) en eGFR (por ejemplo, eGFR ≥ 15 ml/min/1,73 m² mantenido durante al menos dos mediciones consecutivas obtenidas con al menos cuatro semanas de diferencia) entre pacientes con MCP-1, IL-6 e IFN- γ normalizados (en las semanas 4-6); VCAM-1, CXCL10, CXCL9 y Ba normalizados (en las semanas 12-17) y Ba, β 2M en orina, CysC en orina, vWF, D-dímero, clusterina, CXCL10, CXCL9, FABP-1 en orina y otros normalizados (en la semana 26) (Tabla 10). Véase también Fig. 16.

Tabla 10.

Semana después del inicio del tratamiento con eculizumab	Biomarcador normalizado	P valor
1-2,5	*	*
4-6	MCP-1 IL-6 VCAM-1	0,0002 0,0251 0,0166
12-17	VCAM-1 CXCL-10 Ba CXCL-9	0,0003 0,0071 0,0299 0,0441
26	VCAM-1 Cistatina C Ba U- β 2m CXCL9 CXCL10 vWF D-dímero L-FABP Clusterina F1+2	<0,0001 <0,0001 0,0002 0,0013 0,0027 0,0172 0,0052 0,0224 0,0230 0,0300 0,0460

Ejemplo 3. Niveles de línea basal de proteínas biomarcadoras de SUHa seleccionadas en pacientes con SUHa

En la línea basal, antes del tratamiento con eculizumab, se observaron pruebas sustanciales de activación significativa del complemento, inflamación/daño vascular y lesión orgánica en pacientes con SUHa independientemente del uso de intercambio de plasma o valores de laboratorio normales para recuento plaquetario, Hp o LDH. Como se demuestra por los datos expuestos en la Tabla 11, las concentraciones de biomarcadores de SUHa de la actividad del complemento, inflamación vascular, activación y daño endotelial, coagulación y lesión renal estaban significativamente elevadas en pacientes con SUHa en comparación con sujetos sanos.

Tabla 11.

Proceso de enfermedad	Biomarcador (intervalo de VSN; unidades)	Mediana del nivel en BL [intervalo] (P valor frente a VSN**)	n/N (%) elevado en BL	Factor de aumento frente a VSN en BL
Activación de CAP	Ba en plasma (388,0-588,0 ng/ml)	2676,4 [935,0 - 3668,01] (<0,0001)	35/35 (100)	5,53

<u>Proceso de enfermedad</u>	<u>Biomarcador (intervalo de VSN; unidades)</u>	<u>Mediana del nivel en BL</u>	<u>n/N (%)</u>	<u>Factor de aumento</u>
		<u>[intervalo]</u> <u>(P valor frente a VSN**)</u>	<u>elevado en BL</u>	<u>frente a VSN en BL</u>
Activación del complemento terminal	U-C5a (0,0-0,7 ng/mg U-creat)	9,00 [0,3 - 76,6] (0,0007)	26/29 (89,7)	45
	U-sC5b-9 (0,0-0,6 ng/mg U-creat)	30,50 [0,2 - 665,7] (0,0025)	23/27 (85,2)	305
Inflamación	sTNFR1 (407,31-391,3 pg/ml)	17616,85 [4008,5 - 54158,2] (<0,0001)	38/38 (100)	18,71
Activación endotelial	sVCAM-1 (159,2-444,7 ng/ml)	659,75 [375,4 - 1865,51] (<0,0001)	36/38 (94,7)	1,99
Daño endotelial	TM (2,0-3,6 ng/ml)	10 [3,4-24,1] (<0,0001)	33/34 (97,1)	3,64
Coagulación	F1+2 (82,9-305,5 pmol/l)	1017,55 [217,75774,01] (<0,0001)	36/38 (94,7)	5,46
	D-dímero (157,0-395,9 µg/l)	2735 [330,0 - 44100,01] (0,0002)	34/36 (94,4)	9,84
Lesión renal	U-clusterina (5,7-437,1 ng/mg U- creat)	1232,30 [129,96091,2] (<0,0001)	24/29 (82,8)	8,62
	U-TIMP-1 (0,0-5,4 ng/mg U- creat)	23,8 [1,4 -230,4] (0,0003)	22/29 (75,9)	39,67
	U-L-FABP-1 (0,0-16,9 ng/mg U- creat)	58,00 [3,7 - 1309,8](0,0130)	22/29 (75,9)	48,33
	U-β2m (0,0-2,7 µg/mg U- creat)	18,4 [0,4- 127,7] (<0,0001)	20/28 (71,4)	46
	U-cistatina-C (0,3-301,3 ng/mg U- creat)	1256,9 [14,37189,61] (0,0001)	18/26 (69,2)	23,85

VSN significa valor o concentración de ser humano normal para una proteína biomarcadora de SUHa dada indicada en la tabla.

“Creat” significa creatinina, cuya concentración se usa para normalizar ciertas concentraciones de biomarcadores indicadas en la tabla.

CAP se refiere a la ruta alternativa del complemento (véase anteriormente).

“LB” se refiere a “línea basal”, es decir, antes del tratamiento con eculizumab.

“N” es el número total de pacientes analizados con respecto a un proceso de enfermedad y biomarcador dados.

“n” es el número de “N” pacientes en los que un biomarcador dado estaba elevado.

“U” indica que el analito se midió en orina.

* Los P valores se calcularon usando un ensayo de suma de rangos de Wilcoxon, ensayando con respecto a una diferencia entre grupos.

Además, los inventores han observado que no hubo ninguna significación estadística entre los niveles elevados en línea basal de ciertos biomarcadores de SUHa observados en pacientes que habían recibido o estaban recibiendo terapia de intercambio de plasma (PE) o infusión de plasma (PI) en comparación con el nivel de aumento de los biomarcadores de SUHa en pacientes que no recibieron terapia de PE o PI. Por ejemplo, la concentración de Ba, sTNFR1, sVCAM-1 y D-dímero no se reducía o normalizaba en pacientes que habían recibido terapia de PE/PI (Figs. 17A-D). Obsérvese que solamente 3 de 26 pacientes analizados en los datos presentados en las Figs. 17A-D no recibieron PE/PI. La mayoría de pacientes (n=23) tenían niveles elevados de Cistatina C, en comparación con voluntarios sanos normales. Siendo la Cistatina C un marcador de lesión renal (lesión glomerular), es posible que los pacientes que no recibieron PE/PI tuvieran menos daño en sus riñones y por lo tanto tuvieran niveles reducidos de proteínas biomarcadoras relacionadas con lesión renal en su orina.

De forma similar, en línea basal, antes de terapia con eculizumab, la concentración de marcadores proteicos de activación del complemento (por ejemplo, Ba), inflamación (por ejemplo, sTNFR1), activación de células endoteliales (sVCAM-1), coagulación (D-dímero) y lesión renal (cistatina-C) estaba elevada en pacientes con SUHa que tenían recuentos plaquetarios normales. Véase Figs. 18A-E. Y los pacientes con niveles de Hp y LDH normales mostraron pruebas de activación del complemento, inflamación, activación de células endoteliales, coagulación y lesión renal continuadas (véase Figs. 19A-E).

A la vista de lo anterior, la concentración de biomarcadores que reflejan la actividad de complemento, inflamación vascular, activación y daño endotelial, coagulación y lesión renal estaba crónicamente elevada en pacientes con SUHa en comparación con sujetos sanos normales. Los pacientes con SUHa que recibieron PE/PI mostraron pruebas robustas de activación del complemento, inflamación vascular, activación endotelial, coagulación y lesión renal continuadas significativas. Aunque PE/PI puede mantener de forma transitoria el recuento de plaquetas normal y LDH en algunos pacientes, los resultados anteriores demuestran que la desregulación del complemento subyacente y procesos de TMA persisten. A pesar de valores de laboratorio normales para recuento plaquetario, LDH y Hp, estos estudios indican que existen activación del complemento, inflamación vascular, activación

endotelial, coagulación y lesión renal continuadas significativas en pacientes con SUHa.

Ejemplo 4. Efectos del tratamiento sostenido con Eculizumab en las concentraciones de biomarcadores de SUHa

5 Los inventores han observado que el tratamiento con eculizumab sostenido inhibe la activación del complemento elevada crónica y lesión renal mediada por complemento terminal, y reduce la inflamación, el daño endotelial y el riesgo trombótico en pacientes con SUHa. Por ejemplo, el tratamiento con eculizumab sostenido inhibió rápida y completamente la activación del complemento terminal como se indica por la reducción en la concentración tanto de
10 C5a como de sC5b-9 (por ejemplo, C5a y sC5b-9 en orina). Véase Figs. 20A-B. En la línea basal, los pacientes con SUHa mostraron activación del complemento terminal significativa en comparación con VSN, a pesar del uso de PE/PI o recuentos plaquetarios normales en algunos pacientes. De hecho, los pacientes con SUHa demostraron niveles de C5a en orina 45 veces mayores y de sC5b-9 en orina 304 veces mayores. Sin embargo, durante el
15 tratamiento con eculizumab sostenido, todos los pacientes con SUHa demostraron bloqueo del complemento terminal rápido y potente, con normalización completa de productos de activación del complemento terminal patógenos y sin diferencia en los niveles en relación con VSN.

Además, el tratamiento con eculizumab sostenido normalizó la concentración de proteínas biomarcadoras de lesión renal (Figs. 21A-C). Antes de iniciar la terapia con eculizumab, la mayoría de pacientes tenían niveles elevados de
20 biomarcadores de: lesión intersticial tubular y deterioro de la función renal (por ejemplo, L-FABP-1, ~48 veces mayor que VSN), filtración glomerular (por ejemplo, cistatina C, ~24 veces mayor que VSN), lesión tubular proximal (por ejemplo, clusterina, 8,6 veces mayor que VSN). Sin embargo, el tratamiento sostenido con eculizumab redujo drásticamente las concentraciones en orina de FABP-1 (en hasta el 100 %), cistatina C (en hasta el 99 %) y clusterina (en hasta el 98 %). Esta reducción fue significativa en todos los puntos temporales ($P < 0,0001$ para todos)
25 y la concentración reducida de todos los marcadores de lesión renal no fue diferente de los niveles en VSN. Los marcadores de lesión renal adicionales (por ejemplo, TIM-1 y microglobulina $\beta 2$) también se normalizaron (véase anteriormente en el Ejemplo 2). Estos resultados sugieren que la isquemia y el daño de órganos pueden ser completamente dependientes de complemento terminal y confirma los datos clínicos que demuestran que la inhibición sostenida de TMA mediada por complemento condujo a mejora de eGFR clínicamente significativa y
30 detención de la diálisis.

El tratamiento sostenido con eculizumab también reduce significativamente la activación de la ruta alternativa del complemento (véase Fig. 22). Todos los pacientes con SUHa mostraron activación de CAP sistémica significativa corriente arriba de C5, con niveles 5,5 veces mayores de Ba en comparación con VSN, antes del tratamiento con
35 eculizumab. Sin embargo, después del inicio de la terapia con eculizumab, la concentración de biomarcadores corriente arriba de activación de CAP (por ejemplo, niveles de Ba) se redujo en 30 % y la reducción después de la semana 4-6 fue significativa en todos los puntos temporales ($p < 0,005$) en comparación con la concentración de los marcadores en VSN. Aun así los niveles de Ba no se normalizaron en pacientes con SUHa tratados con eculizumab, lo que sugiere que la activación de CAP persiste, lo que refleja la desregulación del complemento subyacente en
40 pacientes con SUHa. Para ser claros, no obstante, el bloqueo del complemento terminal con eculizumab protegió a los pacientes de las consecuencias clínicas de la activación de CAP continuada.

Además, el tratamiento crónico de pacientes con SUHa con eculizumab dio como resultado concentraciones significativamente reducidas de biomarcadores asociados con inflamación, activación endotelial y daño tisular (Figs.
45 23A-C). Los niveles de sTNFR1 en suero estaban elevados (18,7 veces mayores que los niveles de VSN) en el 100 % de los pacientes con SUHa en línea basal. El tratamiento sostenido con eculizumab redujo significativamente sTNFR1 hasta el 94 %. La reducción en la concentración de estos biomarcadores en la semana 4-6 fue significativa en todos los puntos temporales ($P < 0,0001$). Los niveles de VCAM-1 y TM solubles se elevaron en >95 % de los pacientes con SUHa en la línea basal en 2 veces y 3,6 veces, respectivamente, en comparación con VSN, lo que
50 demuestra activación de células endoteliales significativa y daño antes de la terapia de eculizumab. Las concentraciones de TM y sVCAM-1 también se redujeron significativamente durante el tratamiento con eculizumab. Después de la semana 12-17, la reducción de la concentración de biomarcadores de daño endotelial fue significativa en todos los puntos temporales posteriores (TM; $P < 0,0001$), pero aún se elevaron modestamente en comparación con VSN. Los niveles de TM soluble reducidos drásticamente pueden reflejar la restauración de TM unida a
55 membrana, que protege contra riesgo trombótico.

Finalmente, el tratamiento crónico con eculizumab redujo rápida y significativamente la concentración de biomarcadores asociados con riesgo trombótico y coagulación (Figs. 24A-B). La concentración de biomarcadores de coagulación F1+2 y D-dímero estaba significativamente elevada (5,5 veces y 9,8 veces mayor que VSN) en línea
60 basal en más del 94 % de los pacientes con SUHa ($P < 0,0001$ y $P = 0,0002$, respectivamente). Aun así F1+2 y D-dímero estaban reducidos significativamente a las 2,5 semanas después del inicio del tratamiento con eculizumab. La concentración de F1+2 se redujo en hasta el 88 % ($P < 0,05$ para todos los puntos temporales) y la concentración de D-dímero se redujo hasta el 99 % ($P < 0,0001$ para todos los puntos temporales) con tratamiento con eculizumab sostenido. Sin embargo, estos dos marcadores permanecieron modestamente elevados sobre las concentraciones
65 respectivas en sujetos sanos normales.

Conclusiones

A la vista de los datos anteriores, los inventores fueron capaces de extraer varias conclusiones. En primer lugar, en línea basal, eran evidentes niveles elevados de todos los biomarcadores de microangiopatía trombótica (TMA) en pacientes con SUHa en comparación con los niveles en muestras de voluntarios sanos normales (VSN). En todos los grupos de pacientes, incluyendo los que recibieron PE/PI o los que tenían plaquetas, Hp o LDH normales, pacientes con SUHa demostraron elevación significativa, frente a VSN, en medidas de: activación del complemento terminal (45-305 veces mayor que los niveles de VSN); daño de órganos vitales; ruta alternativa de la activación del complemento (por ejemplo, como se representa por los niveles de Ba; 5,5 veces mayor que los niveles de VSN); inflamación vascular; activación y daño endotelial; y coagulación.

El tratamiento con eculizumab sostenido de pacientes con SUHa redujo significativamente y normalizó los marcadores altamente elevados de activación del complemento terminal. La inhibición de activación del complemento terminal con eculizumab también redujo drásticamente y normalizó marcadores de daño orgánico. Los biomarcadores corriente arriba de activación de la ruta alternativa también se redujeron significativamente, pero no se normalizaron. Y los niveles bajos de activación de ruta alternativa persistieron en pacientes tratados, lo que refleja la desregulación del complemento subyacente en pacientes con SUHa. Dicho esto, los datos indican claramente que el bloqueo del complemento terminal con eculizumab protege pacientes con SUHa de las consecuencias clínicas de activación de la ruta alternativa continuada.

Además, el tratamiento con eculizumab sostenido también dio como resultado: (i) reducción significativa y sostenida de marcadores de inflamación vascular (hasta el 94 %); (ii) inhibición significativa de marcadores de activación endotelial (hasta el 60 %); (iii) reducción significativa y sostenida en marcadores de daño endotelial (hasta el 77 %) hasta niveles casi normales, lo que demuestra una relación clara entre la activación del complemento terminal y daño endotelial; y (iv) reducción notable (hasta el 99 %) de la concentración de biomarcadores de riesgo trombótico, que probablemente reducen el potencial de formación de coágulos y por lo tanto reduce la incidencia de TMA en estos pacientes. Los inventores concluyen, sin quedar ligado a ninguna teoría o mecanismo de acción, que la inhibición de activación del complemento terminal con eculizumab debe ser sostenida, ya que la pérdida de inhibición del complemento terminal en SUHa conduciría a un rápido aumento de activación del complemento terminal gravemente amplificada, lo que conduciría posteriormente a: aumento de la activación endotelial subclínica subyacente, aceleración significativa de daño endotelial, aumento notable del riesgo trombótico y un riesgo temprano y continuado de isquemia vascular catastrófica y daño a órganos vitales. Además, estos datos indican que la lesión renal, inflamación vascular y daño y activación endotelial son completamente o en parte dependientes de la actividad del complemento terminal, cuya actividad se inhibe con eficacia y seguridad usando eculizumab.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MCKNIGHT, Susan Faas COFIELL, Roxanne KUKREJA, Anjli BEDARD, Krystin A. YAN, Yan

<120> PROTEÍNAS BIOMARCADORAS DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO TÍPICO

<130> AXJ-176PC

<140> Nueva solicitud

<141> Simultáneamente con la presente

<150> US 61/913.180

<151> 06-12-2013

<150> US 61/863.299

<151> 07-08-2013

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 244

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(244)

<223> Fragmento Ba de factor B humano

ES 2 650 917 T3

<400> 1

Leu Gly Leu Leu Ser Gly Gly Val Thr Thr Thr Pro Trp Ser Leu Ala
 1 5 10 15

Arg Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly Val Glu Ile Lys Gly Gly
 20 25 30

Ser Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala Leu Glu Tyr Val Cys Pro
 35 40 45

Ser Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr Arg Thr Cys Arg Ser Thr
 50 55 60

Gly Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp Gln Lys Thr Val Arg Lys
 65 70 75 80

Ala Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg Pro His Asp Phe Glu Asn
 85 90 95

Gly Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr Asn Val Ser Asp Glu Ile

ES 2 650 917 T3

	100		105		110														
Ser	Phe	His	Cys	Tyr	Asp	Gly	Tyr	Thr	Leu	Arg	Gly	Ser	Ala	Asn	Arg				
		115					120					125							
Thr	Cys	Gln	Val	Asn	Gly	Arg	Trp	Ser	Gly	Gln	Thr	Ala	Ile	Cys	Asp				
	130					135					140								
Asn	Gly	Ala	Gly	Tyr	Cys	Ser	Asn	Pro	Gly	Ile	Pro	Ile	Gly	Thr	Arg				
145					150					155					160				
Lys	Val	Gly	Ser	Gln	Tyr	Arg	Leu	Glu	Asp	Ser	Val	Thr	Tyr	His	Cys				
				165					170					175					
Ser	Arg	Gly	Leu	Thr	Leu	Arg	Gly	Ser	Gln	Arg	Arg	Thr	Cys	Gln	Glu				
			180					185					190						
Gly	Gly	Ser	Trp	Ser	Gly	Thr	Glu	Pro	Ser	Cys	Gln	Asp	Ser	Phe	Met				
		195					200					205							
Tyr	Asp	Thr	Pro	Gln	Glu	Val	Ala	Glu	Ala	Phe	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr				
	210					215					220								
Glu	Thr	Ile	Glu	Gly	Val	Asp	Ala	Glu	Asp	Gly	His	Gly	Pro	Gly	Glu				
225					230					235					240				
Gln Gln Lys Arg																			

<210> 2
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(77)
 <223> Componente del complemento humano C3a

<400> 2

Ser	Val	Gln	Leu	Thr	Glu	Lys	Arg	Met	Asp	Lys	Val	Gly	Lys	Tyr	Pro
1				5					10					15	
Lys	Glu	Leu	Arg	Lys	Cys	Cys	Glu	Asp	Gly	Met	Arg	Glu	Asn	Pro	Met
			20					25					30		
Arg	Phe	Ser	Cys	Gln	Arg	Arg	Thr	Arg	Phe	Ile	Ser	Leu	Gly	Glu	Ala
		35					40					45			

15

ES 2 650 917 T3

Cys Lys Lys Val Phe Leu Asp Cys Cys Asn Tyr Ile Thr Glu Leu Arg
 50 55 60

Arg Gln His Ala Arg Ala Ser His Leu Gly Leu Ala Arg
 65 70 75

5 <210> 3
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(74)
 <223> Componente del complemento humano C5a

<400> 3

Thr Leu Gln Lys Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala Lys Tyr Lys His Ser
1 5 10 15

Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu
20 25 30

Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu Gly Pro Arg Cys Ile
35 40 45

Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser Gln Leu Arg Ala Asn
50 55 60

15 **Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg**
65 70

20 <210> 4
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(155)
 <223> Fragmento de activación de protrombina humana 1

<400> 4

Ala Asn Thr Phe Leu Glu Glu Val Arg Lys Gly Asn Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15

Cys Val Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Phe Glu Ala Leu Glu
20 25 30

ES 2 650 917 T3

Ser Ser Thr Ala Thr Asp Val Phe Trp Ala Lys Tyr Thr Ala Cys Glu
 35 40 45

Thr Ala Arg Thr Pro Arg Asp Lys Leu Ala Ala Cys Leu Glu Gly Asn
 50 55 60

Cys Ala Glu Gly Leu Gly Thr Asn Tyr Arg Gly His Val Asn Ile Thr
 65 70 75 80

Arg Ser Gly Ile Glu Cys Gln Leu Trp Arg Ser Arg Tyr Pro His Lys
 85 90 95

Pro Glu Ile Asn Ser Thr Thr His Pro Gly Ala Asp Leu Gln Glu Asn
 100 105 110

Phe Cys Arg Asn Pro Asp Ser Ser Thr Thr Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
 115 120 125

Thr Asp Pro Thr Val Arg Arg Gln Glu Cys Ser Ile Pro Val Cys Gly
 130 135 140

Gln Asp Gln Val Thr Val Ala Met Thr Pro Arg
 145 150 155

5 <210> 5
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(129)
 <223> Fragmento de activación de protrombina humana 2

<400> 5

ES 2 650 917 T3

Ser Glu Gly Ser Ser Val Asn Leu Ser Pro Pro Leu Glu Gln Cys Val
1 5 10 15

Pro Asp Arg Gly Gln Gln Tyr Gln Gly Arg Leu Ala Val Thr Thr His
20 25 30

Gly Leu Pro Cys Leu Ala Trp Ala Ser Ala Gln Ala Lys Ala Leu Ser
35 40 45

Lys His Gln Asp Phe Asn Ser Ala Val Gln Leu Val Glu Asn Phe Cys
50 55 60

Arg Asn Pro Asp Gly Asp Glu Glu Gly Val Trp Cys Tyr Val Ala Gly
65 70 75 80

Lys Pro Gly Asp Phe Gly Tyr Cys Asp Leu Asn Tyr Cys Glu Glu Ala
85 90 95

Val Glu Glu Glu Thr Gly Asp Gly Leu Asp Glu Asp Ser Asp Arg Ala
100 105 110

Ile Glu Gly Arg Thr Ala Thr Ser Glu Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro
115 120 125

Arg

5 <210> 6
 <211> 622
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(622)
 <223> Protrombina humana

<400> 6

ES 2 650 917 T3

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

Cys Gln Leu Trp Arg Ser Arg Tyr Pro His Lys Pro Glu Ile Asn Ser
 130 135 140

Thr Thr His Pro Gly Ala Asp Leu Gln Glu Asn Phe Cys Arg Asn Pro
 145 150 155 160

Asp Ser Ser Thr Thr Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Thr Val
 165 170 175

Arg Arg Gln Glu Cys Ser Ile Pro Val Cys Gly Gln Asp Gln Val Thr
 180 185 190

Val Ala Met Thr Pro Arg Ser Glu Gly Ser Ser Val Asn Leu Ser Pro
 195 200 205

Pro Leu Glu Gln Cys Val Pro Asp Arg Gly Gln Gln Tyr Gln Gly Arg
 210 215 220

Leu Ala Val Thr Thr His Gly Leu Pro Cys Leu Ala Trp Ala Ser Ala
 225 230 235 240

Gln Ala Lys Ala Leu Ser Lys His Gln Asp Phe Asn Ser Ala Val Gln
 245 250 255

Leu Val Glu Asn Phe Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Glu Glu Gly Val
 260 265 270

Trp Cys Tyr Val Ala Gly Lys Pro Gly Asp Phe Gly Tyr Cys Asp Leu
 275 280 285

Asn Tyr Cys Glu Glu Ala Val Glu Glu Glu Thr Gly Asp Gly Leu Asp
 290 295 300

Glu Asp Ser Asp Arg Ala Ile Glu Gly Arg Thr Ala Thr Ser Glu Tyr
 305 310 315 320

Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp Cys
 325 330 335

Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr Glu
 340 345 350

Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly Ser
 355 360 365

Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg Lys
 370 ~~375~~ ~~380~~

ES 2 650 917 T3

Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg Trp
 385 390 395 400

Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys Asn
 405 410 415

Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg Thr
 420 425 430

Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile Tyr
 435 440 445

Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile Ala
 450 455 460

Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His Pro
 465 470 475 480

Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala Gly
 485 490 495

Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp Thr
 500 505 510

Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn Leu
 515 520 525

Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg Ile
 530 535 540

Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg
 545 550 555 560

Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser
 565 570 575

Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu
 580 585 590

Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe Arg
 595 600 605

Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
 610 615 620

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor del complemento, que es un anticuerpo anti-C5 o un fragmento de unión a C5 del mismo, para uso en un método para tratar síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa), comprendiendo el método:

5 (a) determinar la concentración de al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en un líquido biológico obtenido de un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar SUHa, en el que las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa son TNFR1 y al menos otra proteína biomarcadora asociada con SUHa seleccionada de: CXCL10, MCP-1, IFN- γ , IL-6, un fragmento proteolítico del factor componente del
10 complemento B, C5b9 soluble (sC5b9), fragmento de protrombina F1+2, d-dímero, trombomodulina, VCAM-1, Factor de von Willebrand (vWF), componente del complemento C5a, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), albúmina, CXCL9, KIM-1, ligando de CD40 soluble (sCD40L), ICAM-1, IL-1 beta, IL-12 p70, IL-8 y factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF); y

15 (b) administrar al sujeto el inhibidor del complemento en una cantidad y con una frecuencia suficientes para reducir la concentración de las al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa, en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor del complemento.

20 2. El inhibidor del complemento para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sujeto:

(a) ha recibido diálisis al menos una vez en los tres meses inmediatamente anteriores al tratamiento con el inhibidor del complemento; o

25 (b) es uno que experimenta la primera manifestación de SUHa aguda.

3. El inhibidor del complemento para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la concentración reducida de las al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa se produce en las dos semanas o dos meses después de la primera administración del inhibidor del complemento.

30 4. Un método para supervisar la sensibilidad de un sujeto al tratamiento con un inhibidor del complemento, que es un anticuerpo anti-C5 o un fragmento de unión a C5 del mismo, comprendiendo el método: determinar la concentración de al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en un líquido biológico obtenido del sujeto, en el que:

35 (a) las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa son TNFR1 y al menos otra proteína biomarcadora asociada con SUHa seleccionada de: CXCL10, MCP-1, IFN- γ , IL-6, un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B, C5b9 soluble (sC5b9), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, trombomodulina, VCAM-1, Factor de von Willebrand (vWF), componente del complemento C5a, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), albúmina, CXCL9 y KIM-1;

40 (b) el sujeto tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar SUHa;

(c) el sujeto está tratado o se está tratando con el inhibidor del complemento; y

45 (d) una concentración reducida de las al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en comparación con la concentración en una muestra de líquido biológico del mismo tipo obtenido del sujeto antes del tratamiento con el inhibidor del complemento indica que el sujeto es sensible al tratamiento con el inhibidor.

5. El inhibidor del complemento para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el sujeto se está tratando de forma crónica con un inhibidor del complemento.

50 6. El inhibidor del complemento para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el método de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo:

55 (i) se selecciona de un anticuerpo humanizado, un anticuerpo recombinante, un diacuerpo, un anticuerpo quimerizado o quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo desinmunizado, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fv, un fragmento Fd, un fragmento Fab, un fragmento Fab' y un fragmento F(ab')₂;

(ii) inhibe la escisión de C5 en los fragmentos C5a y C5b; o

60 (iii) es el anticuerpo eculizumab o el fragmento de unión a antígeno pexelizumab.

7. Un método para diagnosticar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar síndrome urémico hemolítico atípico (SUHa), comprendiendo el método: determinar la concentración de al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en un líquido biológico obtenido de un sujeto, en el que las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa son TNFR1 y al menos otra proteína biomarcadora asociada con SUHa seleccionada de: un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B, C5b9 soluble (sC5b9), trombomodulina, VCAM-1, Factor de von Willebrand (vWF), ligando de CD40 soluble (sCD40L), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, CXCL10,

MCP-1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1 beta, IL-12 p70, componente del complemento C5a, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), IL-6, albúmina, IL-8 y CCL5

5 en el que una concentración elevada de las al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en comparación con la concentración de las proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en una muestra de control de líquido biológico del mismo tipo indica que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, SUHa.

10 8. El inhibidor del complemento para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6 o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que la al menos otra proteína biomarcadora asociada con SUHa se selecciona de: un fragmento proteolítico del factor B, C5a, C5b-9 soluble (sC5b-9), VCAM-1, trombomodulina, fragmentos de protrombina 1 y 2 (F1+2), D-dímero, clusterina, TIMP-1, FABP-1, microglobulina beta-2 (b2m) y cistatina-C, en el que la VCAM-1 es VCAM-1 soluble (sVCAM-1).

15 9. El inhibidor del complemento para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 6 y 8 o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que las al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa se miden usando un inmunoensayo, tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA).

20 10. El inhibidor del complemento para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 6, 8 y 9 o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que el líquido biológico es sangre, una fracción sanguínea, tal como suero o plasma, u orina.

25 11. El inhibidor del complemento para uso de acuerdo con la reivindicación 10 o el método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la fracción sanguínea es suero.

30 12. El inhibidor del complemento para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 6 y 8 a 11 o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en el que:

(i) se mide la concentración de al menos un biomarcador asociado con SUHa en dos o más tipos de líquido biológico; o

(ii) se mide la concentración de una primera de las al menos dos proteínas biomarcadoras asociadas con SUHa en un tipo de líquido biológico y la concentración de una segunda de las al menos dos proteínas biomarcadoras de SUHa se mide en un segundo tipo de líquido.

35 13. El inhibidor del complemento para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 6 y 8 a 12 o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12, en el que:

(i) se determina la concentración de CXCL9, CXCL10, IFN- γ , MCP-1, CCL5, sCD40L o TNFR1 en el suero del sujeto, en el que el TNFR1 es TNFR1 soluble (sTNFR1);

40 (ii) se determina la concentración de al menos uno de microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL10, CXCL9, albúmina y KIM-1 en la orina del sujeto;

45 (iii) se determina la concentración de NGAL, un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B, C5b9 soluble (sC5b9), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, trombomodulina o Factor de von Willebrand (vWF) en el plasma del sujeto; y/o

(iv) se determina la concentración de Ba en plasma obtenido del sujeto.

50 14. El inhibidor del complemento para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 6 y 8 a 13 o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, en el que el TNFR1 es sTNFR1 y la concentración de control normal de sTNFR1 es de menos de 2000 pg/ml.

55 15. El inhibidor del complemento para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 6 y 8 a 14 o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 14, en el que el TNFR1 es sTNFR1 y la concentración de sTNFR1 en la muestra biológica se considera elevada cuando es:

(i) al menos dos veces mayor que la concentración de control de sTNFR1; o

(ii) al menos 10.000 pg/ml.

60 16. Uso de un kit de diagnóstico en el diagnóstico de SUHa, en el que el kit de diagnóstico comprende: (a) una placa de ensayo y (b) al menos tres agentes de unión, en el que cada agente de unión se une con una proteína de analito biológico diferente, en el que las proteínas de analito se seleccionan de: un fragmento proteolítico del factor componente del complemento B, C5b9 soluble (sC5b9), trombomodulina, VCAM-1, Factor de von Willebrand (vWF), ligando de CD40 soluble (sCD40L), fragmento de protrombina F1+2, D-dímero, CXCL10, MCP-1, TNFR1, IFN- γ , ICAM-1, IL-1 beta, IL-12 p70, componente del complemento C5a, microglobulina β 2 (β 2M), clusterina, cistatina C, NAG, TIMP-1, NGAL, proteína de unión a ácidos grasos 1 (FABP-1), CXCL9, KIM-1, IL-18, factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), IL-6, albúmina, IL-8 y CCL5, y una de las proteínas es TNFR-1.

65

17. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el agente de unión es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

C5a en orina

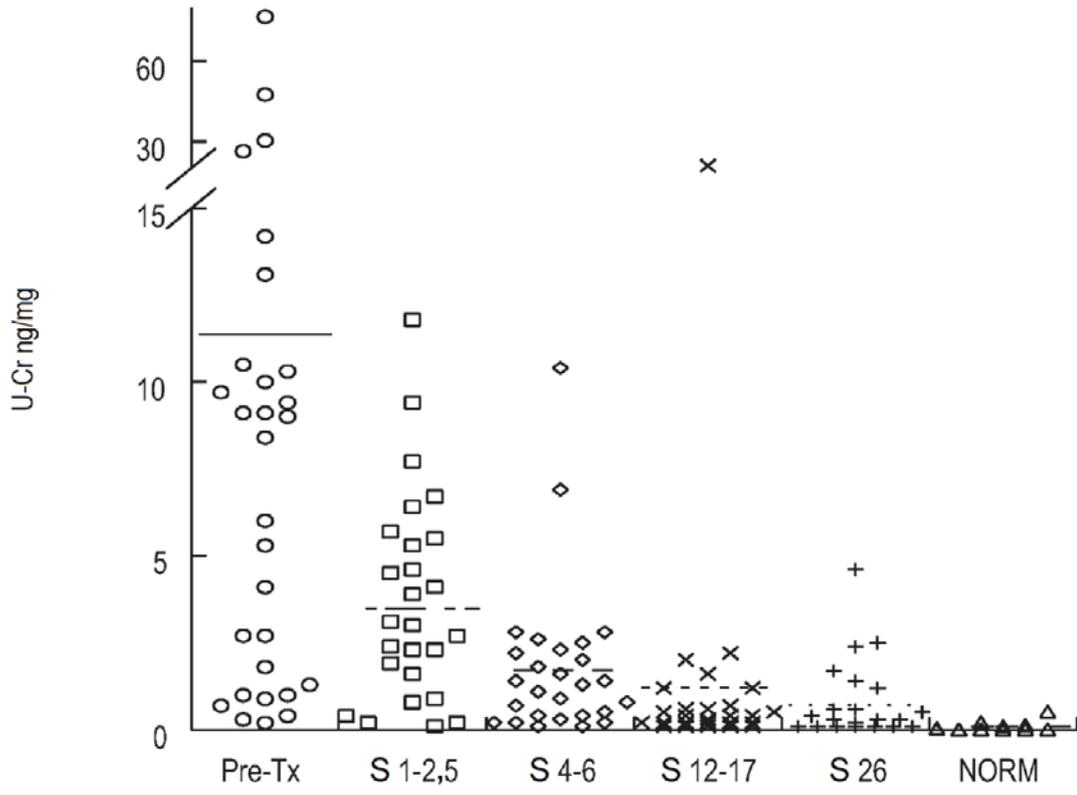


Fig. 1A

sC5b-9 en orina

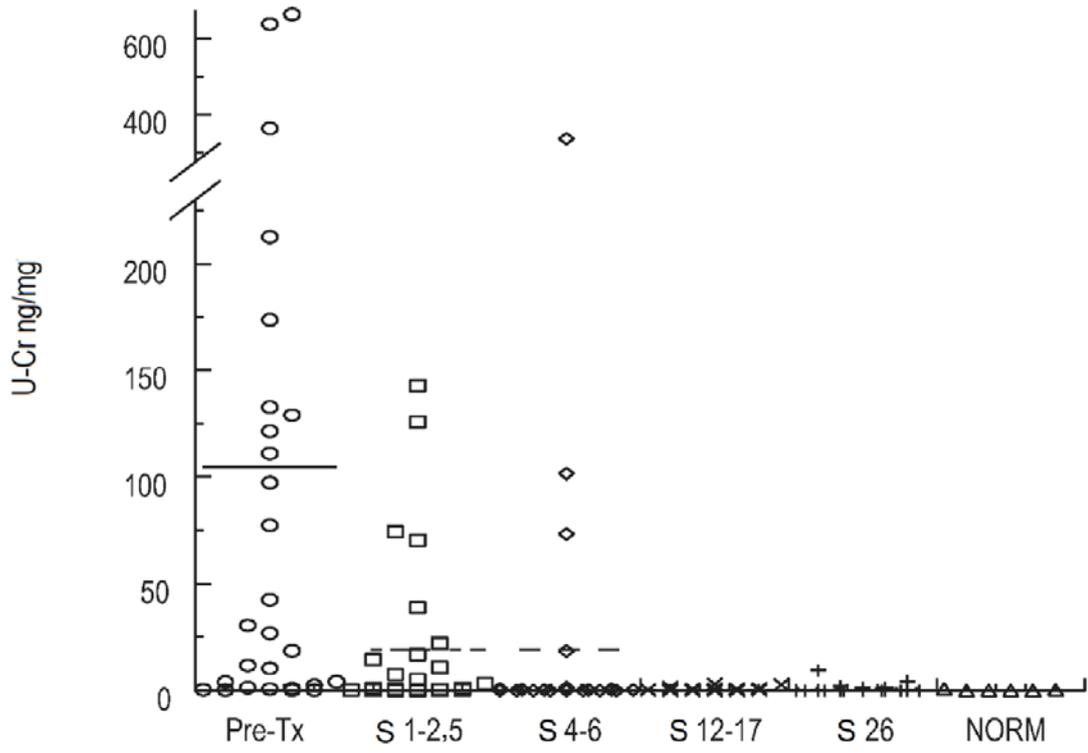


Fig. 1B

Niveles de Ba en plasma

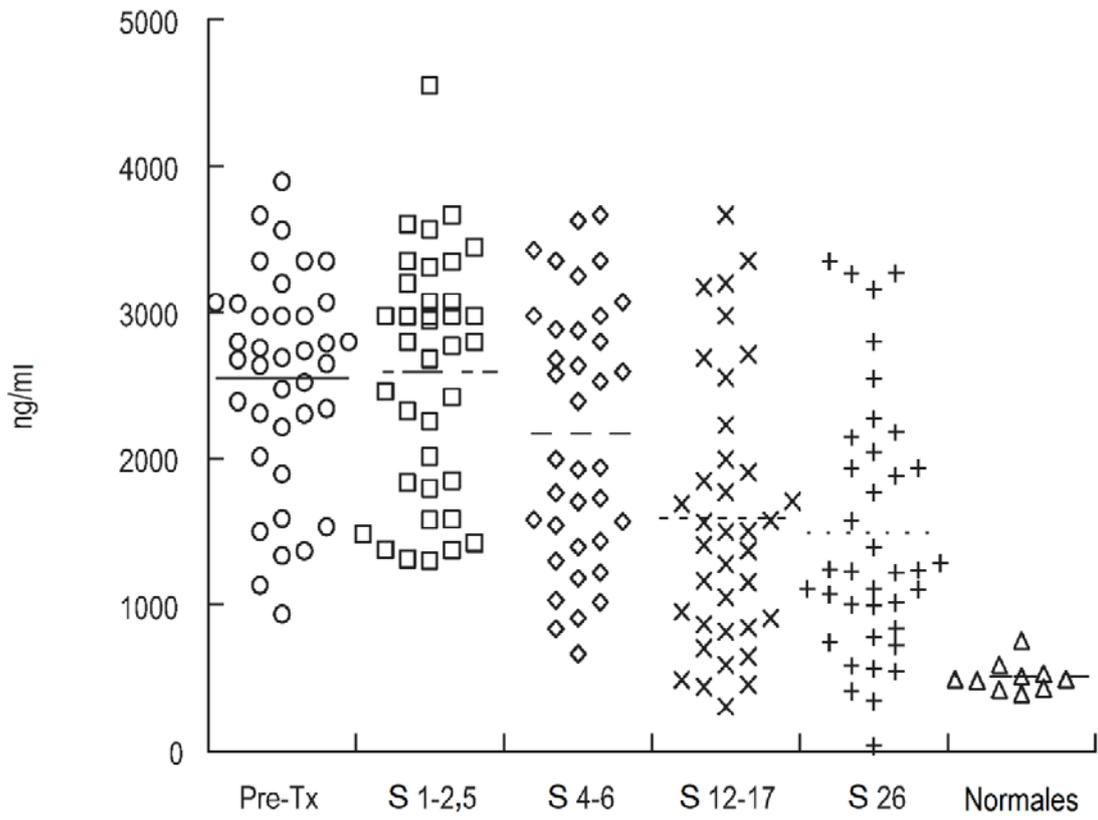


Fig. 1C

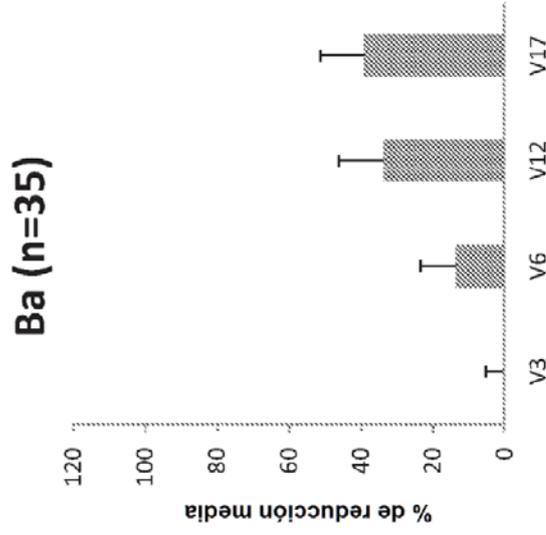


Fig. 1F

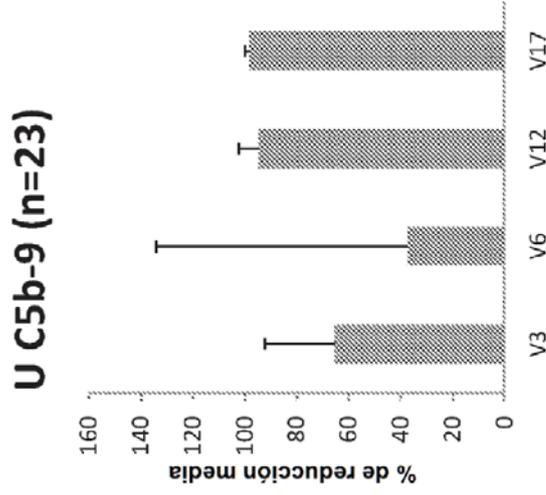


Fig. 1E

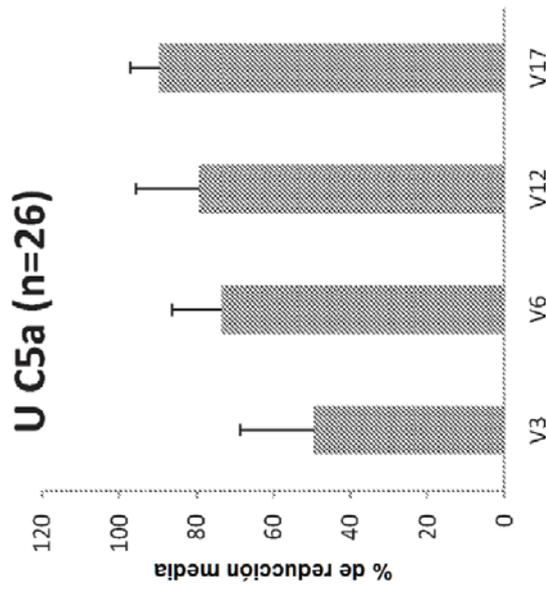


Fig. 1D

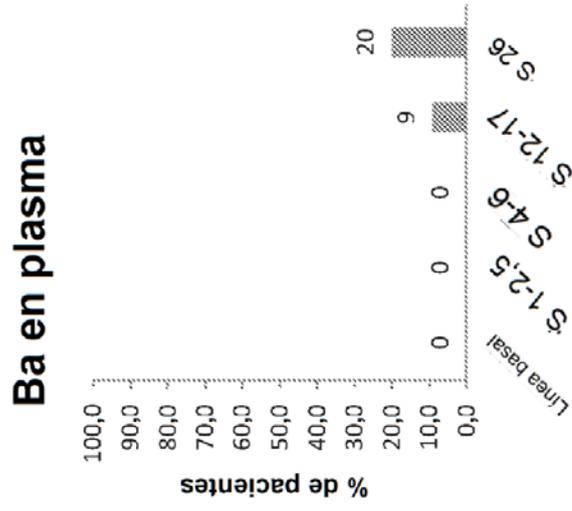


Fig. 2C

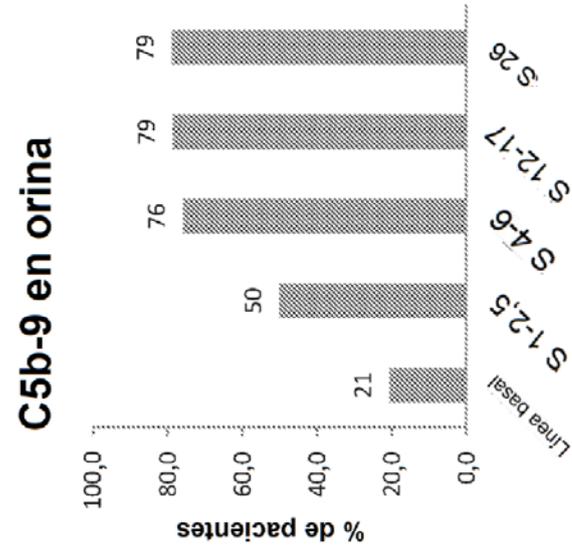


Fig. 2B

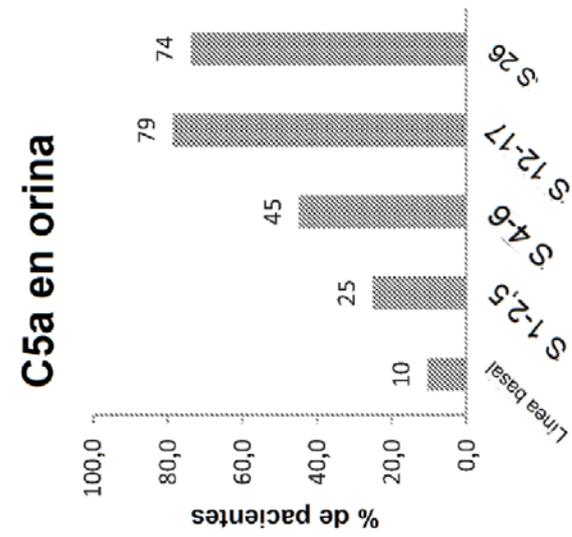


Fig. 2A

Niveles de F1+2 en plasma

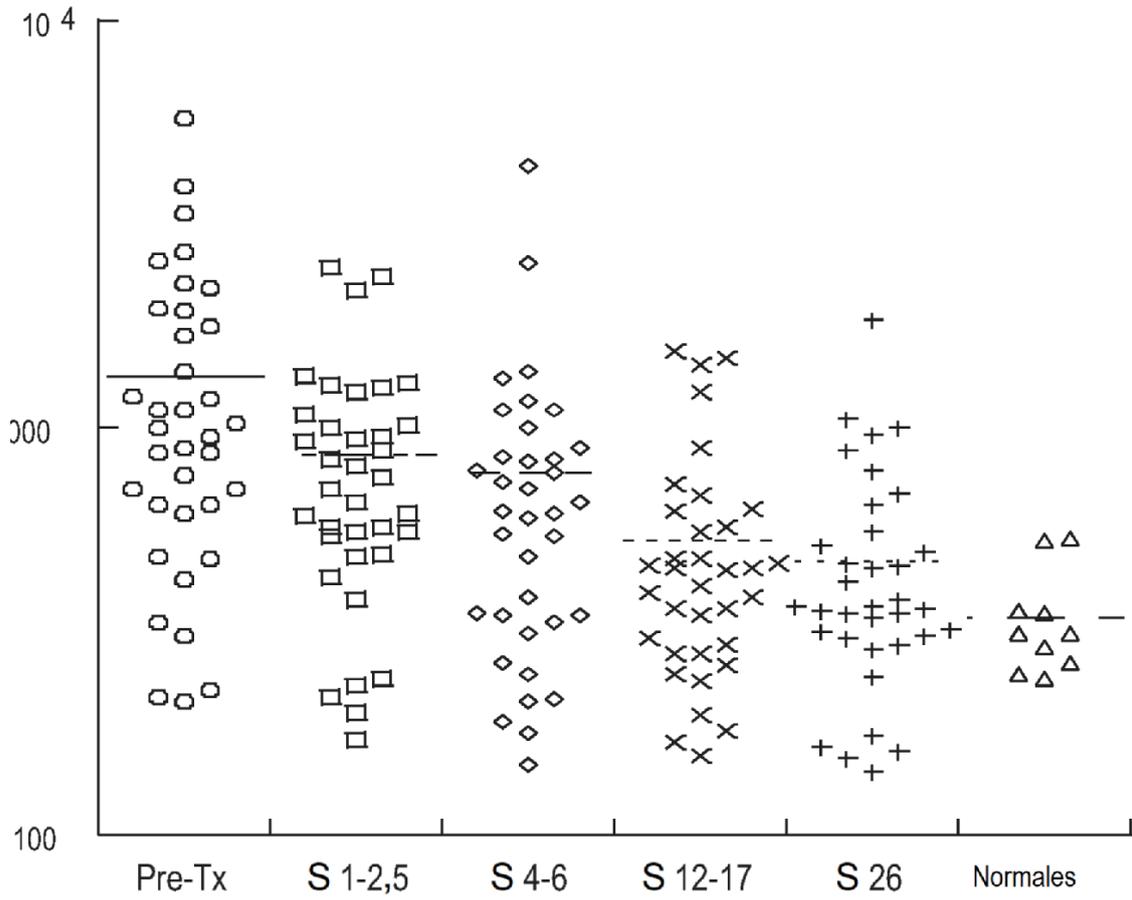


Fig. 3A

Niveles de d-dímero en plasma

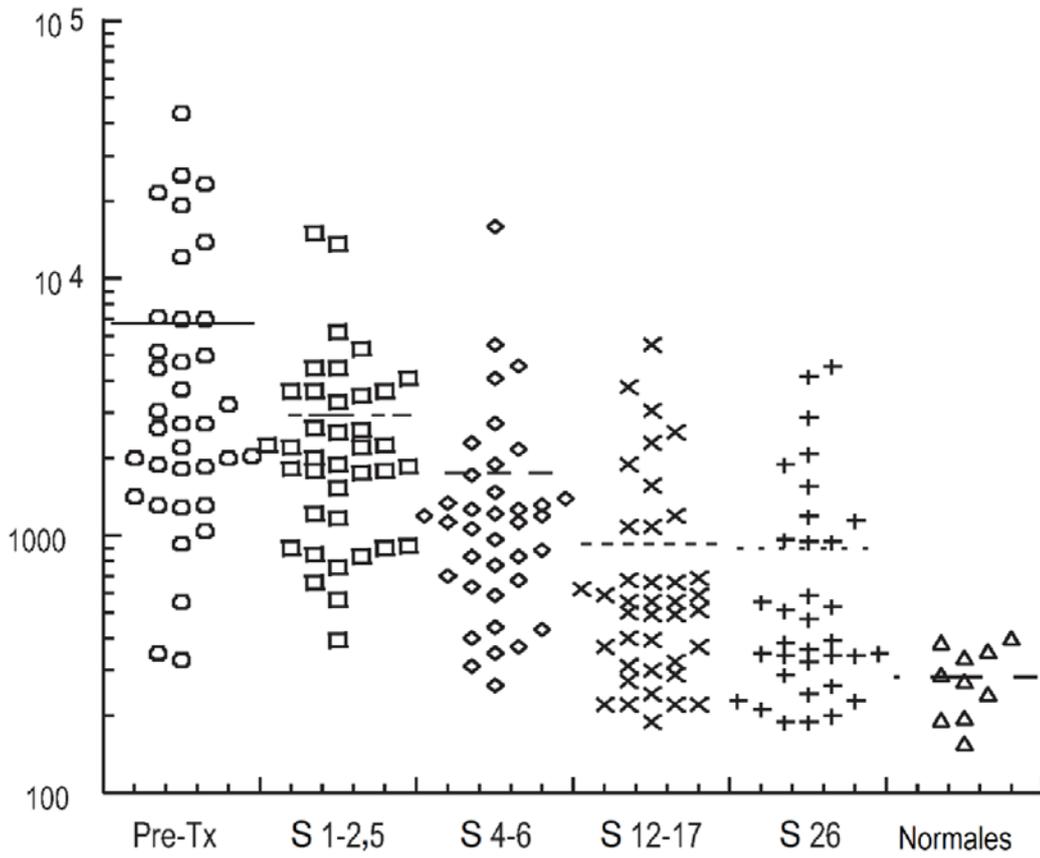


Fig. 3B

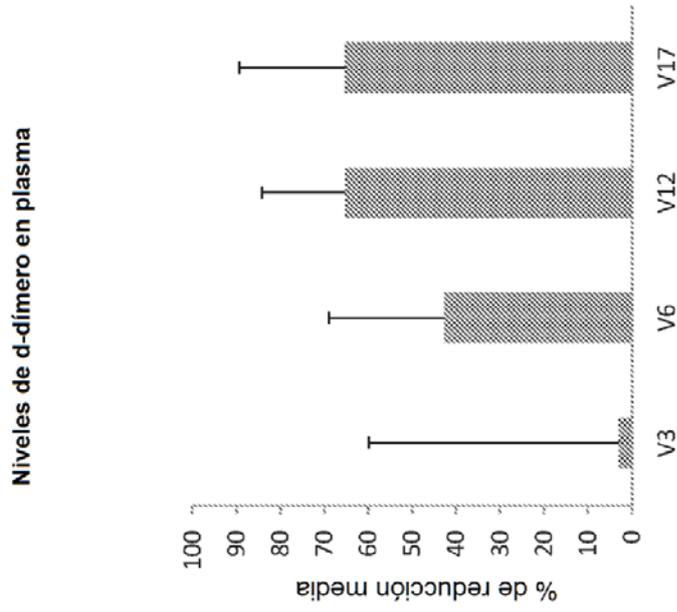


Fig. 3D

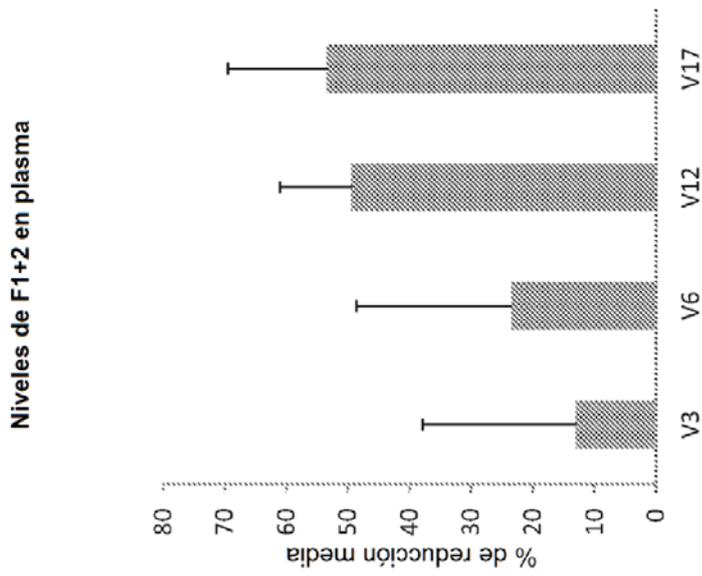


Fig. 3C

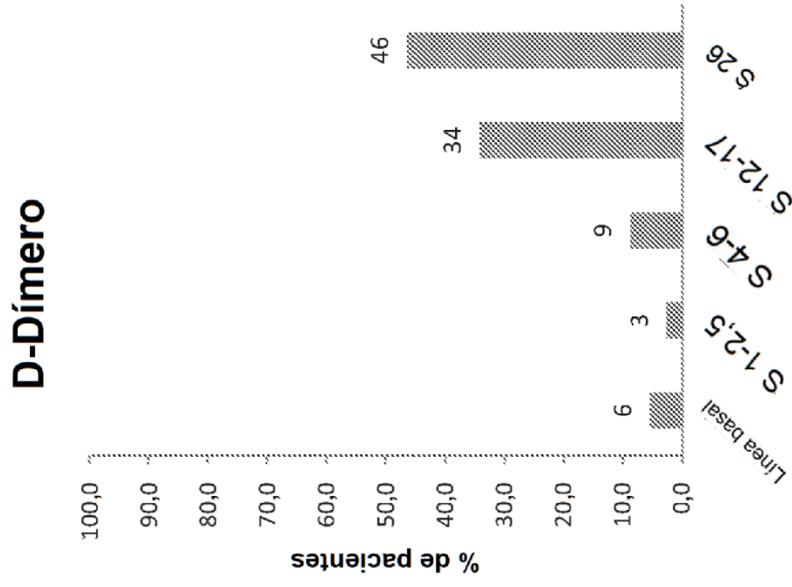


Fig. 4B

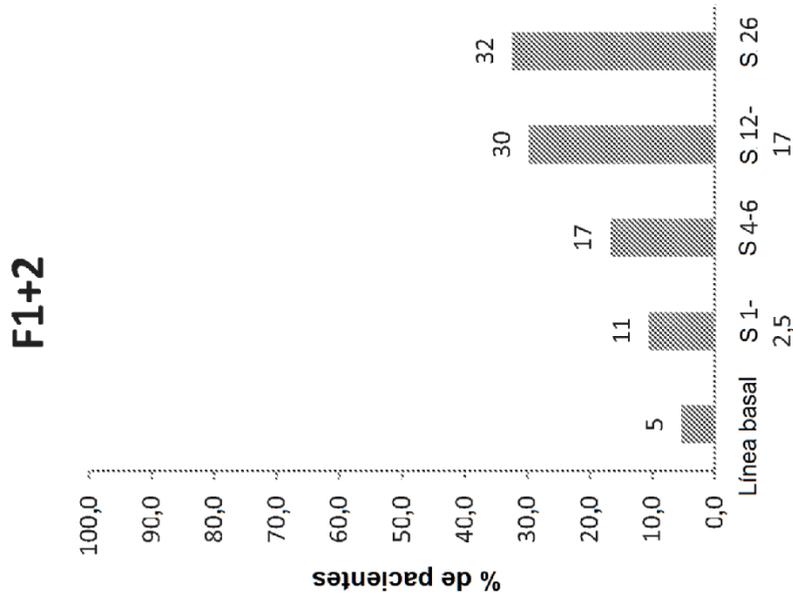


Fig. 4A

TM en plasma con EDTA

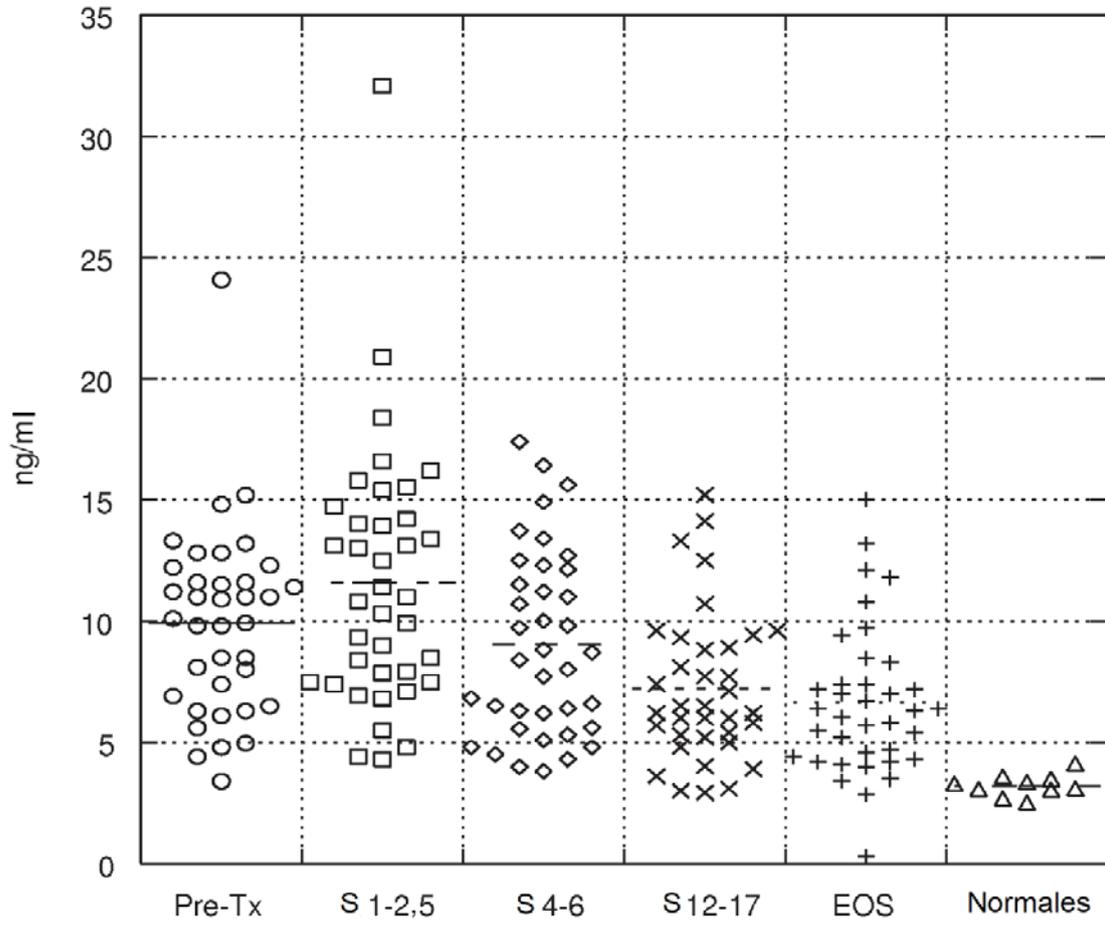


Fig. 5A

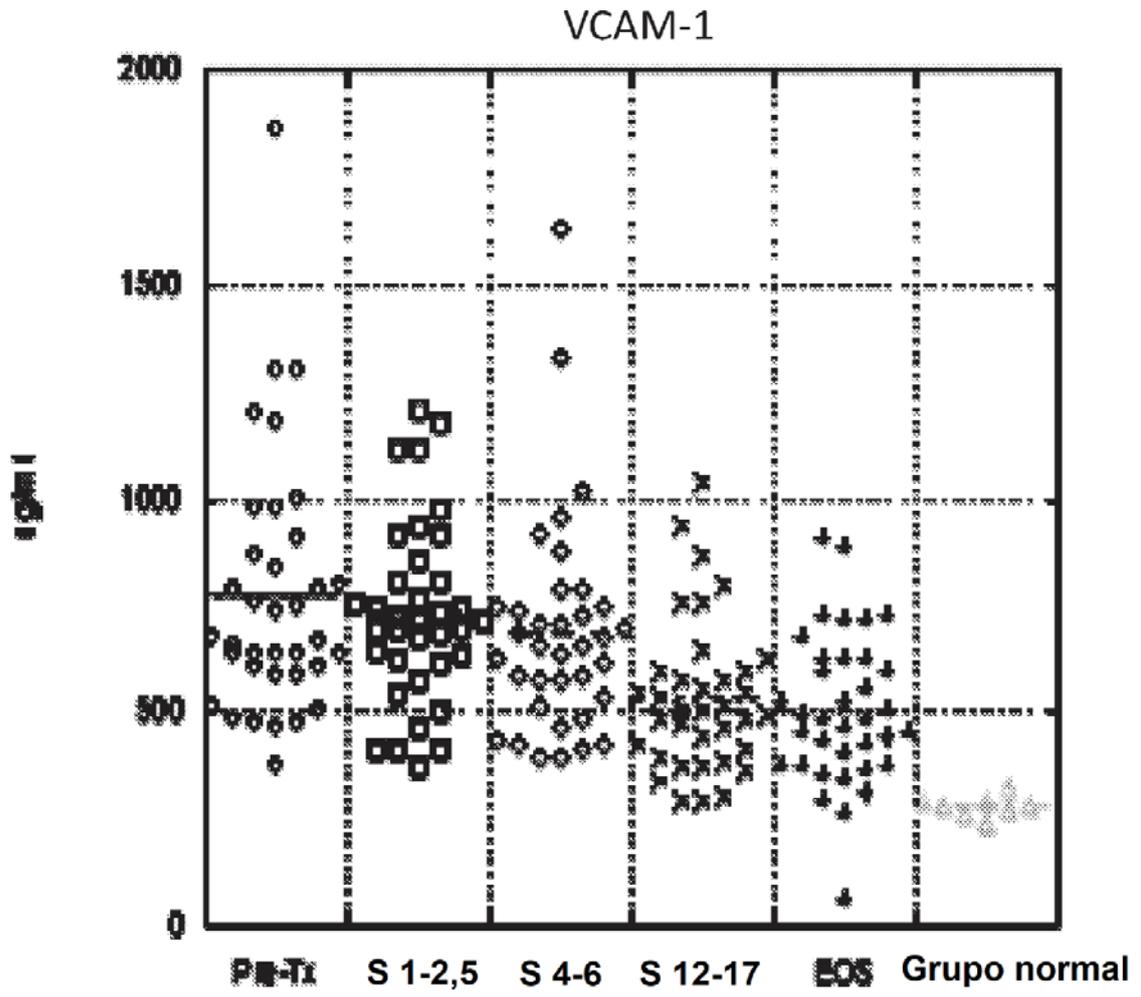


Fig. 5B

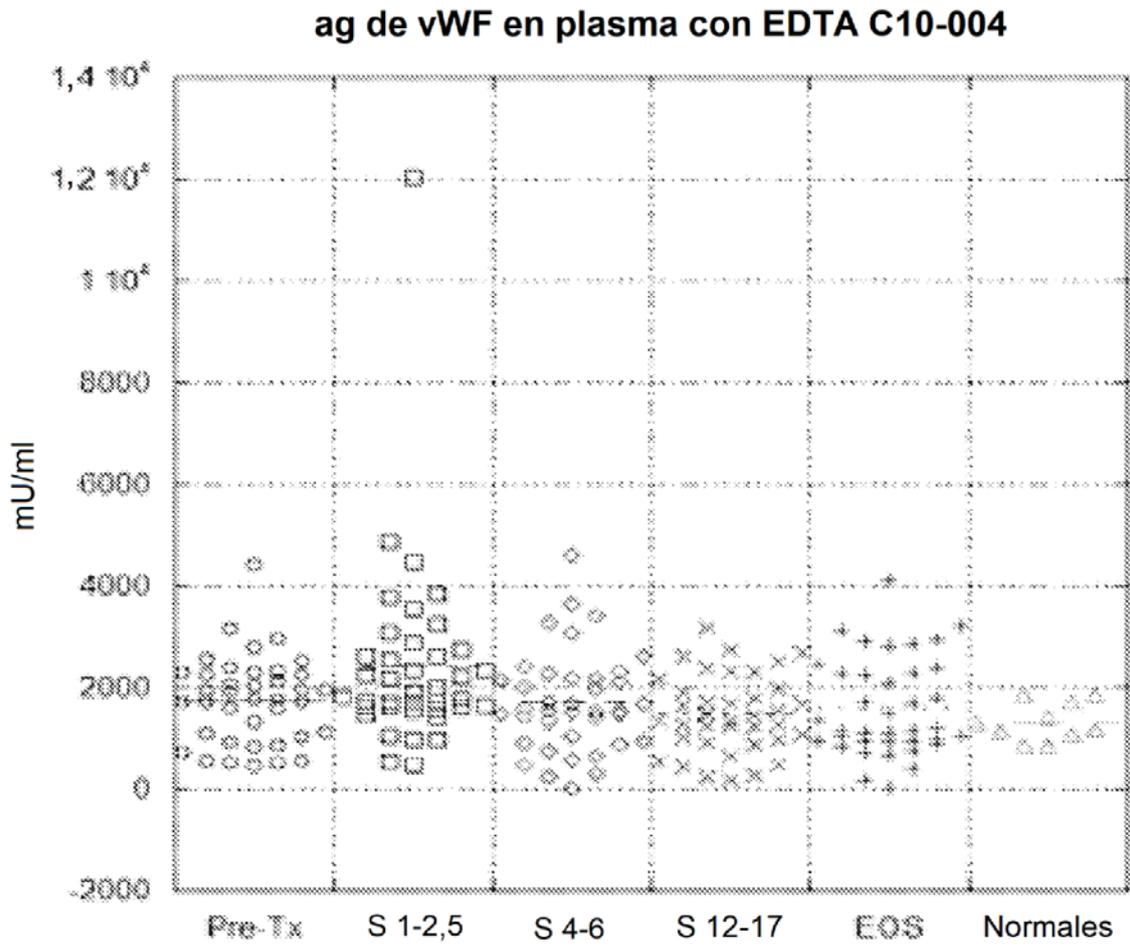


Fig. 5C

Factor de Von Willebrand

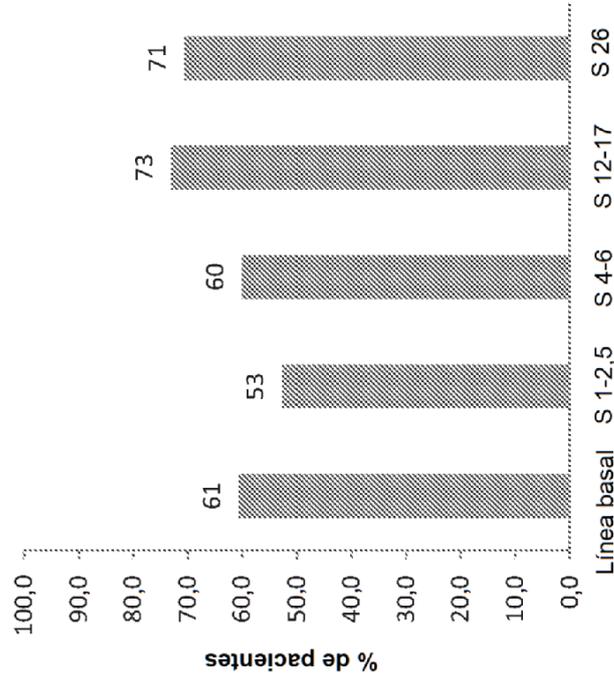


Fig. 6B

TM

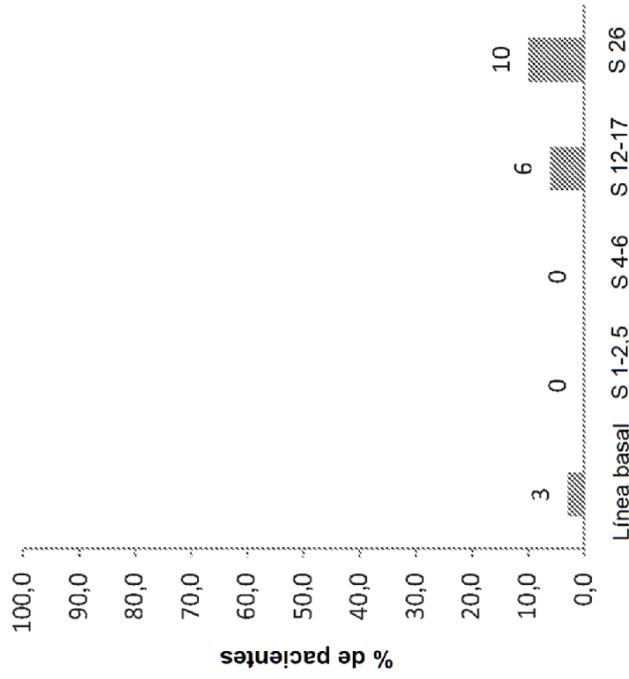


Fig. 6A

VCAM-1 (n=36)

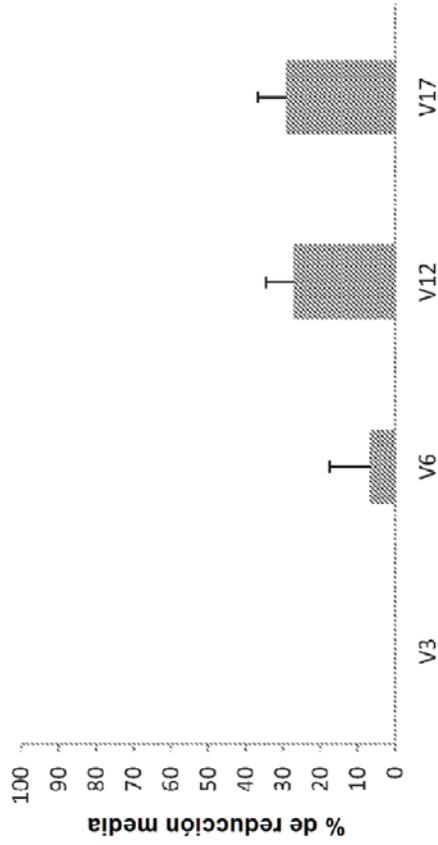


Fig. 6D

TM (n=33)

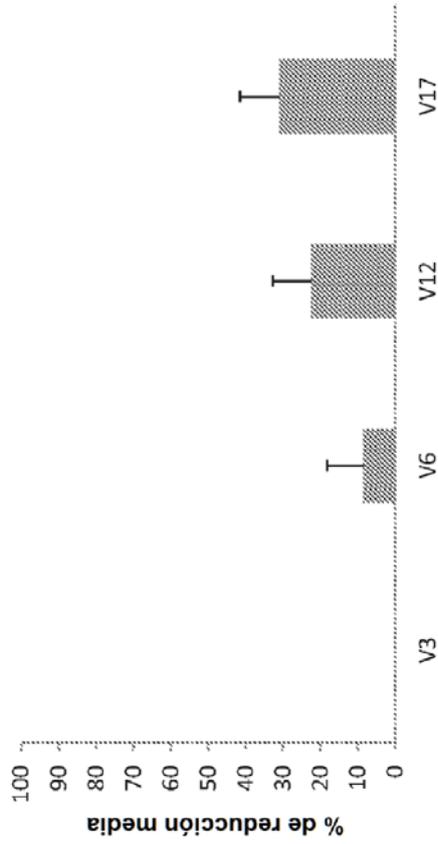


Fig. 6C

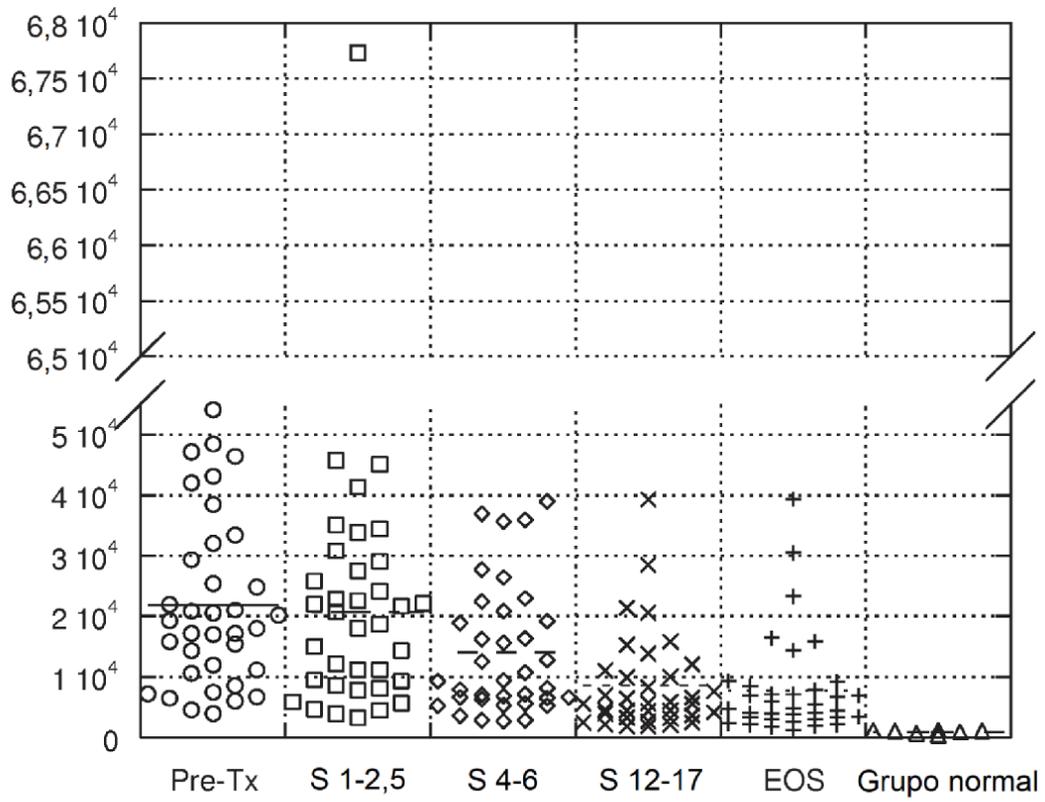


Fig. 7A

Normalización TNFR1

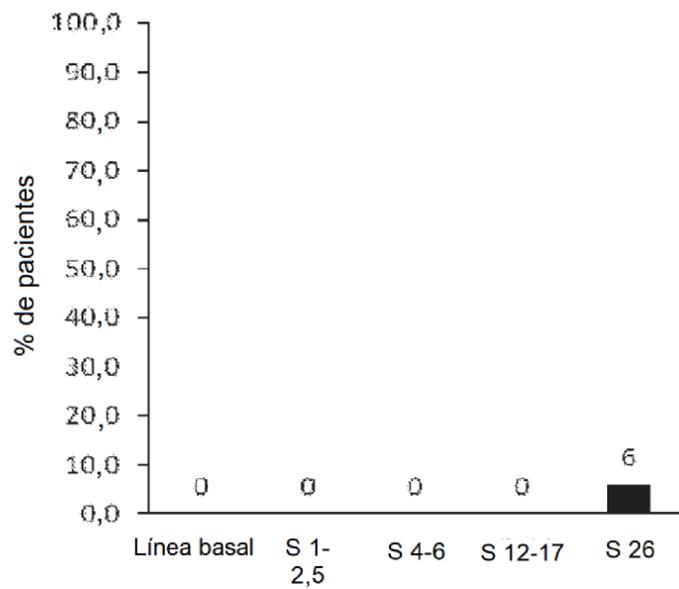


Fig. 7B

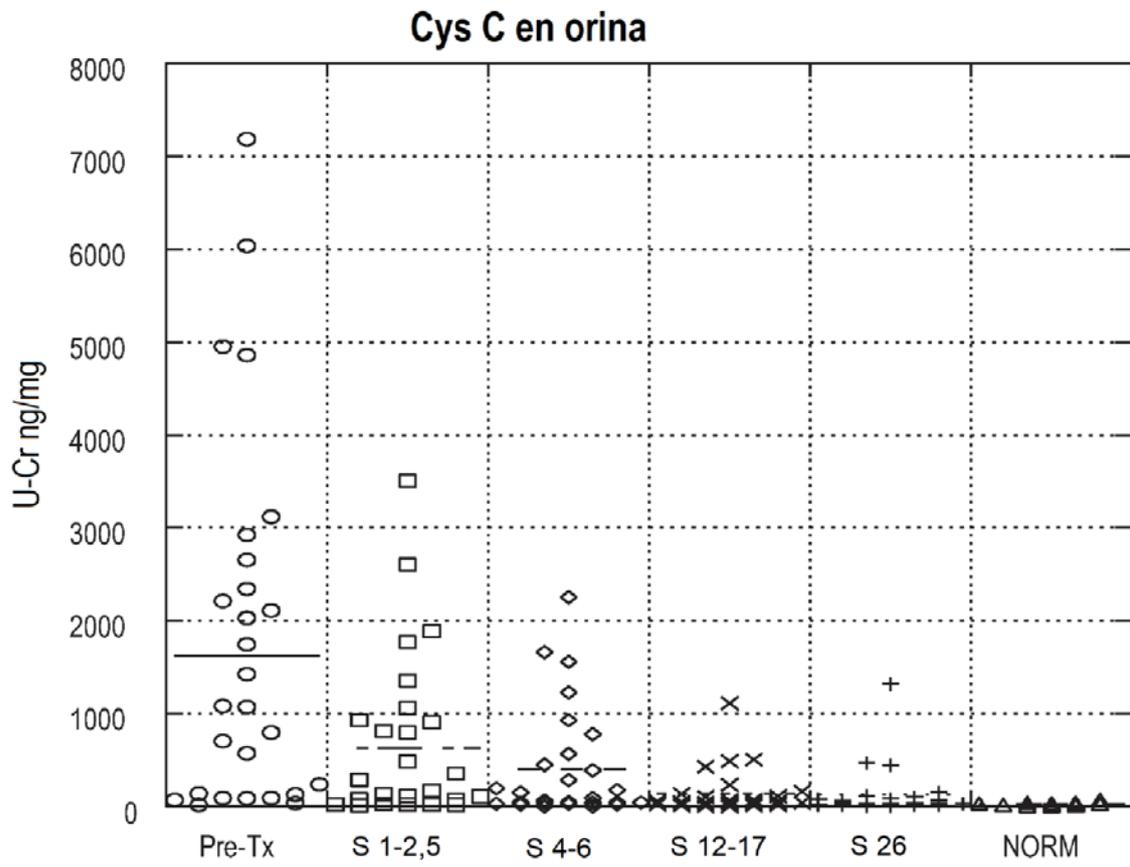


Fig. 8A

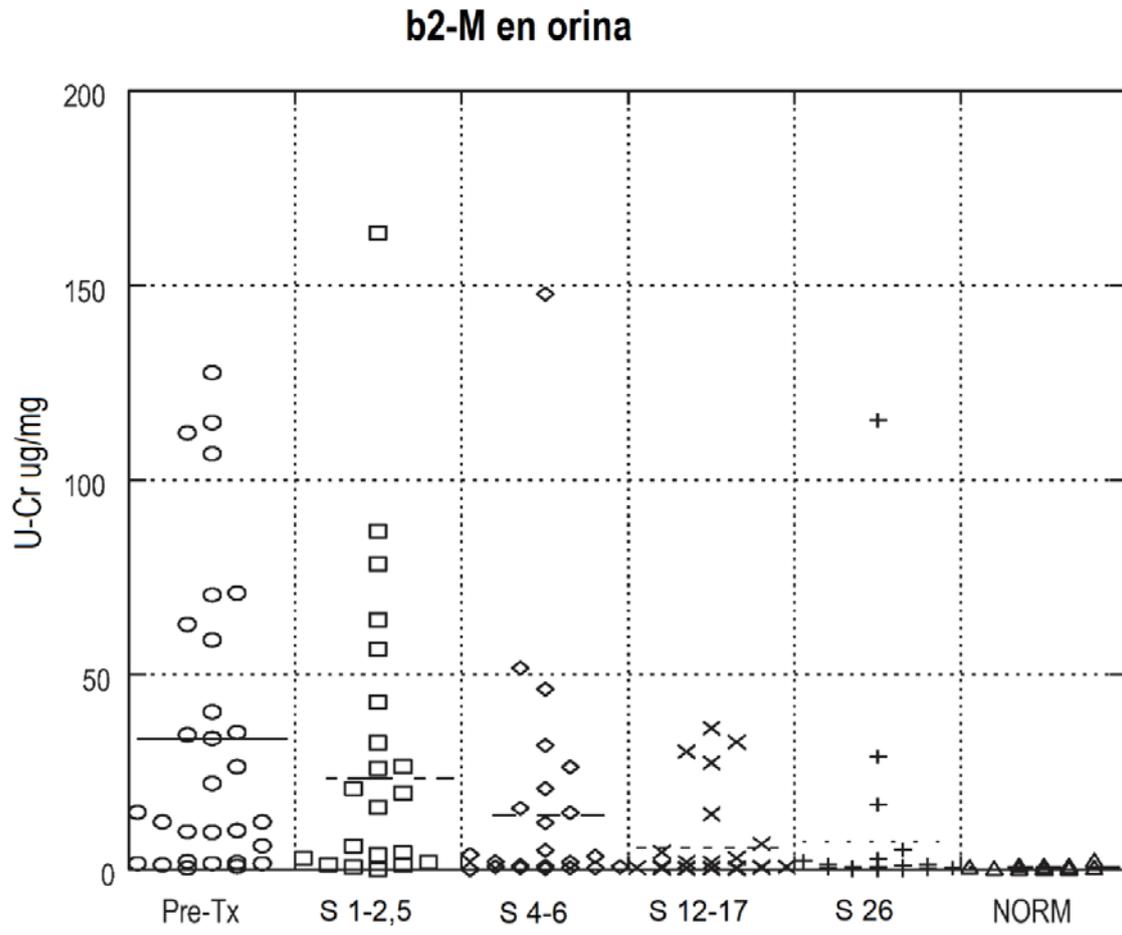


Fig. 8B

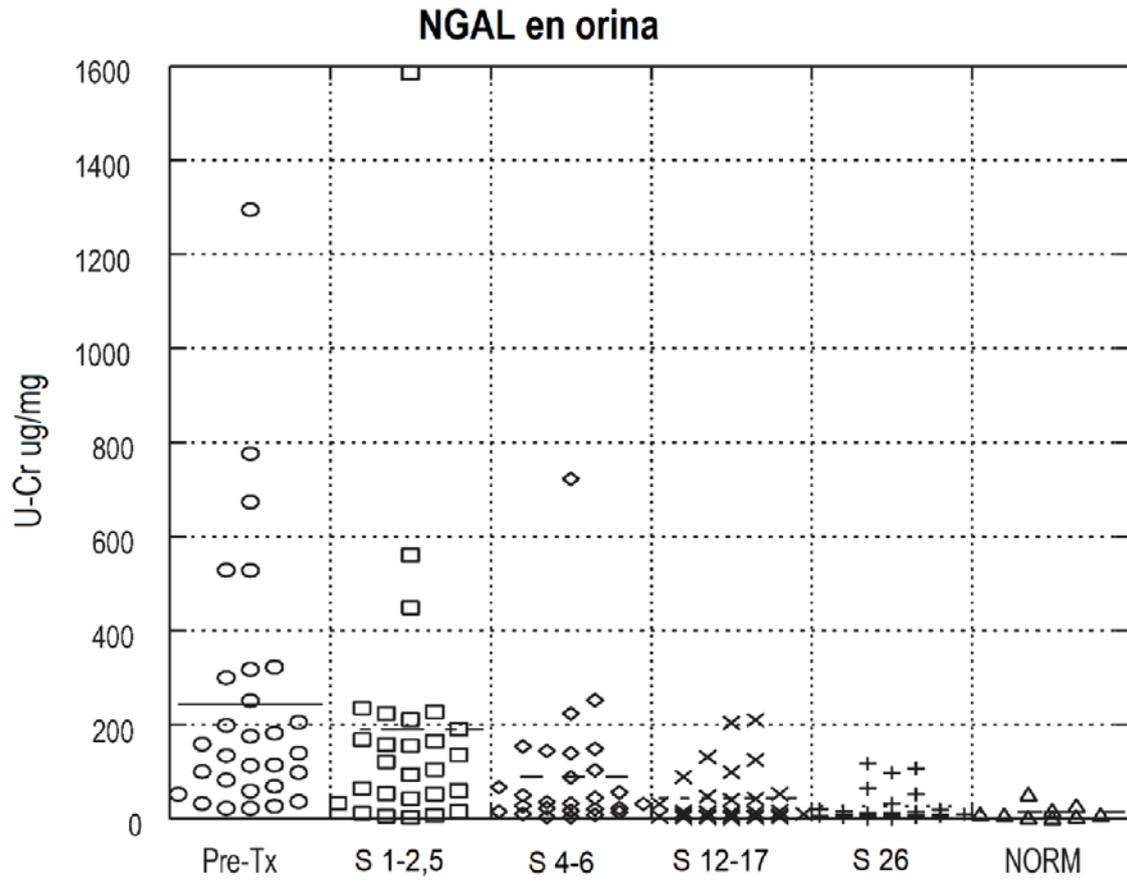


Fig. 8C

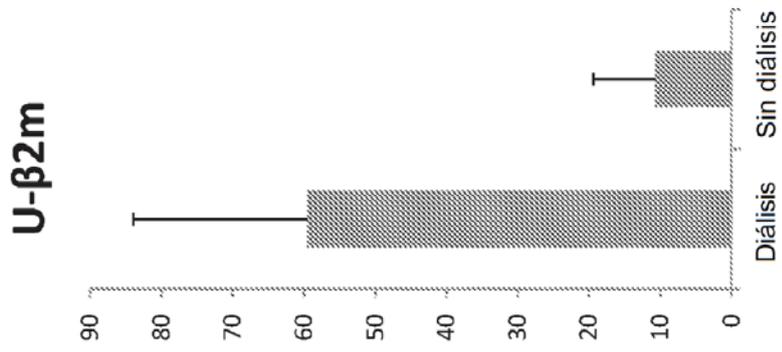


Fig. 9B

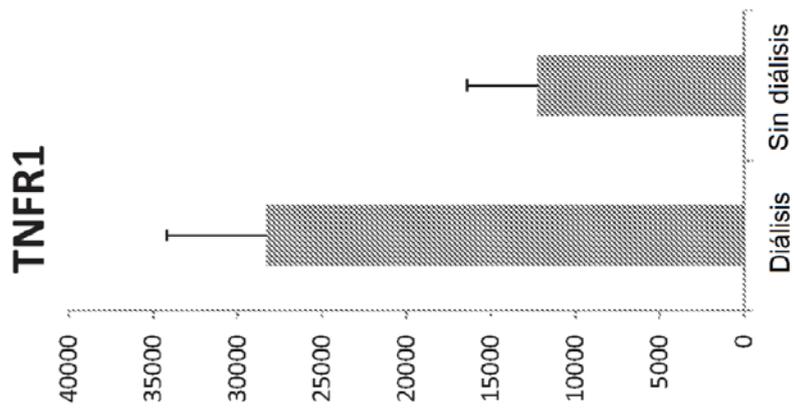


Fig. 9A

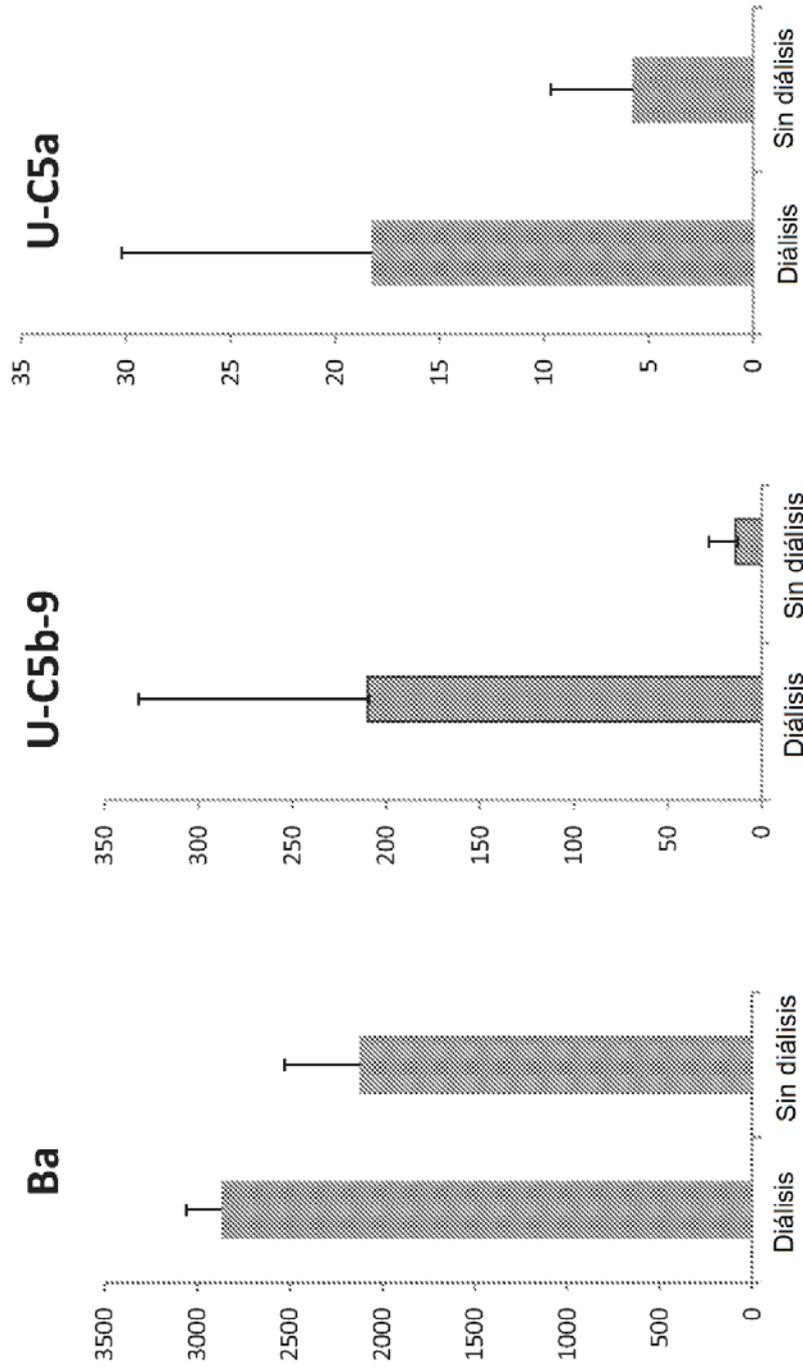


Fig. 9C

Fig. 9D

Fig. 9E

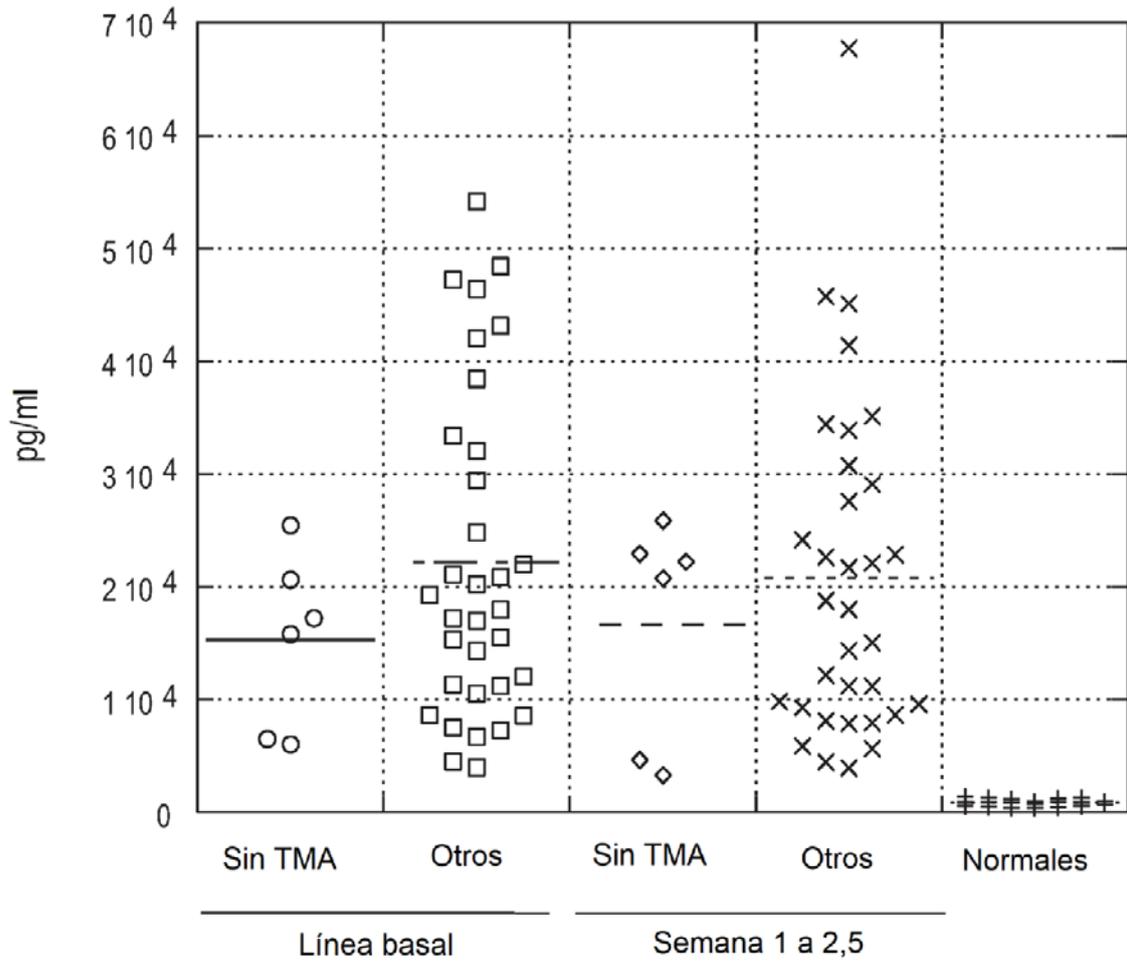
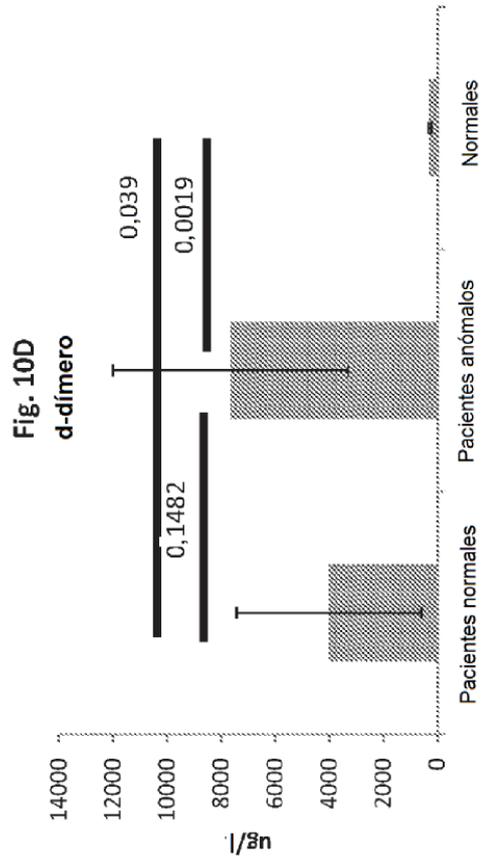
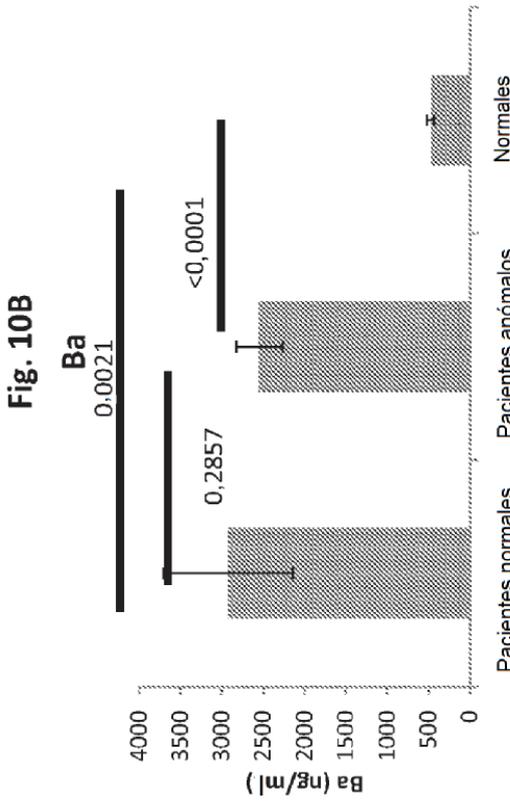
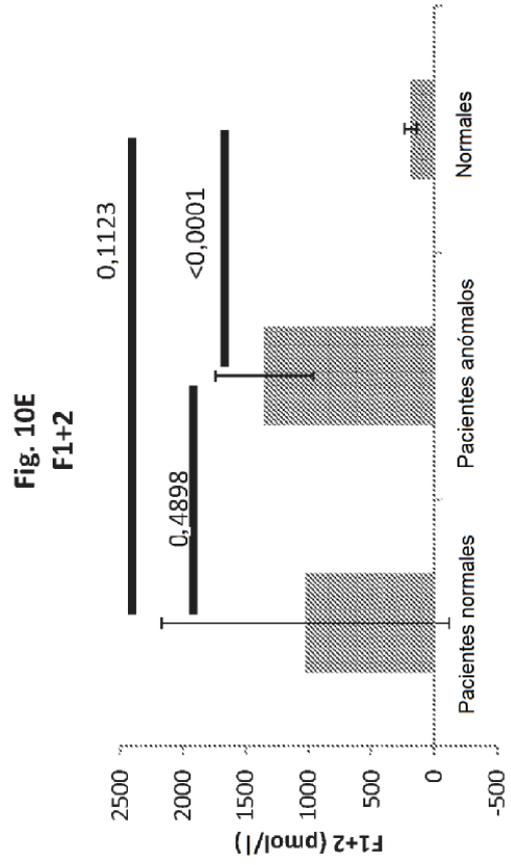
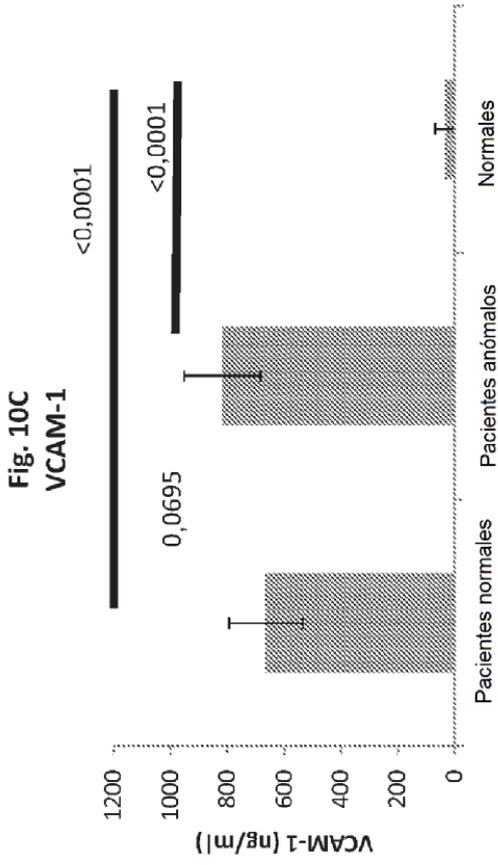
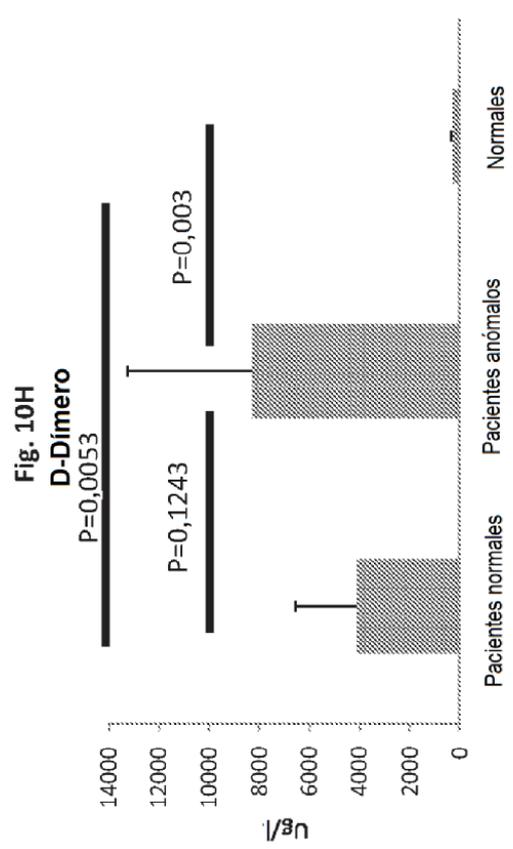
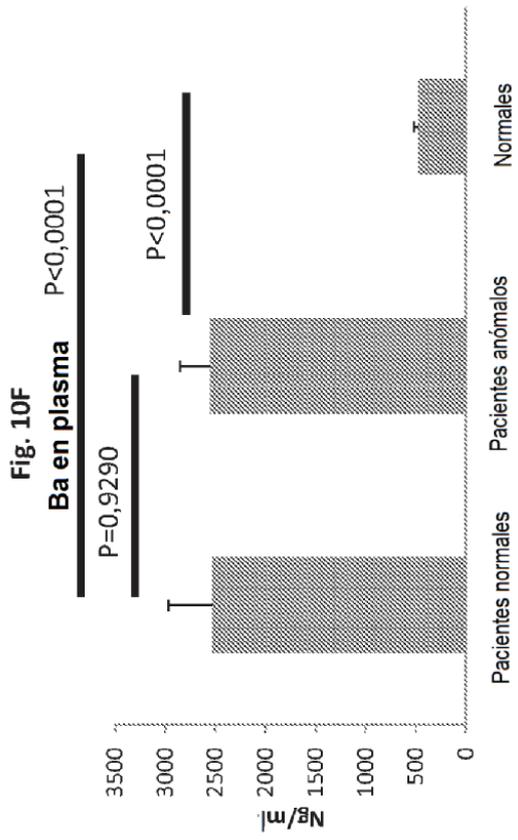
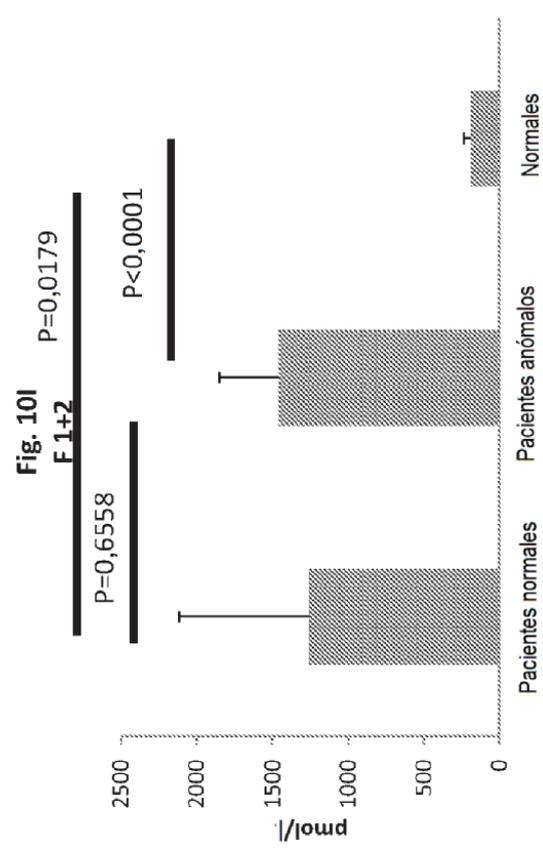
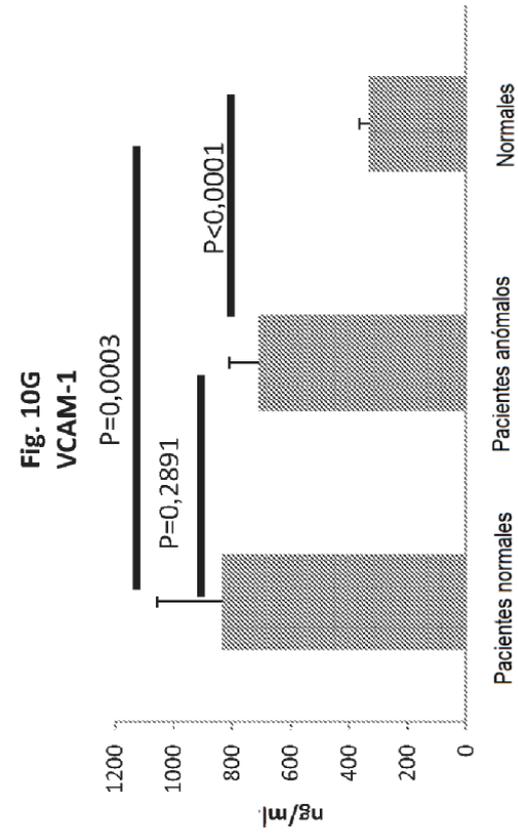


Fig. 10A





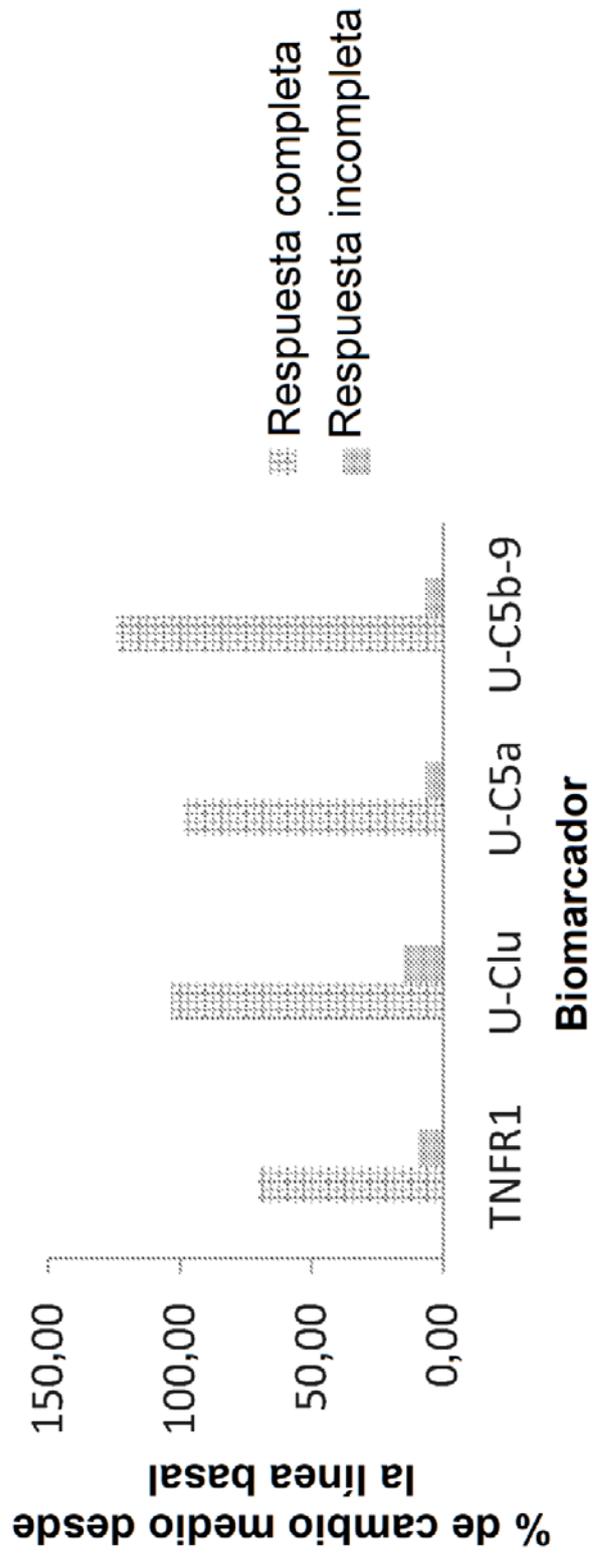


Fig. 11

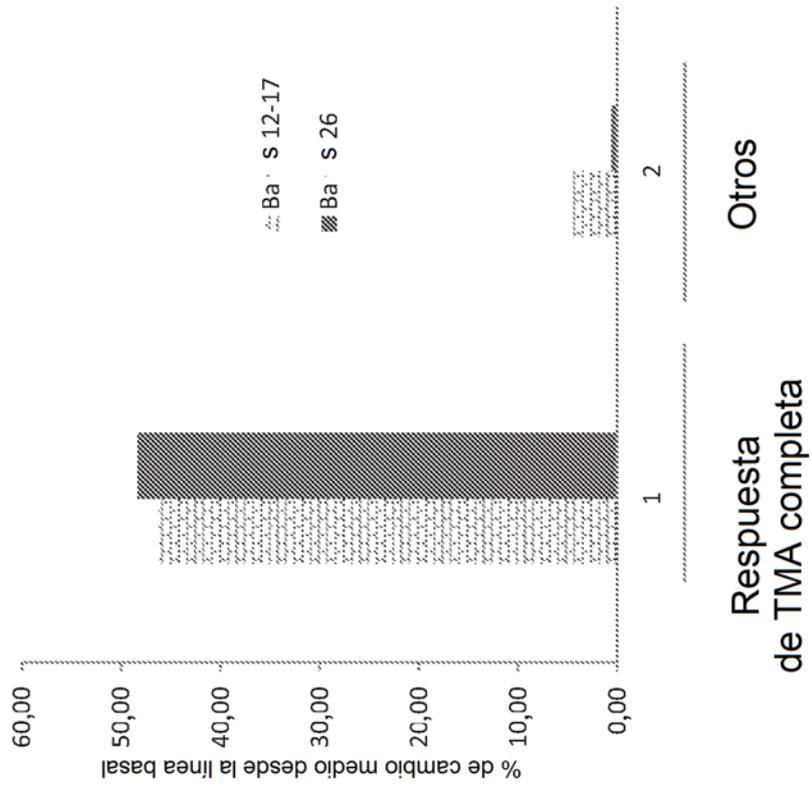
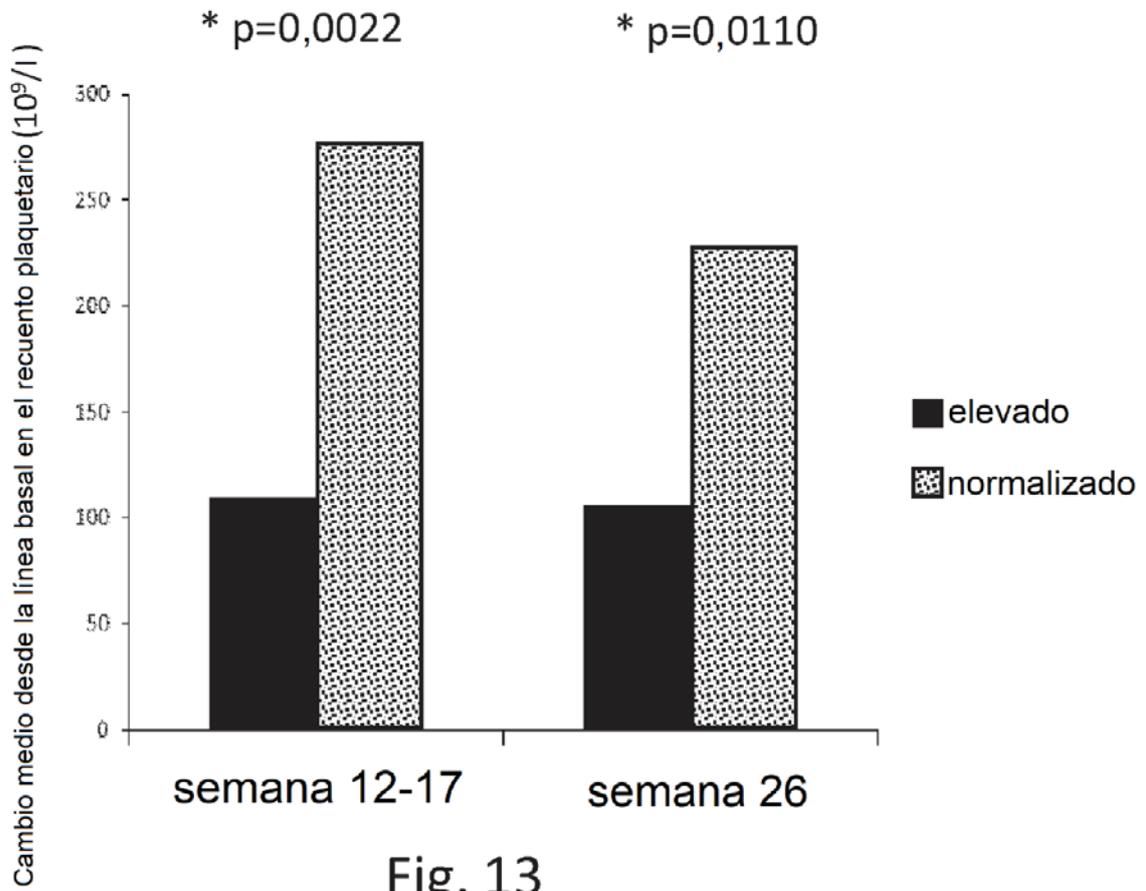


Fig. 12



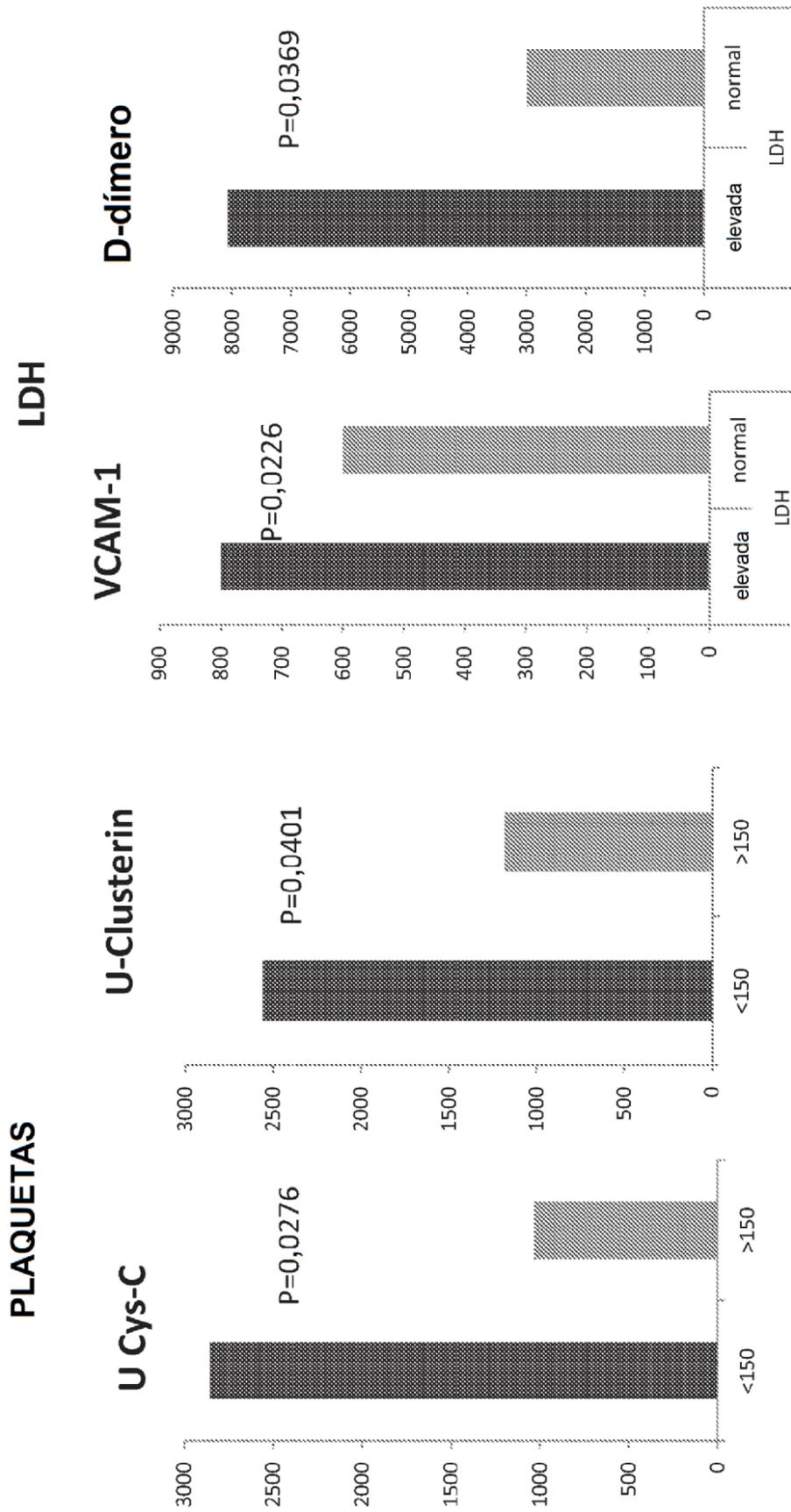


Fig. 14A

Fig. 14B

Fig. 14C

Fig. 14D

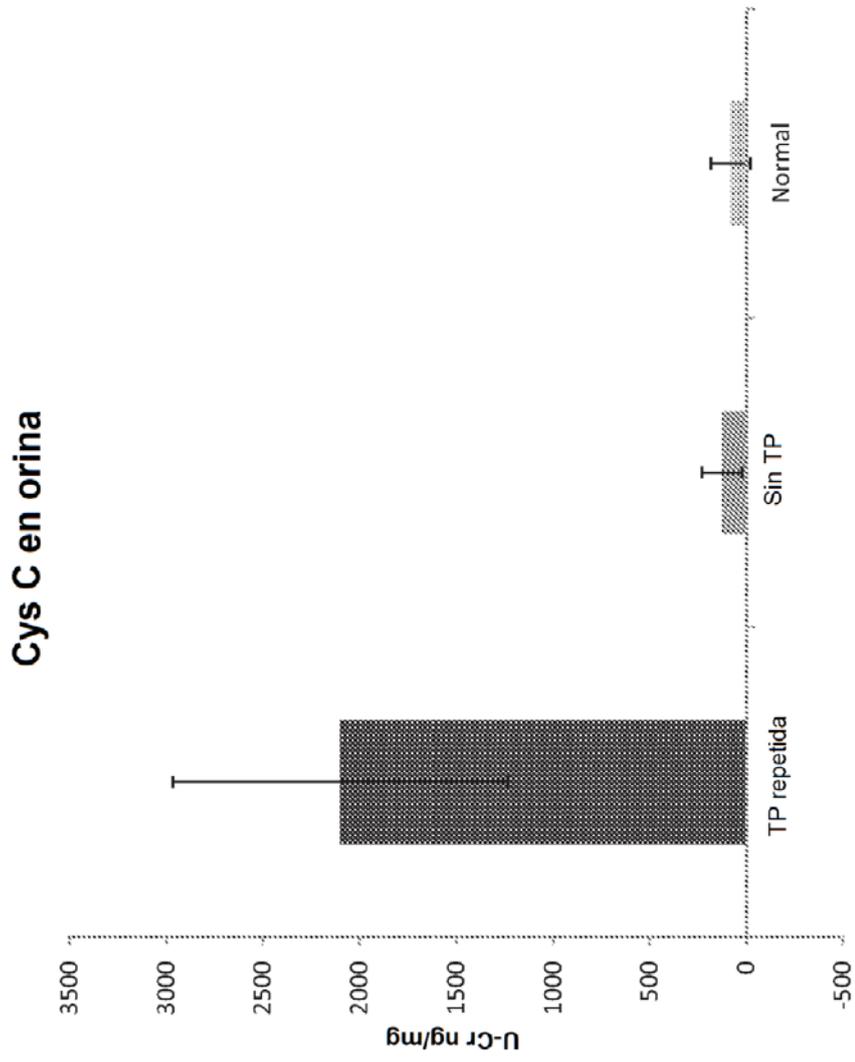


Fig. 15

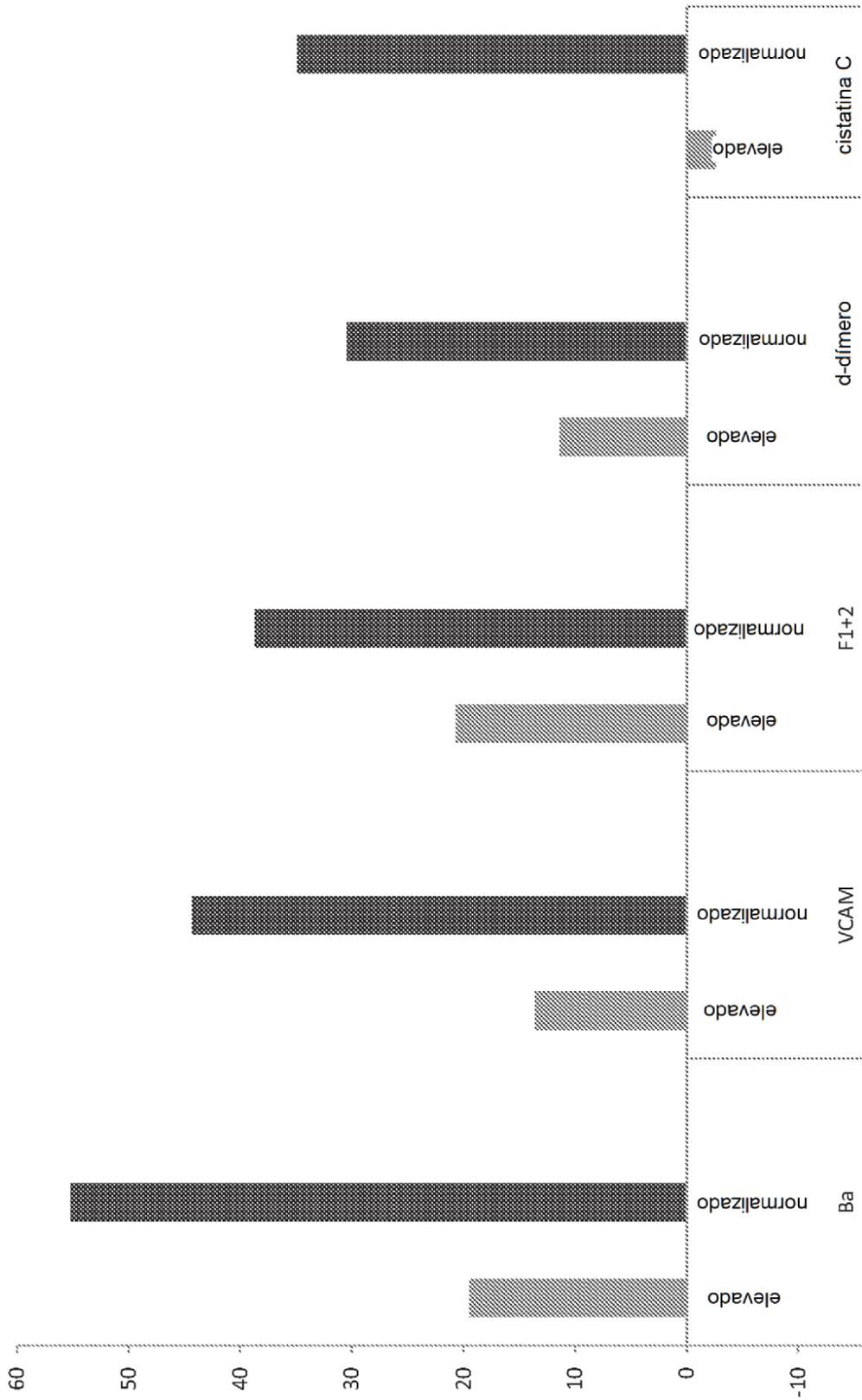


Fig. 16

Fig. 17A

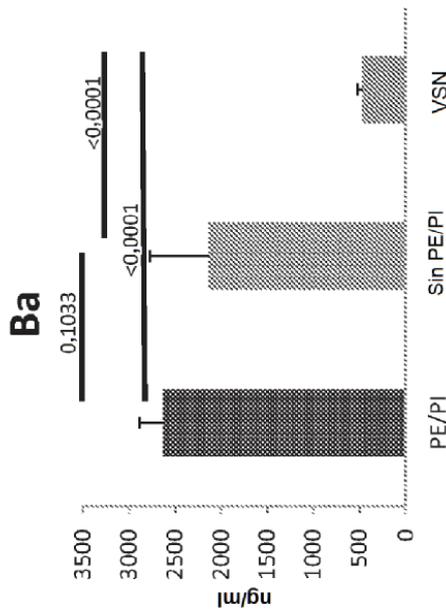
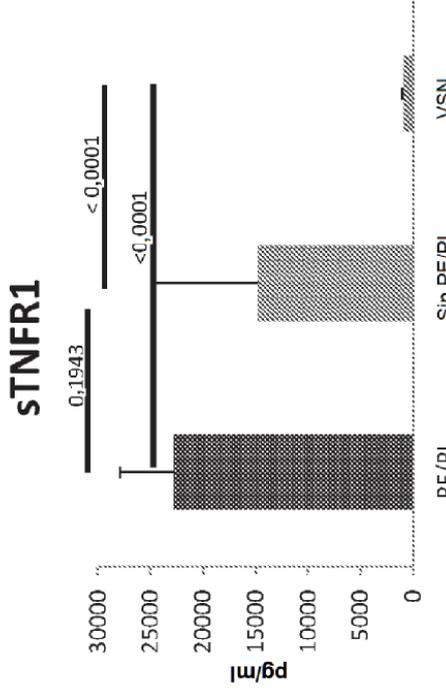
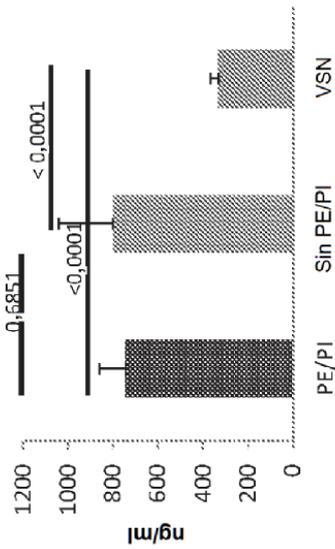


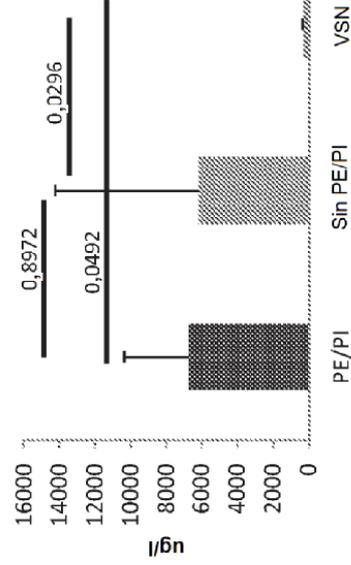
Fig. 17B



sVCAM-1



D-Dímero



U Cistatina C

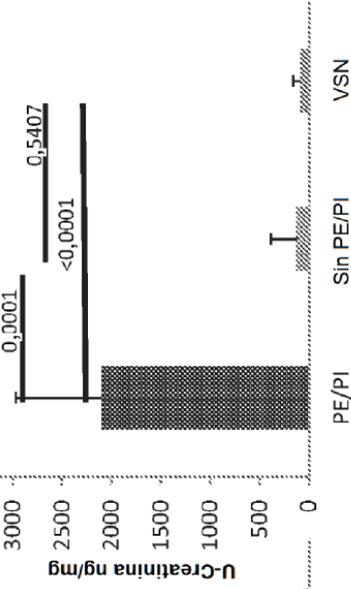


Fig. 17C

Fig. 17D

Fig. 17E

Fig. 18A

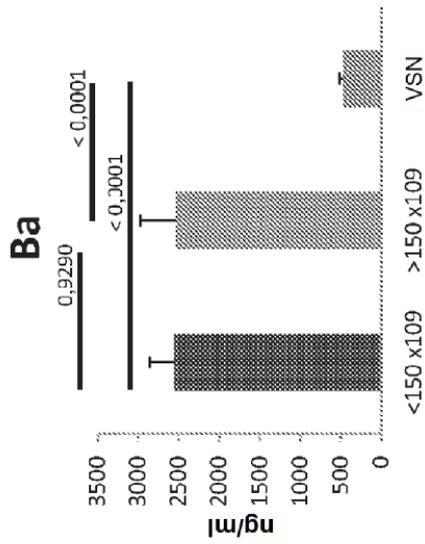
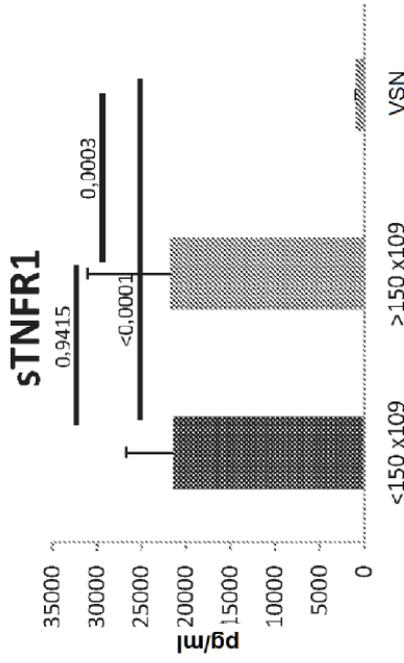
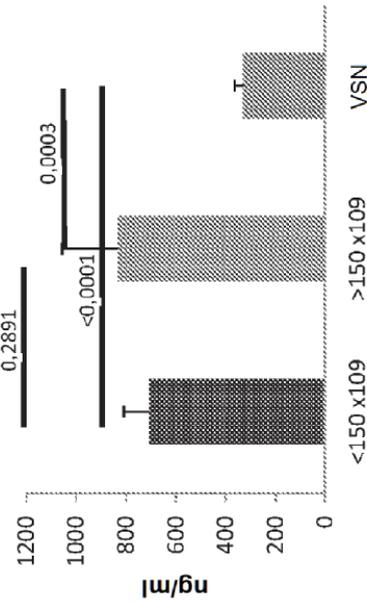


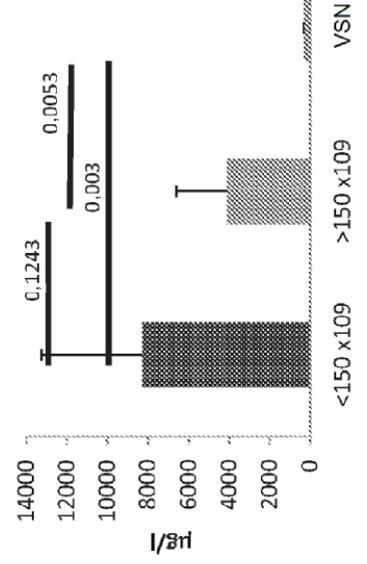
Fig. 18B



sVCAM-1



D-Dímero



U Cistatina C

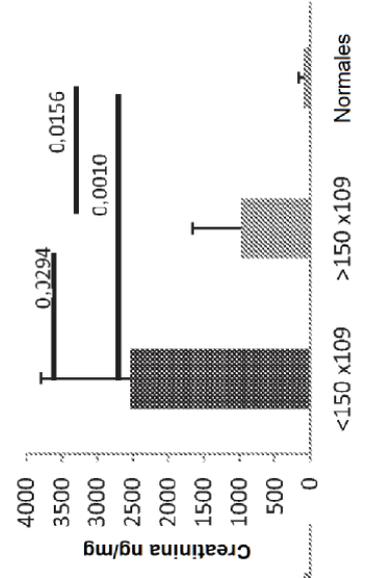


Fig. 18C

Fig. 18D

Fig. 18E

Fig. 19A

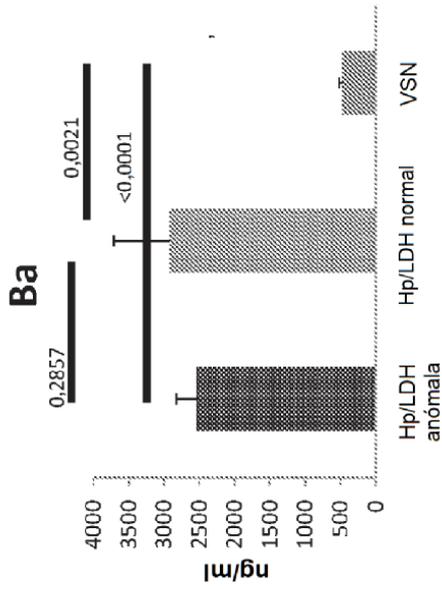


Fig. 19B

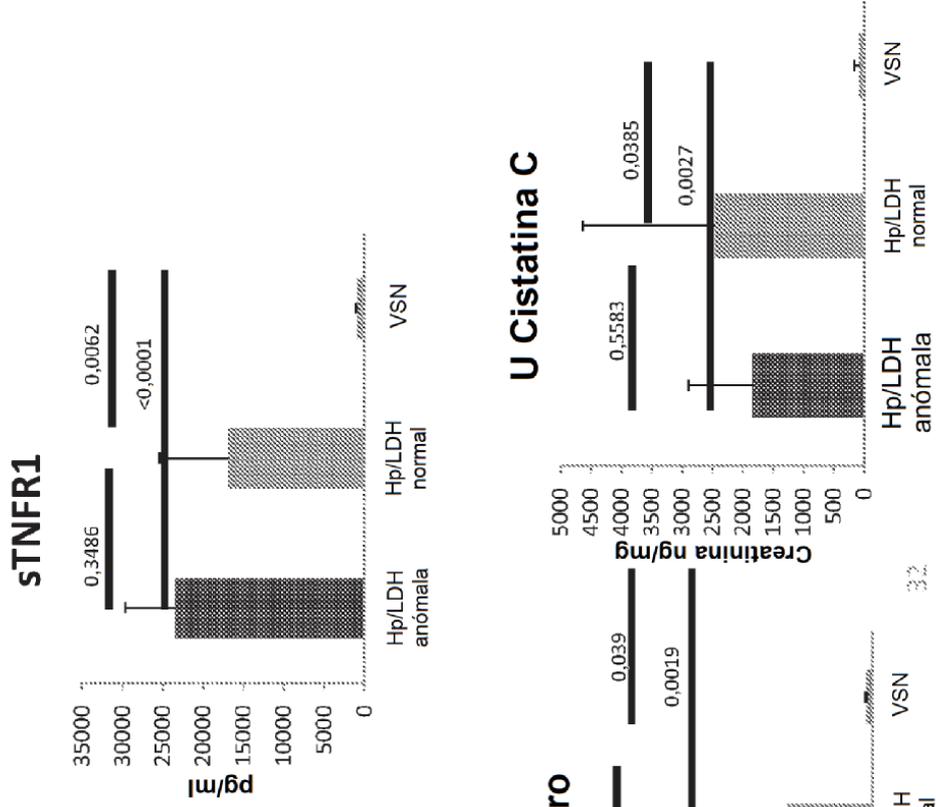


Fig. 19C

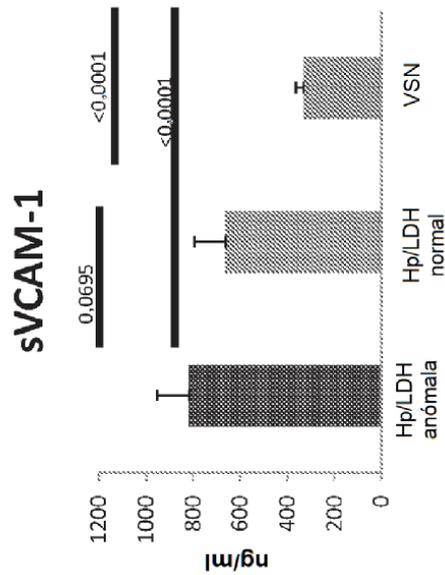


Fig. 19D

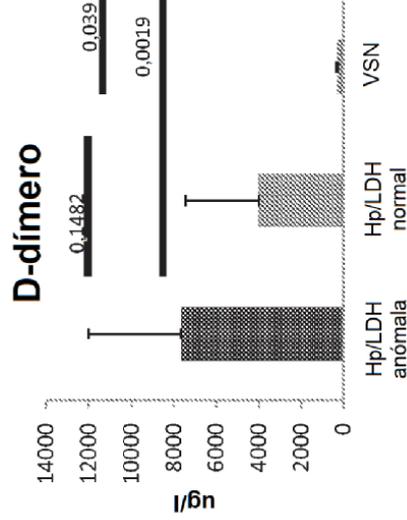
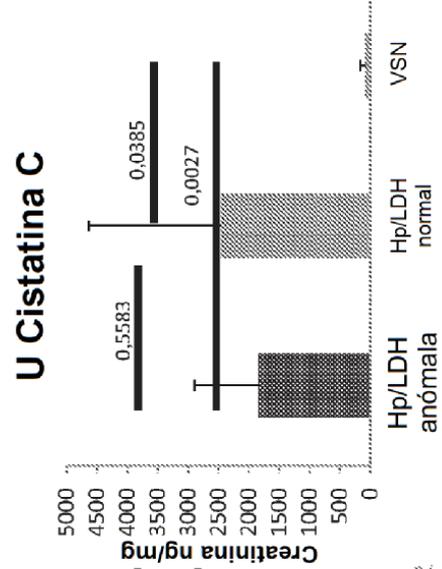


Fig. 19E



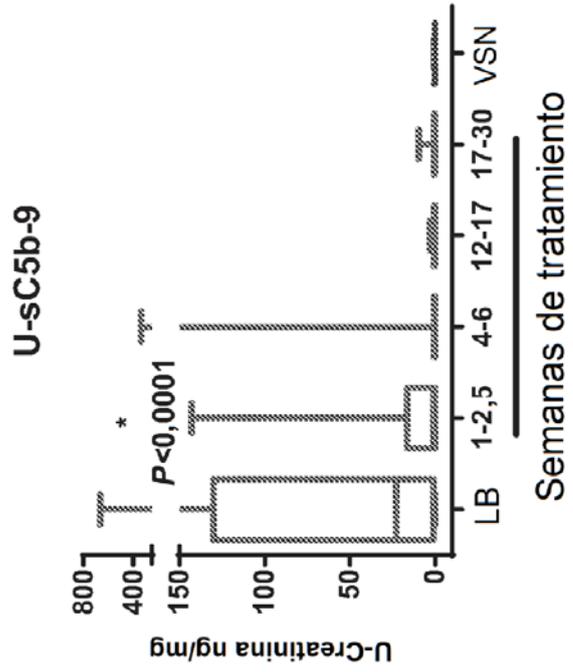


Fig. 20B

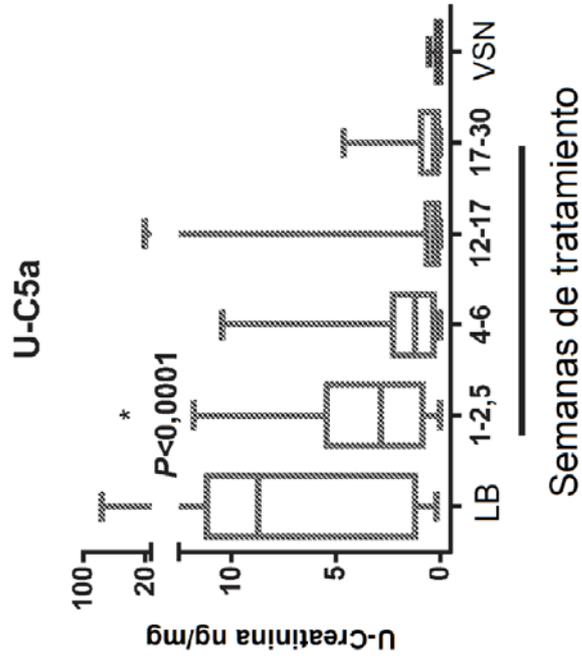


Fig. 20A

Fig. 21A

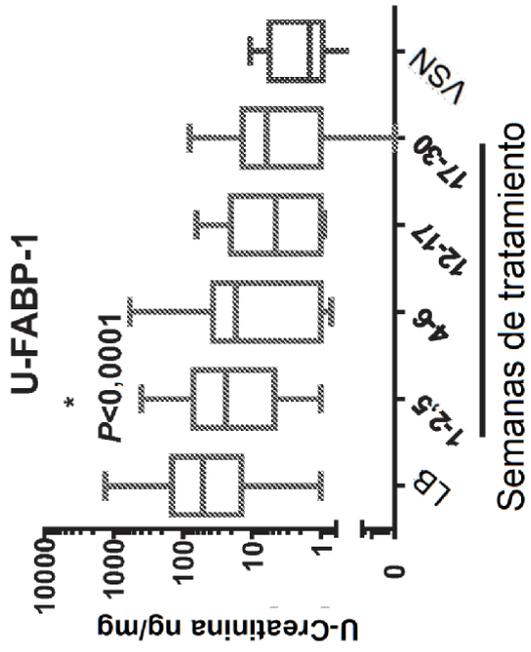


Fig. 21B

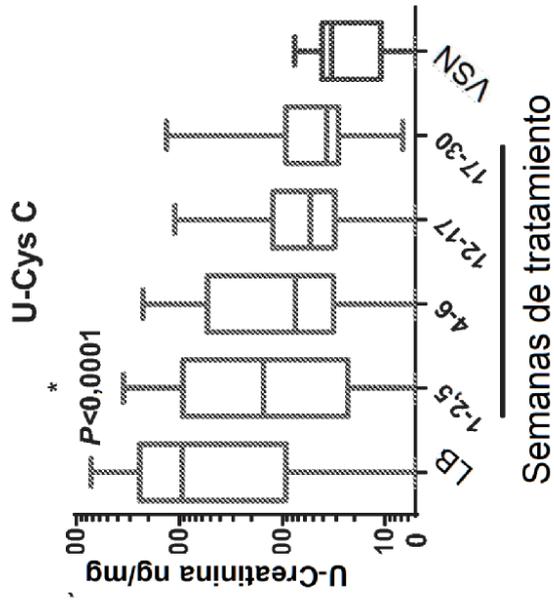
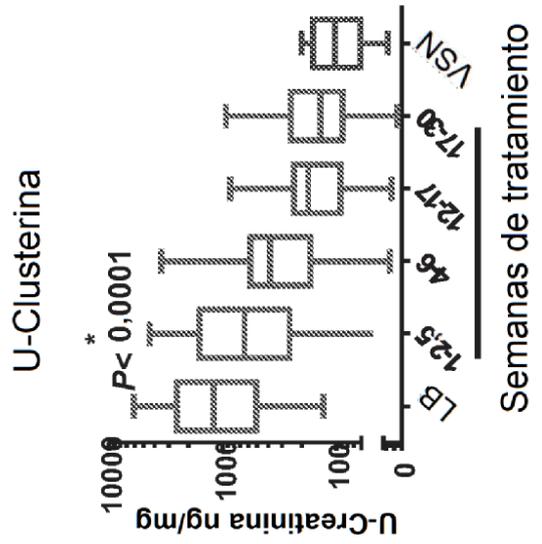


Fig. 21C



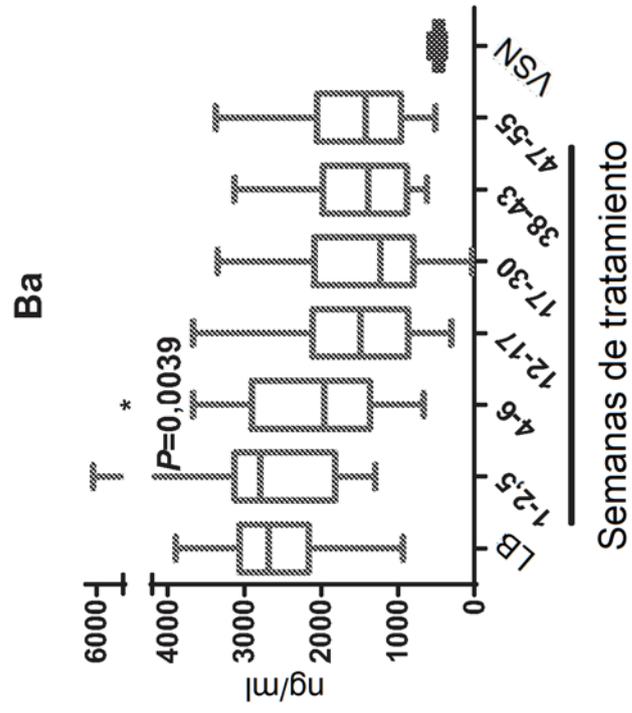


Fig. 22

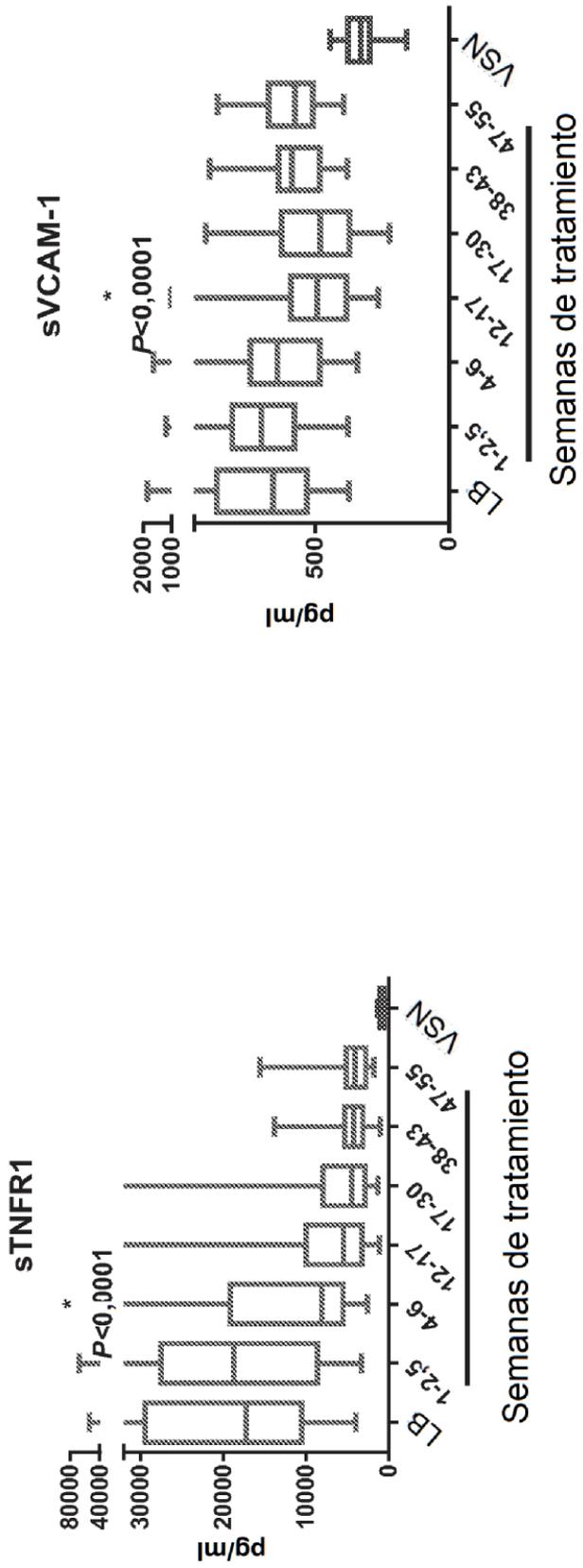


Fig. 23A

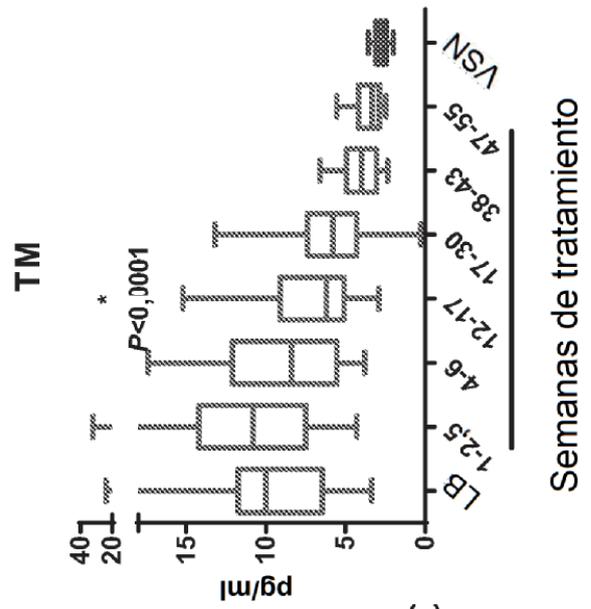


Fig. 23B

Fig. 23C

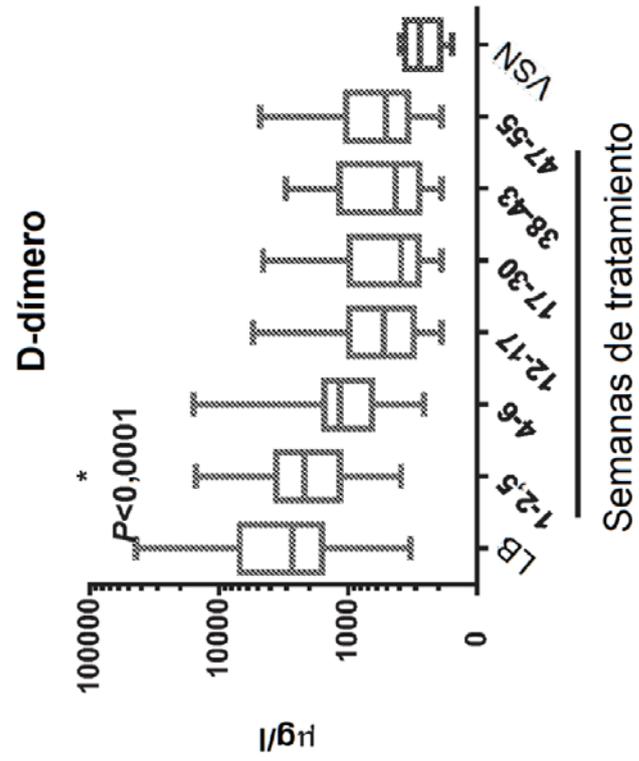


Fig. 24B

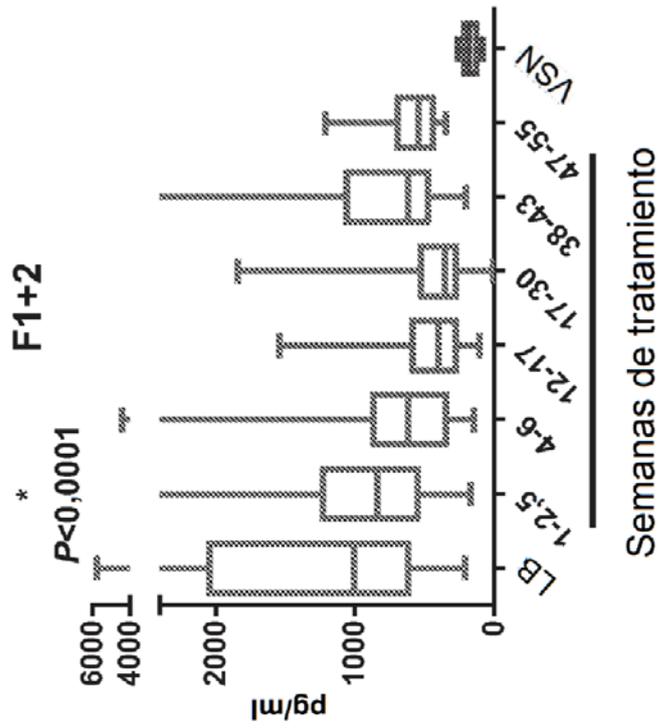


Fig. 24A