

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 078**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2014 PCT/US2014/055922**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2015 WO15039126**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2014 E 14843902 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 3046581**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de la microangiopatía trombótica asociada al hsct**

30 Prioridad:

**16.09.2013 US 201361878119 P**

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

**25.11.2020**

73 Titular/es:

**CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER  
(100.0%)  
3333 Burnet Avenue  
Cincinnati, Ohio 45229, US**

72 Inventor/es:

**JODELE, SONATA y  
LASKIN, BENJAMIN L.**

74 Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

ES 2 796 078 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

Composiciones y métodos para el tratamiento de la microangiopatía trombótica asociada al hsct

## 5 Antecedentes

En los Estados Unidos, hay más de 17 000 pacientes que se someten a un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT o trasplante de médula ósea) cada año para el tratamiento de síndromes malignos, de inmunodeficiencia, de insuficiencia de la médula ósea o síndromes genéticos/metabólicos. Si bien la supervivencia para estos pacientes ha mejorado durante la última década, la mortalidad después del HSCT sigue siendo inaceptablemente alta, ya que casi el 50 % de los pacientes no están vivos siete años después del trasplante. Las complicaciones del HSCT son una causa importante de morbilidad en esta población de pacientes. Una de estas complicaciones, la microangiopatía trombótica que se asocia al HSCT (HSCT-TMA, también se refiere como TA-TMA), también es una causa importante de muerte después del trasplante. En aquellos que sobreviven a la enfermedad, la HSCT-TMA puede estar asociada con la morbilidad a largo plazo que afecta a múltiples órganos con manifestaciones que incluyen hipertensión, enfermedad renal crónica (CKD), lesión del sistema nervioso central o gastrointestinal e hipertensión pulmonar.

Las revisiones retrospectivas más amplias informan que la incidencia de la HSCT-TMA es de 10-35 % en pacientes sometidos al HSCT. La HSCT-TMA se define clínicamente como la presencia de anemia hemolítica microangiopática de nuevo inicio en un receptor del HSCT: la anemia y la trombocitopenia que no se explican por otro proceso, la elevación de la lactato deshidrogenasa (LDH), las necesidades de transfusión excesiva y la esquistocitosis en la sangre. Confiar en criterios clínicos objetivos, específicos de órganos y no invasivos es crítico para el reconocimiento oportuno de la HSCT-TMA después del HSCT. Si bien una biopsia permanece como el "estándar de oro" para diagnosticar la microangiopatía trombótica en cualquier población de pacientes, un diagnóstico de tejido puede ser un desafío para los receptores del HSCT o los receptores que no son HSCT que tienen un alto riesgo de sangrado por recuento bajo de plaquetas y glóbulos rojos e hipertensión. La factibilidad limitada del diagnóstico de tejido después del HSCT ha llevado al desarrollo de criterios de diagnóstico no invasivos para la HSCT-TMA que se han actualizado varias veces, más recientemente por el grupo de Solicitantes y sirven para el diagnóstico clínico de la HSCT-TMA.

La microangiopatía trombótica que se asocia al trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT-TMA) grave es una complicación posterior al trasplante desafiante asociada con la morbilidad a largo plazo y la alta mortalidad. La HSCT-TMA comparte características con otras microangiopatías trombóticas donde la lesión endotelial afecta el riñón y a otros órganos. La HSCT-TMA leve puede presentarse en una alta proporción de receptores del HSCT y típicamente tiene un curso benigno que no requiere terapia o solo la modificación de la dosis del inhibidor de calcineurina. Sin embargo, una proporción de casos desarrollará la HSCT-TMA grave con hipertensión y daño renal que puede progresar a un daño vascular más generalizado con serositis, hipertensión pulmonar e insuficiencia orgánica multisistémica. Se necesita urgentemente una terapia dirigida para estos pacientes en quienes la mortalidad es a menudo la más alta. Durante más de 30 años ha habido obstáculos significativos en la búsqueda de terapias dirigidas para la HSCT-TMA debido a la comprensión limitada de la patogénesis de esta enfermedad y la naturaleza compleja general de los pacientes que se someten al HSCT. La comprensión limitada de la patogénesis de la HSCT-TMA ha dificultado el desarrollo y la aplicación de terapias efectivas.

de Latour, RP, y otros, 2013. British journal of hematology, 161 (2), pp. 279-280 describe el uso del eculizumab en un paciente con microangiopatía trombótica posterior al trasplante.

Si bien el Solicitante ha descubierto, como se describe en la presente, que ciertos tratamientos pueden ser efectivos en uno o más de los estados de enfermedad descritos, el Solicitante identificó además el problema que actualmente los métodos disponibles para determinar los niveles de los fármacos en suero descritos no podrían realizarse de manera oportuna. Dichas limitaciones en la detección de los niveles en suero impiden ajustes oportunos en la dosificación de los fármacos descritos y el tratamiento efectivo del paciente, lo cual es de particular importancia en el paciente crítico. Como tal, los nuevos métodos para determinar los niveles en suero de los fármacos descritos en pacientes, antes de la invención del Solicitante, eran una necesidad insatisfecha en la técnica.

La descripción instantánea busca abordar una o más de las necesidades mencionadas en la técnica.

## 55 Breve Resumen

Se describen fármacos capaces de inhibir la vía del complemento para usar para el tratamiento de la microangiopatía trombótica que se asocia al trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) (HSCT-TMA o TA-TMA) en un sujeto que se ha sometido a un HSCT. También se describen métodos para usar los fármacos capaces de inhibir la vía del complemento para usar para el tratamiento de la microangiopatía trombótica que se asocia al trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) (HSCT-TMA o TA-TMA) en un sujeto que se ha sometido a un HSCT.

La invención proporciona un anticuerpo monoclonal humanizado capaz de inhibir el complemento terminal para usar en el tratamiento de la microangiopatía trombótica que se asocia al trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) en un sujeto que se ha sometido a un trasplante de médula ósea, en donde dicho tratamiento comprende la administración

de dicho anticuerpo monoclonal humanizado para dicho sujeto, en donde dicho anticuerpo monoclonal humanizado es el eculizumab y se administra de una manera suficiente para alcanzar un nivel terapéutico del eculizumab en dicho sujeto, en donde dicho nivel terapéutico comprende un nivel mínimo de eculizumab en suero sanguíneo mayor que o al menos 99 µg/ml.

5

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 representa la mortalidad sin recaída en pacientes con y sin HSCT-TMA 1 año después del HSCT. El método de riesgo competitivo de Gray se usó para obtener la incidencia acumulada de la mortalidad sin recaída (NRM). El NRM de 1 año para sujetos con TMA fue de 43,6 (SE + -8 %) y 7,8 ± 3,8 % en sujetos con HSCT sin TMA (p <0,0001).

10

La Figura 2 representa la activación del complemento en HSCT-TMA.

La Figura 3 representa los depósitos de C4d en arteriolas renales afectadas por la TMA. Muestra representativa de biopsia renal de un sujeto con evidencia histológica de HSCT-TMA después del trasplante de células madre hematopoyéticas. A, tinción con hematoxilina y eosina (aumento H&E, x20) de la corteza renal con glomérulos. Las arteriolas pequeñas (flechas) muestran obliteración de la luz del vaso debido a células endoteliales desprendidas, proliferación intimal y depósito de matriz extracelular indicativo de TMA. La tinción de C4d (aumento de C4d, x20) de la sección de tejido correspondiente muestra una tinción positiva difusa en la arteriola pequeña degenerativa con cambios microangiopáticos. Las tinciones de C4d se realizaron en el laboratorio de patología clínica en CCHMC mediante el uso de técnicas certificadas para usar en pruebas clínicas (laboratorio aprobado por CLIA). Los depósitos arteriales C4d se encontraron casi exclusivamente en pacientes con HSCT-TMA en comparación con los pacientes con HSCT sin HSCT-TMA (6/8 (75 %) frente a 1/12 (8 %) p = 0,004). Esta fue la primera evidencia de depósitos de complemento en las arteriolas de sujetos con TMA después del HSCT, lo que respalda la participación clásica del complemento en la lesión vascular con HSCT-TMA y posiblemente explica la hipertensión grave observada en pacientes con HSCT-TMA.

15

20

25

La Figura 4 representa la activación del complemento terminal en pacientes con HSCT con HSCT-TMA y sin HSCT-TMA.

La Figura 5 representa las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para sujetos con TMA (n = 39) sin proteinuria y sC5b-9 normal, proteinuria ≥30 mg/dl y sC5b-9 normal, sin proteinuria y sC5b-9 elevada, y ambas proteinuria ≥30 mg/dl y sC5b-9 elevado en el momento del diagnóstico de la HSCT-TMA.

30

La Figura 6 representa la correlación longitudinal de los niveles de CH50 y eculizumab en suero. Se representa una correlación representativa del nivel diario de eculizumab (línea discontinua) en suero con el nivel de CH50 (línea continua). El nivel de eculizumab previamente informado que se requiere para bloquear el complemento terminal de 99 µg/ml se estableció en pacientes con un trastorno diferente, el síndrome urémico hemolítico atípico, aHUS. Este gráfico muestra claramente que a medida que los niveles de eculizumab caen por debajo de 99 µg/ml, el nivel de CH50 aumenta rápidamente en sujetos con HSCT-TMA después de HSCT. Este gráfico también ilustra que el nivel de eculizumab no se mantiene por encima de > 99 µg/ml durante 1 semana mediante el uso del régimen de dosificación actualmente aprobado para el aHUS y, por lo tanto, se requiere un seguimiento de la dosis farmacocinética en pacientes con HSCT con HSCT-TMA para determinar la dosis requerida (mg) y el momento para mantener una inhibición clínicamente significativa de la vía del complemento.

35

40

La Figura 7 representa el rendimiento diagnóstico del nivel de CH50 para predecir la concentración de eculizumab mediante el uso del método de inmunoensayo enzimático (n = 6). El nivel de corte óptimo de CH50 asociado con un nivel mínimo de eculizumab > 99 µg/ml se determinó en base a una curva ROC (a) para maximizar el índice de Youden que se define como especificidad + sensibilidad-1 (b). De acuerdo con el análisis, se encontró que el nivel de corte óptimo de CH50 es de 3,5 unidades CAE (b). Todos los valores se clasificaron en dos grupos por encima y por debajo de este nivel de corte de CH50 como se muestra en el panel c. El eje Y muestra las concentraciones de eculizumab en escala logarítmica. El eje X muestra el nivel de CH50 por grupo. Las líneas horizontales representan las medianas. El análisis estadístico posterior se realizó para evaluar la diferencia en la concentración de eculizumab entre los dos grupos mediante una prueba U de Mann-Whitney. Un nivel de CH50 de 0-3 unidades CAE correspondió con una concentración de eculizumab > 99 µg/ml en todas, excepto una medición (extraída de un paciente durante una fase de eliminación extremadamente rápida en la primera semana de tratamiento). Por el contrario, en todos los puntos de tiempo de muestreo, un nivel de CH50 > 3 unidades CAE correspondió con un nivel por debajo del terapéutico de ≤99 µg/ml (p = 0,0001).

45

50

55

La Figura 8 representa el rendimiento diagnóstico del nivel de CH50 para predecir la concentración de eculizumab mediante el uso de otro ensayo disponible, un método hemolítico mediante el uso de eritrocitos de oveja estandarizados (n = 12). El nivel de corte óptimo de CH50 para un nivel mínimo terapéutico de eculizumab ≤99 µg/ml se determinó en base a una curva ROC (a) para maximizar el índice de Youden que se define como especificidad + sensibilidad-1 (b). De acuerdo con el análisis, se encontró que el nivel de corte óptimo de CH50 es de 15,5 unidades de CH50 mediante el uso de este ensayo hemolítico (b). Todos los valores se clasificaron en dos grupos por encima y por debajo del límite de CH50 como se muestra en el panel c. El eje Y muestra las concentraciones de eculizumab en escala logarítmica. El eje X muestra el nivel de CH50 por grupo. Las líneas horizontales representan las medianas. El análisis estadístico posterior se realizó para evaluar la diferencia en la concentración de eculizumab entre los dos grupos mediante la prueba U de Mann-

60

65

Whitney. La Figura 8a son datos obtenidos durante la terapia con eculizumab, y la Figura 8b representa los datos obtenidos después de la primera y segunda dosis de eculizumab.

La Figura 9 representa el bloqueo del complemento terminal por el eculizumab. En esta figura se presentan los análisis representativos del seguimiento de la farmacocinética y farmacodinámica del eculizumab durante las primeras 3 semanas de tratamiento. Los ejes y superior izquierdo y derecho muestran las concentraciones de eculizumab y los niveles de actividad total del complemento (CH50), respectivamente, mediante el uso del inmunoensayo enzimático. El eje y inferior muestra el nivel sC5b-9. El eje x muestra el tiempo en días desde el inicio de la terapia con eculizumab con la primera dosis de eculizumab que se administró el día 1. La dosis (mg) y el momento de la administración se indican con flechas en la parte superior de cada figura. Los círculos azules representan las concentraciones observadas de eculizumab. Los valores medidos reales se indican al lado de los círculos solo cuando la concentración de eculizumab está por debajo de 99 µg/ml. Las líneas discontinuas azules representan los perfiles farmacocinéticos predichos de eculizumab basados en un análisis de 1 compartimento. Los círculos rojos representan el nivel de CH50 medido por un ensayo hemolítico. Los valores reales se enumeran en el gráfico solo cuando el nivel CH50 está por encima de 15 unidades CH50. Los círculos verdes representan los niveles de sC5b-9 en suero (72 a 244 ng/ml normales, área sombreada). El nivel elevado de sC5b-9 indica el complemento terminal activado. La figura muestra que el tiempo hasta la normalización de sC5b-9 con un nivel de eculizumab en suero > 99 mg/ml depende de la elevación de sC5b-9 al inicio de la terapia: los Pacientes 1 y 2 con elevación de sC5b-9 por encima de 2 veces la normal (> 488ng/ml) tardaron 11 días en normalizar el sC5b-9, mientras que el paciente 3 con sC5b-9 <488 requirió 4 días.

La Figura 10 representa un esquema de optimización de dosis de eculizumab.

#### Descripción Detallada

A menos que se indique de otra forma, los términos deben entenderse de acuerdo con el uso convencional por los expertos en la técnica relevante.

Como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/una/uno", "y" y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otra forma. Así, por ejemplo, la referencia a "un método" incluye una pluralidad de tales métodos y la referencia a "una dosis" incluye la referencia a una o más dosis y equivalentes de estas conocidas por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

El término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular que se determina por un experto en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, por ejemplo, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "alrededor de" puede significar dentro de 1 o más de 1 de desviación estándar, de acuerdo con la práctica en la técnica. Alternativamente, "alrededor de" puede significar un intervalo de hasta 20%, o hasta 10%, o hasta 5%, o hasta 1% de un valor dado. Alternativamente, particularmente con respecto a los sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 5 veces, y más preferentemente dentro de 2 veces, de un valor. Cuando se describen valores particulares en la solicitud y en las reivindicaciones, a menos que se indique de otra forma, se debe suponer el término "alrededor de" dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular.

Como se usa en la presente, el término "tratar" significa la administración de una composición a un sujeto que tiene un trastorno como se describe en la presente, con el propósito de curar, aliviar, mitigar, remediar, prevenir o mejorar el trastorno, el síntoma del trastorno, el estado de enfermedad secundario al trastorno o la predisposición hacia el trastorno.

Como se usa en la presente, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" significa la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o método que es suficiente para mostrar un beneficio significativo para el paciente, por ejemplo, la curación de las afecciones crónicas o en un aumento en tasa de curación de tales condiciones, o en una reducción en las afecciones aberrantes. Esto incluye ambos tratamientos, terapéutico y profiláctico. En concordancia, los compuestos se pueden usar en etapas muy tempranas de una enfermedad, o antes del inicio temprano, o después de una progresión significativa. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado solo, el término se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que resultan en el efecto terapéutico, ya sea administrado en combinación, en serie o simultáneamente.

Los términos "individuo", "huésped", "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente para referirse a un animal que es objeto de tratamiento, observación y/o experimento. En general, tal individuo, huésped, sujeto o paciente es un ser humano, aunque otros mamíferos están dentro del alcance de la invención.

Otras características, objetos y ventajas de la presente invención serán evidentes en la descripción detallada que sigue. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada, aunque indica modalidades de la presente invención, se proporciona solo a modo de ilustración, no de limitación. Diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada.

Recientemente, el Solicitante documentó anomalías del sistema del complemento en niños con HSCT-TMA. El eculizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado contra el componente del complemento C5, que sirve para bloquear la vía terminal del complemento, se prescribe cada vez más en el tratamiento de enfermedades que presentan microangiopatía trombótica, pero se desconocía su eficacia y los requisitos de dosificación en pacientes con HSCT-TMA en el momento de la invención del Solicitante, ya que nunca antes se había usado en esta población de pacientes. El Solicitante fue el primero en describir la eficacia del eculizumab en niños con HSCT-TMA, y en informar la importancia del seguimiento a la farmacocinética y farmacodinámica para lograr un bloqueo efectivo del complemento, que se mide por la actividad del complemento hemolítico total (CH50).

El inhibidor del complemento eculizumab se prescribe cada vez más en el tratamiento de enfermedades que presentan microangiopatía trombótica, pero no se ha evaluado en la microangiopatía trombótica que se asocia al trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT-TMA). La eficacia del eculizumab y los requisitos de dosificación en niños con HSCT-TMA no se conocían antes de la invención del Solicitante.

Durante muchos años, la HSCT-TMA se ha considerado un trastorno o entidad separado y distinto que ocurre posterior al HSCT pero sin una enfermedad claramente definida que causa la patogénesis. La HSCT-TMA después del HSCT comparte algunas características clínicas y patológicas como la trombocitopenia, el aumento de la lactato deshidrogenasa (LDH), cambios microangiopáticos y daño renal con otras microangiopatías trombóticas que afectan a la población de trasplante de médula no ósea, tales como el síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) y el síndrome preeclampsia/HELLP. A pesar de las similitudes clínicas y patológicas para estas TMA, los factores desencadenantes y la patogénesis y la terapia dirigida pueden ser diferentes. Por ejemplo, la TTP es secundaria a una actividad gravemente reducida de la proteasa de escisión del factor von Willebrand (ADAMTS-13). El síndrome de preeclampsia/HELLP se presenta durante el embarazo y resulta en una lesión endotelial vascular debido a la activación del complemento y generalmente se resuelve después del parto. En el aHUS, que es una enfermedad muy rara, > 70 % de los pacientes tienen defectos genéticos del complemento que resultan en la activación de la vía alternativa del complemento y la lesión renal y se benefician del bloqueo terminal del complemento.

Antes de la invención del Solicitante, no había evidencia de una ruta de patogénesis específica para la HSCT-TMA después del HSCT. Sin pretender limitarse por la teoría, el Solicitante planteó la hipótesis que el sistema del complemento se activó después del HSCT y resultó en una lesión vascular multiorgánica. Debido al alto estado inflamatorio en pacientes con HSCT que reciben quimioterapia o que tienen la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) y/o infecciones, el Solicitante planteó la hipótesis que podría ocurrir la activación del complemento y servir como un posible objetivo diagnóstico y terapéutico. El Solicitante examinó los marcadores de la TTP en pacientes con HSCT-TMA para respaldar la observación previa de que HSCT-TMA no es simplemente una acumulación de la TTP después del HSCT. La actividad de la ADAMTS-13 en suero puede disminuir moderadamente en el contexto de la HSCT-TMA, especialmente en casos que presentan hemólisis grave aguda, sin embargo, no disminuye gravemente (<5-10% de actividad) como se observa en pacientes con TTP y claramente descarta el diagnóstico de la TTP.

La HSCT-TMA a menudo se presenta como un trastorno multivisceral alrededor de 30 días después del trasplante cuando los pacientes se injertan con células madre de donantes. La naturaleza multifactorial de la lesión endotelial que comienza el proceso de la HSCT-TMA después del HSCT la convierte en una enfermedad distinta. Muchos de estos factores, en particular la GVHD y las infecciones, pueden estimular múltiples vías del complemento y provocar lesiones endoteliales vasculares sistémicas. Los genotipos del receptor y del donante, o ambos, pueden desempeñar un papel importante en la susceptibilidad de los tejidos a desarrollar la HSCT-TMA. La desregulación inmune que ocurre en el período posterior al HSCT puede resultar en la formación de anticuerpos contra los factores del complemento.

#### Factores de riesgo para la HSCT-TMA

La HSCT-TMA es más común después del HSCT alogénico, pero también permanece como una complicación significativa del trasplante autólogo. Los factores de riesgo asociados en estudios retrospectivos con el desarrollo de la HSCT-TMA después del HSCT alogénico incluyen a los medicamentos usados en el curso del trasplante y las complicaciones infecciosas. Los agentes condicionantes que incluyen al busulfano, la fludarabina, el cisplatino y la radiación pueden aumentar el riesgo de la HSCT-TMA posterior. Otros medicamentos comúnmente informados que se asocian con la HSCT-TMA incluyen los inhibidores de la calcineurina tacrolimus y ciclosporina y los nuevos inhibidores del blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR). Las infecciones virales a menudo se consideran un "desencadenante" para la HSCT-TMA, ya que los pacientes que muestran signos de lesión de vasos pequeños también pueden tener infecciones concomitantes tales como CMV, adenovirus, parvovirus B19, HHV-6 y virus BK.

Sin pretender limitarse a la teoría, el Solicitante planteó la hipótesis que la desregulación del sistema del complemento se asocia con una lesión orgánica en pacientes con HSCT-TMA y que el bloqueo del complemento terminal activado (inicialmente probado con el único medicamento clínicamente disponible, eculizumab) puede ser una opción potencial de tratamiento potencial para la HSCT-TMA. Antes de la invención del Solicitante, no había evidencia en la literatura que el complemento estuviera involucrado en la patogénesis de la HSCT-TMA. El Solicitante planteó la hipótesis que el sistema de complemento clásico o alternativo puede involucrarse en la HSCT-TMA, lo que resulta en la activación del complemento terminal y la lesión del tejido, especialmente en los pacientes con mayor riesgo de peores resultados, y ese complemento puede activarse en pacientes con HSCT como resultado de una lesión directa del tejido por terapia

5 citotóxica, desregulación inmune o desencadenada por agentes infecciosos en pacientes con y sin predisposición genética. También, debido a la muy alta probabilidad de desregulación inmune después del HSCT y la interacción de los fenotipos/genotipos del donante y del huésped, existía la posibilidad de formación de anticuerpos anti-complemento como otra vía de lesión tisular mediada por el complemento en la HSCT-TMA. El Solicitante planteó la hipótesis que la terapia de modulación del complemento con el único bloqueador del complemento terminal clínicamente disponible ecilizumab puede servir como tratamiento dirigido para la HSCT-TMA (Figura 2). De la misma forma, el Solicitante teoriza que otros bloqueadores del complemento terminal pueden lograr este efecto de manera similar.

10 Con los desafíos en el uso de criterios de diagnóstico clínico disponibles en el momento de esta invención, el Solicitante investigó además la participación del complemento y el uso de marcadores del complemento para la estratificación del riesgo de la enfermedad para poder optimizar la terapia de bloqueo del complemento en la HSCT-TMA. (Figura 5). Finalmente, en ausencia de una medición de ecilizumab en suero fácilmente disponible, el Solicitante identificó un marcador sustituto que se correlacionaría con el nivel de ecilizumab en el suero del paciente y que proporcionaría un tiempo de respuesta mucho más rápido que los métodos disponibles que pueden usarse para el ajuste de la dosis del fármaco en tiempo real en la atención clínica.

#### Composiciones

20 Se describe un fármaco capaz de inhibir la vía del complemento para usar para el tratamiento de la microangiopatía trombótica que se asocia al trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) (HSCT-TMA) en un sujeto que se sometió a un HSCT.

25 En un cierto aspecto de la descripción, el fármaco puede comprender un fármaco o un anticuerpo capaz de inhibir la ruta del complemento. En un aspecto de la descripción, el anticuerpo puede comprender un anticuerpo monoclonal capaz de inhibir la ruta del complemento. En otros aspectos de la descripción, el fármaco puede comprender un anticuerpo monoclonal humanizado capaz de inhibir la ruta del complemento. En ciertos aspectos, el fármaco es el ecilizumab, disponible en Alexion Pharmaceuticals, y vendido bajo el nombre comercial Soliris.

30 En un aspecto, el uso del fármaco puede repetirse todos los días, o cada dos días, o cada tres días. El fármaco puede usarse en al menos una dosis, o al menos dos dosis, o al menos tres dosis, o al menos cuatro dosis, o en ciertos aspectos, más de cuatro dosis. En un aspecto, el uso puede realizarse hasta que se obtenga una respuesta hematológica o una respuesta completa a la enfermedad en el sujeto. En ciertos aspectos, el uso puede realizarse durante un período de aproximadamente cuatro a aproximadamente 15 semanas, o más. En ciertos aspectos, el fármaco se administra semanalmente. El fármaco puede administrarse mediante cualquier método como se conoce en la técnica, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular y/o oral.

#### Métodos

40 También se describe un método para el seguimiento de la eficacia de un tratamiento con un inhibidor del complemento contra la microangiopatía trombótica que se asocia al HSCT (HSCT-TMA) en un sujeto que se ha sometido a un HSCT, que puede comprender la etapa de medir la actividad total del complemento (CH50) en una muestra de suero del sujeto. Al sujeto se le puede administrar un inhibidor del complemento hasta que la medición de CH50 en el suero del sujeto sea de aproximadamente 0-3 unidades CAE de acuerdo con lo medido por el inmunoensayo enzimático, o hasta que la medición de CH50 en el sujeto sea menor de 15 unidades CH50 de acuerdo con lo medido por un método hemolítico.

45 El método puede comprender además la etapa de medir la actividad total del complemento (CH50) en un sujeto antes del tratamiento del sujeto con un inhibidor del complemento para obtener una medición inicial de CH50.

50 También se describe un método para tratar la microangiopatía trombótica que se asocia al HSCT (HSCT-TMA) en un sujeto que se ha sometido a un trasplante de médula ósea. El método puede comprender la etapa de administrar un fármaco o un anticuerpo capaz de inhibir el complemento terminal. El complemento terminal puede comprender un anticuerpo monoclonal capaz de inhibir el complemento terminal, o un anticuerpo monoclonal humanizado capaz de inhibir el complemento terminal, o el anticuerpo puede ser el ecilizumab.

55 La etapa de administración puede realizarse de manera suficiente para lograr un nivel terapéutico en el sujeto. En ciertos aspectos de la descripción, el nivel terapéutico puede comprender un nivel en suero sanguíneo mayor que o al menos aproximadamente 99 µg/ml, o al menos o mayor que aproximadamente 100 µg/ml, o al menos o mayor que aproximadamente 200 µg/ml, o al menos o mayor que aproximadamente 300 µg/ml.

60 La etapa de administración puede repetirse diariamente, o cada dos días, o cada tres días hasta que se alcance en el sujeto un nivel en suero mayor que o al menos de aproximadamente 99 µg/ml, o al menos o mayor que aproximadamente 100 µg/ml, o al menos o mayor que aproximadamente 200 µg/ml, o al menos o mayor que aproximadamente 300 µg/ml. La determinación de la dosificación en un paciente en base al peso del paciente se entenderá fácilmente por un experto en la técnica.

65

La etapa de administración puede realizarse de manera suficiente para lograr un nivel terapéutico de eculizumab en el sujeto. La etapa de administración puede comprender al menos una dosis, o al menos dos dosis, o al menos tres dosis, o al menos cuatro dosis, o, en algunos aspectos, más de cuatro dosis. El método, puede comprender además la etapa de medir la actividad del complemento total (CH50) para obtener una medición de CH50, en donde al sujeto se le administra el inhibidor del complemento hasta que la medición de CH50 obtenida del paciente sea de aproximadamente 0-3 unidades CAE de acuerdo con lo medido por el inmunoensayo enzimático, o en donde la medición de CH50 es de 0-15 unidades de CH50 de acuerdo con la medición mediante el uso de un método hemolítico mediante el uso de eritrocitos de oveja estandarizados. El método puede comprender además las etapas de a) medir la actividad total del complemento (CH50) antes del tratamiento con un inhibidor del complemento para obtener una medición inicial de CH50; b) administrar un inhibidor del complemento; y c) medir la actividad total de CH50 después de la administración del inhibidor del complemento para obtener una medición de CH50 posterior al tratamiento, en donde dicho inhibidor del complemento se administra hasta que dicha medición de CH50 posterior al tratamiento sea de aproximadamente 0-3 unidades CAE de acuerdo con lo medido por el inmunoensayo enzimático, o en donde la medición de CH50 es de 0-15 unidades de CH50 de acuerdo con la medición mediante el uso de un método hemolítico mediante el uso de eritrocitos de oveja estandarizados.

La etapa de administración puede comprender administrar el eculizumab, y la etapa de administración puede realizarse durante un período de tiempo suficiente para resolver la HSCT-TMA. En algunos aspectos, la etapa de administración se realiza durante un período de aproximadamente cuatro a aproximadamente 15 semanas, o hasta 20 semanas, o hasta 25 semanas, o hasta que el eculizumab esté en una dosis suficiente para reducir los niveles de CH50 a 0-3 unidades CAE de acuerdo con la medición por el inmunoensayo enzimático, o en donde la medición de CH50 es de 0-15 unidades de CH50 de acuerdo con la medición mediante el uso de un método hemolítico mediante el uso de eritrocitos de oveja estandarizados.

La etapa de administración puede comprender administrar el eculizumab, y la etapa de administración puede realizarse durante un período de tiempo suficiente para lograr una respuesta hematológica favorable, en donde una respuesta hematológica favorable comprende la resolución de marcadores hematológicos de la HSCT-TMA. Los marcadores pueden incluir, pero no se limitan a, la normalización de la LDH, la resolución de la necesidad de transfusiones de glóbulos rojos y plaquetas, y la desaparición de esquistocitos, o cualquier otro criterio que pueda entender fácilmente un experto en la materia.

La etapa de administración puede realizarse durante un período de tiempo suficiente para lograr una respuesta completa, en donde la respuesta completa comprende la normalización de los parámetros hematológicos y la respuesta renal de dicho sujeto, que incluye, pero no se limita a, duplicar la tasa de filtración glomerular estimada por la cistatina C (eGFR) y la mejora de la proteinuria a valores por debajo del intervalo nefrótico según lo definido por la relación aleatoria de proteína en orina a creatinina por debajo de 2 mg/mg, u otros criterios como entenderá fácilmente un experto en la técnica.

En ciertos aspectos, el sujeto puede recibir el eculizumab varias veces al día, diariamente, semanalmente o mensualmente. Si la dosis inicial o posterior no es terapéutica, se puede administrar una dosis adicional en forma diaria, semanal o mensual. En tales casos, la dosis adicional puede ser una dosis mayor que la dosis inicial o más reciente administrada. En ciertos aspectos, la dosis puede aumentarse en aproximadamente 100 mg, o aproximadamente 200 mg, o aproximadamente 300 mg, o aproximadamente 400 mg, o aproximadamente 500 mg.

Se describe un método para determinar los niveles relativos de un inhibidor del complemento en un sujeto al que se le administró un inhibidor del complemento. El método puede comprender la etapa de medir la actividad total del complemento (CH50) en una muestra obtenida del sujeto. El inhibidor total del complemento puede comprender, por ejemplo, el eculizumab.

Se describe un método para optimizar un esquema de dosificación del eculizumab en un sujeto que tiene algún síndrome de TMA, posterior o no al HSCT. El método puede comprender la etapa de determinar la actividad del complemento total (CH50) en dicho sujeto que es tratado con una dosis de inducción de eculizumab; en donde si los niveles de CH50 no se suprimen adecuadamente (como se usa en la presente, "adecuadamente suprimido" significa 0-3 unidades CAE de acuerdo con la medición por inmunoensayo enzimático, o 0-15 unidades CH50 de acuerdo con la medición mediante el uso de un método hemolítico mediante el uso de eritrocitos de oveja estandarizados, como se describe en la presente), se administra una segunda dosis de inducción; en donde si los niveles de CH50 se suprimen adecuadamente, a dicho paciente se le administra una dosis de inducción semanal; en donde si los niveles de CH50 se suprimen inadecuadamente después de dicha segunda dosis de inducción, dicha dosis de inducción se incrementa en aproximadamente 100 mg a aproximadamente 400 mg, preferentemente aproximadamente 300 mg; en donde a dicho sujeto se le administra el eculizumab hasta que se resuelven los signos hematológicos de la TMA. El método puede comprender además la etapa de proporcionar una dosis de mantenimiento para mantener la supresión de CH50. La dosis de inducción puede seleccionarse entre aproximadamente 900 mg de eculizumab para sujetos que pesen 40 kg o más, aproximadamente 600 mg de eculizumab para sujetos que pesen aproximadamente 30 kg a aproximadamente 40 kg, aproximadamente 600 mg de eculizumab para sujetos que pesen aproximadamente 20 kg a aproximadamente 30 kg, aproximadamente 600 mg de eculizumab para sujetos que pesen aproximadamente 10 kg a aproximadamente 20 kg, aproximadamente 300 mg de eculizumab para sujetos que pesen aproximadamente 5 kg a aproximadamente 10 kg.

## Ejemplos

### Vía clásica del complemento

5 Se encuentran depósitos de complemento en las arteriolas renales en pacientes con la TMA asociada al HSCT

Para abordar nuestro concepto de lesión vascular mediada por el complemento después de un HSCT, el Solicitante examinó muestras de tejido renal de pacientes después de un HSCT que desarrollaron HSCT-TMA y aquellos que no lo hicieron. El Solicitante determinó que los pacientes con evidencia histológica de HSCT-TMA tienen depósitos importantes de C4d en arteriolas renales que representan la lesión vascular mediada por el complemento clásico.

En resumen, se examinaron muestras de tejido renal de 20 pacientes con HSCT para detectar depósitos del complemento mediante tinción de C4d (Figura 3). Las muestras se dividieron en un grupo de TMA (n = 8) si tenían evidencia histológica de TMA y un grupo de control de HSCT (n = 12) sin evidencia histológica de TMA. La tinción de C4d se realizó en el laboratorio de patología clínica en CCHMC y se calificó por dos patólogos clínicos, cegados al diagnóstico patológico original de cada sujeto. La tinción de C4d se evaluó en todos los compartimentos histológicos del riñón y se calificó como difusa (> 50 %), focal (10-50 %) y rara (1-10 %) o negativa (0 %). La tinción arteriolar difusa de C4d fue predominante en pacientes con TMA en comparación con los controles (p = 0,004). La tinción de C4d de capilares peritubulares raros (PTC) estuvo presente en la mitad de los sujetos con TMA y estuvo ausente en los controles. La tinción glomerular de C4d fue común e inespecífica en ambos grupos (p = 0,35). Se encontró una rara tinción focal de la membrana basal tubular en un tercio de los sujetos con TMA y estuvo ausente en los controles.

Tabla 1: tinción de C4d en diferentes compartimentos renales en pacientes con TMA asociada al HSCT

Grupo	Arteriolas*	PTC	Glomérulo	Membrana basal
TMA	6/8 (75 %)	4/8 (50 %)	5/8 (63 %)	3/8 (38 %)
Control de HSCT	1/12 (8 %)	0/12 (0 %)	10/12 (83 %)	0/12 (0 %)

\*p = 0,004

Las únicas observaciones previas que examinaron los depósitos de C4d en el riñón después del HSCT se informaron por Mii y otros que concluyeron que la tinción positiva de Cd4 en los glomérulos renales después del HSCT es probable que represente la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), pero este estudio no tuvo ningún grupo de control.

La tinción arterial de C4d no se informa en otros trastornos fuera de la observación del Solicitante en la HSCT-TMA. Por otro lado, la tinción capilar peritubular (PTC) para el C4d se correlaciona fuertemente con una peor supervivencia del aloinjerto renal y probablemente refleja la presencia de anticuerpos anti-HLA específicos de donantes que fijan el complemento. El C4d también se ha correlacionado con lesiones tisulares y peores resultados clínicos en receptores de otros trasplantes de órganos sólidos, incluidos aloinjertos de corazón, páncreas e hígado, mientras que la tinción glomerular se informa comúnmente en enfermedades mediadas por el complemento conocidas y otras afecciones con depósito de inmunocomplejos, como nefritis lúpica.

### Vía del complemento terminal

Para abordar la posible participación del complemento terminal en la patogénesis de la HSCT-TMA que respaldaría el concepto de uso del bloqueador de complemento terminal eculizumab en la HSCT-TMA, el Solicitante examinó la activación del complemento terminal mediante la medición del sC5b-9 en el suero de pacientes con HSCT con y sin HSCT-TMA. La prueba de sC5b-9 se realizó en el laboratorio de hematología CCHMC mediante el uso de una metodología aprobada para pruebas clínicas de pacientes (laboratorio certificado CLIA).

Para medir la activación del complemento terminal en pacientes con HSCT con TMA y pacientes con HSCT sin TMA se usó el inmunoensayo enzimático (EIA) para el complejo de complemento terminal soluble SC5b-9 en plasma (normal <244 ng/ml). El sC5b-9 se genera mediante el ensamblaje de C5 a C9 como consecuencia de la activación del sistema del complemento por la vía clásica, lectina o alternativa. El complejo de ataque de membrana (MAC), una forma de sC5b-9, es un complejo estable que media el daño irreversible de la membrana de la célula objetivo asociado con la activación del complemento. Los complejos que se forman en ausencia de una membrana objetivo se unen a las proteínas del suero reguladoras que se producen naturalmente, por ejemplo, la proteína S formadora de complejos no citotóxicos en plasma. El sC5b-9 se midió en 37 pacientes con HSCT-TMA en el diagnóstico de HSCT-TMA y 20 HSCT sin TMA en el día 30 (+/- 3 días) después del HSCT (tiempo de riesgo para desarrollar la HSCT-TMA) y mostró significativamente más pacientes con HSCT -TMA que tienen el sC5b-9 elevado (67 % frente a 20 %, p = 0,008) (Figura 4, A). También se comparó el sC5b-9 en pacientes con TMA que murieron un año después del trasplante con la HSCT-TMA activa frente a aquellos pacientes con HSCT-TMA que sobrevivieron y mostraron que significativamente más pacientes que murieron con la HSCT-TMA activa tenían sC5b-9 elevado (94 % frente a 47 %, p=0,003) (Figura 4, B) y los niveles fueron más altos en aquellos que murieron de HSCT-TMA (289 ng/ml (intervalo 100-415) frente a 445 ng/ml (intervalo 174-971)). Estos datos demuestran que la activación del complemento terminal contribuye al desarrollo de la HSCT-TMA y se asocia con un mal resultado general después del HSCT.

La activación del complemento es una característica de alto riesgo en la HSCT-TMA

Realizamos un estudio prospectivo en 100 pacientes pediátricos y adultos jóvenes para examinar las características de riesgo de la HSCT-TMA con respecto a la activación del sistema del complemento. Treinta y nueve sujetos (39 %) cumplieron los criterios publicados para la HSCT-TMA. Los sujetos con HSCT-TMA tuvieron una mortalidad sin recaída significativamente mayor (43,6 % versus 7,8 %,  $p < 0,0001$ ) a 1 año después del HSCT en comparación con aquellos sin HSCT-TMA (Figura 1). Los niveles elevados de lactato deshidrogenasa (LDH), proteinuria en el análisis de orina de rutina e hipertensión fueron los primeros marcadores de la HSCT-TMA (Figura 5).

La proteinuria ( $> 30$  mg/dL) y la evidencia de activación terminal del complemento (sC5b-9 elevado) en la sangre en el momento del diagnóstico de la HSCT-TMA se asociaron con una supervivencia muy pobre (16 % al año), mientras que todos los sujetos con HSCT-TMA sin proteinuria y una concentración normal de sC5b-9 en suero sobrevivieron ( $p < 0,01$ ). En base a estas observaciones prospectivas, el Solicitante concluyó que el 18 % de todos los pacientes trasplantados presentaron la HSCT-TMA grave y la activación del sistema del complemento que afectó su resultado.

Respuesta de la HSCT-TMA al eculizumab

En base a nuestro concepto que la activación del complemento es responsable de la lesión vascular sistémica en pacientes con HSCT-TMA, el Solicitante trató un grupo piloto de pacientes con el eculizumab.

Todos los pacientes tratados tuvieron características de la HSCT-TMA de alto riesgo, que incluye los niveles elevados de sC5b-9 en suero en el diagnóstico de la HSCT-TMA y la afectación multiorgánica. Dado que no había datos disponibles sobre el uso del eculizumab en la población de HSCT, el Solicitante planteó la hipótesis que el paciente con HSCT probablemente requerirá una dosis de medicamento diferente a la que se usa actualmente para las únicas indicaciones aprobadas actualmente de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) o aHUS. Se descartó un diagnóstico de la TTP antes de comenzar la terapia.

El Solicitante definió una respuesta al eculizumab mediante el uso de estos criterios: una respuesta hematológica al eculizumab se definió como la normalización de la lactato deshidrogenasa (LDH), la resolución de la necesidad de transfusiones de glóbulos rojos y plaquetas, y la desaparición de los esquistocitos. Una respuesta completa se definió como la normalización de los parámetros hematológicos mencionados anteriormente combinada con una duplicación de la cistatina C-eGFR y la mejora de la proteinuria a valores por debajo del intervalo nefrótico, según lo definido por una relación aleatoria de proteína en orina a creatinina  $< 2$  mg/mg.

La plasmaféresis terapéutica se detuvo en todos los pacientes que recibieron antes de comenzar el eculizumab, para no eliminar el medicamento. El Solicitante teorizó que los marcadores alternativos pueden ser indicativos de los niveles sanguíneos de eculizumab. La evaluación diagnóstica funcional del sistema de complemento incluyó, pero no se limitó a, mediciones de sC5b-9, CH50 y de autoanticuerpo factor H del complemento. Si bien las pruebas de nivel de eculizumab en suero estaban disponibles clínicamente en el laboratorio Cambridge Biomedical, los resultados solo estaban disponibles en el registro médico en 4-10 días y no podían utilizarse para la evaluación oportuna del nivel de fármacos para una atención clínica inmediata. Sin embargo, dicha prueba se usó para una correlación posterior con otros marcadores.

En ausencia de datos en la población de HSCT, propusimos alcanzar el nivel de eculizumab de al menos  $99 \mu\text{g/ml}$  (en base a la dosificación en aHUS) o por encima para pacientes con HSCT tratados por la HSCT-TMA. Se disponía de datos que un nivel más alto de eculizumab en suero no presenta efectos secundarios adicionales. También, en ausencia de mediciones de eculizumab en suero fácilmente disponibles, optamos por identificar un marcador sustituto que se correlacionara con un nivel de eculizumab  $> 99 \mu\text{g/ml}$  en el suero del paciente y tuviera un tiempo de respuesta mucho más rápido, útil para el ajuste de la dosis del fármaco en tiempo real en la atención clínica. La primera dosis de eculizumab se administró en función del peso del paciente mediante el uso de la información del fármaco eculizumab.

Para examinar nuestro concepto de diferentes requisitos de dosificación en la HSCT-TMA después del HSCT, seleccionamos el seguimiento de la actividad hemolítica del complemento total (CH50) y correlacionarlo con los niveles de eculizumab en suero y la respuesta clínica. Para los primeros 6 pacientes tratados inicialmente, el Solicitante midió el CH50 antes de comenzar el eculizumab y diariamente a continuación durante la terapia de inducción clínicamente disponible mediante el uso del inmunoensayo enzimático.

La actividad total del complemento hemolítico (CH50) se midió en suero durante la terapia con eculizumab como un marcador farmacodinámico del bloqueo del complemento inducido por el eculizumab, en los mismos puntos de tiempo que los niveles del fármaco eculizumab. Existen dos métodos principales para medir el CH50: un método de inmunoensayo enzimático y un método hemolítico mediante el uso de eritrocitos de oveja estandarizados, para medir el CH50 y el Solicitante los examinó a ambos en los pacientes tratados con eculizumab.

El perfil farmacocinético del eculizumab se realizó en la División de Farmacología Clínica, del Centro Médico del Hospital de Niños de Cincinnati (CCHMC), y se describió mediante un modelo de un compartimento ya que las concentraciones

de ecilizumab mostraron una disminución exponencial con el tiempo. La constante de tasa de eliminación ( $k_{el}$ ) y la concentración a 0 ( $C_0$ ) se estimaron mediante regresión lineal de mínimos cuadrados de las concentraciones transformadas logarítmicamente frente al tiempo en la fase logarítmica lineal del perfil de disposición. El volumen aparente de distribución ( $V_d$ ) se estimó en base a la Dosis/ $C_0$  en el primer tratamiento. El aclaramiento sistémico aparente (CL) se calculó mediante la fórmula;  $CL(L/h) = k_{el} \cdot V_d$ . Las concentraciones máximas de ecilizumab en la  $n^{ma}$  dosis ( $C_{máx, n}$ ) se determinaron mediante la siguiente ecuación:  $C_{máx, n} = C_{mín, n-1} + Dosis/V_d$ . El análisis de la curva de las características operativas del receptor (ROC) y el índice de Youden se usaron para encontrar el mejor valor de corte de CH50 que predijo un nivel mínimo terapéutico de ecilizumab  $> 99 \mu\text{g/ml}$ .

Los niveles de ecilizumab y del CH50 que se midieron en los mismos puntos de tiempo se correlacionaron fuertemente entre sí, ya que el nivel de ecilizumab en suero disminuyó, el CH50 aumentó (Figura 6). Nuestra siguiente etapa en la evaluación farmacodinámica fue examinar el rendimiento diagnóstico del nivel de CH50 para predecir una concentración de ecilizumab  $> 99 \mu\text{g/ml}$  mediante el uso de 2 métodos estándar: método de inmunoensayo enzimático y mediante el uso de un método hemolítico mediante el uso de eritrocito de oveja estandarizado.

Método de inmunoensayo enzimático (Figura 7):

Un nivel de CH50 medido por el método de inmunoensayo enzimático de 0-3 unidades CAE correspondió con una concentración de ecilizumab  $> 99 \mu\text{g/ml}$  (Figura 7). Por el contrario, en todos los puntos de tiempo de muestreo con un recuento de CH50 de  $\geq 4$  unidades CAE, las concentraciones de ecilizumab de los pacientes estuvieron por debajo de  $99 \mu\text{g/ml}$  ( $p = 0,0001$ ). El CH50  $< 3$  unidades CAE correlacionadas con el ecilizumab en suero de al menos  $99 \mu\text{g/ml}$  o más (el nivel normal de CH50 por este método es de 60-144 CAE).

El inmunoensayo CH50 que se usó es el disponible en el Binding Site, [www.thebindingsite.com](http://www.thebindingsite.com), Ensayo CH50 (Método EIA), Número de producto MK095. El kit de prueba Complement Activation EIA (CAE) es un método novedoso para medir la actividad del complemento clásico total. Este método usa un anticuerpo monoclonal conjugado con enzimas específico para el neoantígeno de las proteínas del complemento terminal. Los pocillos de microtitulación están recubiertos con un activador del complemento en donde se agrega una dilución única del suero del paciente o suero de control. La vía clásica del complemento completo se activa y la cascada de C1q a C9 se forma dentro del pozo de la placa de microtitulación. El anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa de rábano picante se deja reaccionar con el neoantígeno resultante unido a los pocillos de la placa. Después de la adición de cromógeno, la cuantificación se logra mediante la comparación de las absorbancias resultantes, medidas a 450 nm, con una referencia, y verificadas por dos controles.

Método Hemolítico

Después, el Solicitante trató a otros doce pacientes con la HSCT-TMA de alto riesgo; los niveles de CH50 en estos pacientes se determinaron mediante el uso del método hemolítico mediante el uso de eritrocitos de oveja estandarizados (Figura 8). La Figura 8 muestra la correlación del CH50 con la concentración de ecilizumab  $> 99 \mu\text{g/ml}$  mediante el uso de un método hemolítico mediante el uso de eritrocitos de oveja estandarizados ( $n = 12$ ). El nivel de CH50 de 0-15 unidades de CH50 correspondió con una concentración de ecilizumab  $> 99 \mu\text{g/ml}$  (Figura 8) durante toda la terapia (A) y durante la primera y segunda dosis analizadas por separado (B). (El nivel normal de CH50 por este método es de 101-300 unidades CH50).

El método hemolítico de CH50 es el siguiente:

Principio

El método tradicional para la determinación de la actividad del complemento funcional es el ensayo hemolítico total (CH50). Este ensayo mide la capacidad de la muestra de prueba para lisar el 50 % de una suspensión estandarizada de eritrocitos de oveja recubiertos con anticuerpos anti-eritrocitos. Tanto la activación clásica como los componentes del complemento terminal se miden en esta reacción.

Método

La prueba del complemento CH50 es un ensayo hemolítico mediante el uso de eritrocitos de oveja sensibilizados, disponible de Diamedix Corporation. Las células son sensibilizadas por anticuerpos contra los eritrocitos de oveja, y se forma un complejo antígeno-anticuerpo. Cuando se expone al complemento en suero humano, se producirá la lisis de los eritrocitos y se libera hemoglobina libre. El grado de lisis es proporcional a la concentración de complemento total en el suero humano. La hemólisis resultante se lee a 415 nm y se compara con un suero de referencia de concentración conocida.

Requisitos de la muestra

El suero humano se almacena congelado a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  para muestrear dentro de las 24 horas. No se utilizan muestras hemolizadas. Durante la prueba, la muestra se descongela y se mezcla, luego se mantiene fría a  $2-8 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso.

# ES 2 796 078 T3

## Reactivos

Células Complementarias EZ (Diamedix Corporation, número de catálogo 789-001)

5 Suero de referencia de complemento EZ (EZ Complement Standard, Diamedix Corporation, número de catálogo 789-006)

EZ Complement Low Control y EZ Complement High Control (Diamedix Corporation, números de catálogo 789-008 y 789-009)

10

## Requisitos de almacenamiento

Las Células del Complemento EZ deben almacenarse a una temperatura de 2 a 8 °C. Los controles y el suero de referencia se almacenan a 0 °C a -20 °C. Los reactivos son estables hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

15

## Materiales y equipamiento

Pipetas

20

Soporte de tubos

Agitador vórtice

Temporizador

25

Centrifuga

Lector de microplacas (415 nm)

30

## Preparación de la referencia y control de calidad

El suero de referencia y los materiales de control de calidad son suero humano liofilizado. Se reconstituyen antes de su uso con 300 µl de agua destilada fría y se mezclan suavemente y se dejan permanecer a temperatura ambiente durante cinco minutos. Los viales permanecen en hielo durante 10 minutos adicionales antes de usar. Una vez reconstituidos, se prueban en 8 horas.

35

## Procedimiento

40 1. Se preparan tantos tubos como pacientes haya, así como uno para QC bajo y alto, Blanco (lisis espontánea) y referencia (estándar).

2. Se permite que los tubos permanezcan a temperatura ambiente durante al menos 1 hora antes de comenzar la prueba.

45

3. Prepare el QC y el suero de referencia como se indicó anteriormente.

4. Agite con vórtice los tubos durante 10 segundos para resuspender las células.

5. Retire las tapas de todos los tubos.

50

6. Agregue 5 µl de muestra de paciente, los controles y el suero de referencia al tubo debidamente etiquetado, vuelva a colocar la tapa y agite vigorosamente para mezclar.

7. El tubo Blanco también debe mezclarse.

55

8. Permita que los tubos reposen a temperatura ambiente (18-30 °C) durante 1 hora.

9. Mezcle los tubos invirtiéndolos 3-4 veces.

60

10. Centrifugue los tubos durante 10 minutos a 1800 rpm.

11. Pipetee 200 µl de cada muestra por duplicado en una placa de 96 pocillos.

65

12. Leer a 415 nm.

Validación

La absorbancia del Blanco (lisis espontánea) debe ser menor que 0,150. Los valores de control de calidad deben estar dentro del intervalo esperado.

5

Análisis

La absorbancia del tubo Blanco se restará de las absorbancias de las muestras de prueba para corregir el grado de lisis espontánea que puede ocurrir en las muestras de prueba.

10

Los resultados se calculan mediante el uso de la siguiente fórmula para obtener unidades CH50:

$$\text{Absorbancia de la muestra} \times \text{Valor CH50} = \text{Valor CH50 de la muestra}$$

15

Absorbancia de referencia

Control de calidad

Hay dos niveles de control de calidad que se proveen con el kit.

20

Documentación de los datos de control de calidad:

Se usa una hoja de trabajo para cada ejecución para documentar el control de calidad, el número de lote del kit y la fecha de vencimiento. Los intervalos de cada control están disponibles para su revisión en la hoja de trabajo. El sistema de informes de laboratorio de Cerner se usa para informar el control de calidad y los resultados de los pacientes para cada ensayo realizado.

25

Intervalo de referencia

Ausente o bajo 0 - 100

Normal 101 - 300

Alto >301

30

35

Formato de informe Los resultados se informan en unidades CH50. La prueba es lineal de cero a 400 unidades CH50.

Intervalo de medición

40

Los estudios de linealidad mostraron que el ensayo es lineal a 400 unidades CH50 en comparación con el material "estándar de oro".

45

En sumario, el nivel de CH50 adecuadamente suprimido para uso clínico estará por debajo de 4 CAE si se mide por el método de inmunoensayo enzimático y por debajo de 15 unidades de CH50 si se mide por el método hemolítico mediante el uso de eritrocitos de oveja estandarizados. Estos niveles se denominarán "CH50 adecuadamente suprimido en el esquema de optimización de dosificación de eculizumab".

50

El Solicitante publicó inicialmente hallazgos en seis niños que se trataron por la HSCT-TMA con eculizumab mediante el uso de modificaciones de dosis en base a la farmacocinética del fármaco. La actividad del complemento hemolítico total (CH50) se midió como un punto final farmacodinámico al mismo tiempo que los niveles de eculizumab. Cuatro de seis niños tuvieron resolución de la HSCT-TMA una vez que se lograron los niveles terapéuticos de eculizumab y se logró el bloqueo completo del complemento. Dos pacientes no lograron alcanzar los niveles terapéuticos de eculizumab, incluso después del aumento de la dosis, y posteriormente murieron. El bloqueo del complemento, medido por el CH50, se correlacionó con los niveles terapéuticos del eculizumab y la respuesta clínica.

55

Los seis pacientes consecutivos con la HSCT-TMA grave que se trataron con el eculizumab (Alexion, CT, EE. UU.) en el Centro Médico del Hospital Infantil de Cincinnati (CCHMC) entre enero de 2012 y mayo de 2013 se incluyeron inicialmente en el análisis. La Junta de Revisión Institucional aprobó la revisión de la tabla retrospectiva. La demografía del paciente, las características de la terapia y las complicaciones del HSCT se extrajeron del registro médico. La HSCT-TMA se diagnosticó mediante el uso de los criterios diagnósticos actuales e incluyó una elevación de la lactato deshidrogenasa (LDH) por encima de lo normal para la edad, la haptoglobina por debajo del límite inferior de lo normal, los esquistocitos en frotis de sangre periférica, anemia, trombocitopenia, una prueba de Coombs negativa y lesión renal aguda que se define como una duplicación de la creatinina en suero o una disminución del 50 % en la tasa de filtración glomerular de creatinina C estimada (eGFR, normal 80-120 ml/min) de la referencia de pre-HSCT de cada sujeto. La proteinuria se identificó mediante el uso de una relación aleatoria de proteína en orina a creatinina (normal <0,2 mg/mg, intervalo

60

65

nefrótico > 2 mg/mg). Los resultados de la biopsia renal, si están disponibles, se revisaron para determinar la histología de la TMA. El tutor legal de cada sujeto firmó el consentimiento informado para el tratamiento con eculizumab.

Tratamiento y seguimiento del eculizumab

El intercambio de plasma terapéutico (TPE) se detuvo en pacientes que lo recibieron antes de comenzar a usar el eculizumab para no eliminar el fármaco, ya que el TPE elimina el medicamento. La primera dosis de eculizumab se administró de acuerdo con las recomendaciones para niños con síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS) (Tabla 2). El eculizumab se infundió a través del acceso venoso central durante 30-60 minutos. Debido a que los receptores de los HSCT inmunocomprometidos no responden a la vacunación meningocócica, todos los pacientes se mantuvieron con profilaxis con ciprofloxacina o penicilina VK hasta que se eliminó el eculizumab y se normalizaron los niveles de CH50. Los niveles de eculizumab en suero se analizaron al menos dos veces por semana después de cada dosis, que incluye un nivel mínimo antes de cada dosis. Los niveles del fármaco de eculizumab se realizaron en Cambridge Biomedical, Inc. (Boston, MA) como prueba clínica y una concentración mínima > 99 ug/mL se consideró terapéutica. Los niveles se informaron con un tiempo de respuesta de 4 a 10 días y, a menudo, no estaban disponibles de inmediato, por lo que el ajuste de la dosis varió de la siguiente manera: si se informó un nivel mínimo antes de la siguiente dosis semanal y fue terapéutico, la dosis se administró de acuerdo con el esquema de la Figura 10. Si el paciente debía recibir la siguiente dosis semanal y se informaba la concentración mínima de eculizumab y se encontraba por debajo del nivel terapéutico, la dosis posterior se aumentará en 300 mg/dosis. Si se informó un resultado por debajo del nivel terapéutico 4-5 días después de la dosis anterior, se administrará una dosis adicional entre semana. Si los resultados no estaban disponibles para el ajuste de la dosis, la misma dosis de inducción de eculizumab se continuó semanalmente hasta que se documentara que la concentración mínima de eculizumab estaba por encima del nivel terapéutico.

La terapia de inducción continuó hasta que los pacientes lograron una respuesta hematológica y documentaron niveles terapéuticos de eculizumab, en cuyo punto se inició un programa de mantenimiento (Figura 10). Los pacientes tuvieron que demostrar una normalización de los parámetros hematológicos y una mejora en los parámetros renales para considerar suspender el eculizumab.

Resultados

Los seis pacientes informaron inicialmente complicaciones significativas relacionadas con la HSCT-TMA. Los pacientes cinco y seis estaban gravemente enfermos con insuficiencia orgánica multisistémica antes del inicio del eculizumab.

La mediana de la edad del paciente fue de 5 años (intervalo 2,4-10,9 años). La HSCT-TMA se diagnosticó dentro de los 100 días (intervalo 6-69 días) del trasplante en cinco pacientes. Un paciente se diagnosticó un año después del trasplante después de presentar la HSCT-TMA aguda e insuficiencia renal que requirió hemodiálisis. En el momento del diagnóstico de la HSCT-TMA, todos los pacientes tenían insuficiencia renal con una mediana de cistatina C-eGFR en suero de 18,5 ml/min (intervalo 15-48 ml/min) y proteinuria de intervalo nefrótico con una mediana de proporción de proteína en orina al azar/creatinina de 11 mg/mg (intervalo 4,5-81,6 mg/mg). Dos pacientes requirieron terapia de reemplazo renal. Todos los pacientes tenían hipertensión grave que requería de seis a nueve medicamentos antihipertensivos al inicio de la terapia con eculizumab. El nivel de actividad de la ADAMTS13 fue normal (> 67 %) en todos los pacientes, lo que descartó la TTP.

La actividad del complejo del complemento terminal (sC5b-9) se elevó en cuatro de los cinco pacientes evaluados. El paciente con un nivel normal de sC5b-9 estaba recibiendo intercambio plasmático terapéutico (TPE) cuando se obtuvo la muestra de sangre y se demostró que tenía el sC5b-9 elevado en la muestra que estaba en el depósito mientras no estaba en TPE. El autoanticuerpo CFH no se detectó en ninguno de los pacientes. Dos pacientes disminuyeron los niveles de C4, y uno disminuyó los niveles de CFH. Todos los pacientes tuvieron la proteína CFHR1 detectable, lo que descarta una eliminación homocigótica del CFHR3-CFHR1. Uno de los tres pacientes evaluados tuvo una eliminación heterocigótica del CFHR3-CFHR1. La biopsia renal que se realizó en el paciente dos mostró la TMA grave con tinción difusa de C4d en las arteriolas afectadas. El paciente seis tenía la TMA renal confirmada en la autopsia.

Respuesta clínica al eculizumab

Los pacientes 1-4 tuvieron respuestas clínicas completas al eculizumab después de alcanzar los niveles terapéuticos de eculizumab. Se requirió una mediana de 7 dosis (intervalo 4-13 dosis) de eculizumab para resolver la HSCT-TMA. Se observó una respuesta hematológica a una mediana de 28,5 días (intervalo 15-45 días) después del inicio del eculizumab. Todos los que respondieron tuvieron una mejora dramática en la hipertensión con una reducción en el número de medicamentos antihipertensivos de 6-9 al comienzo de la terapia con eculizumab a 0-2 medicamentos al finalizar la terapia con eculizumab. La mediana del tiempo para la respuesta completa de todos los parámetros de la HSCT-TMA, que incluye la duplicación de la cistatina C-eGFR y la mejora de la proteinuria por debajo de 2 mg/mg fue de 69,5 días (intervalo 29-141 días) después del inicio de eculizumab. Todos los respondedores están actualmente bien en una mediana de 38,5 semanas (intervalo 29-63 semanas) posterior a la HSCT-TMA. Los pacientes uno y cuatro recuperaron completamente la función renal como lo demuestra la cistatina C-eGFR normal > 100 ml/min y la ausencia de proteinuria e hipertensión. Los pacientes dos y tres, que tuvieron una lesión renal grave prolongada debido a la HSCT-TMA al comienzo de la terapia

con eculizumab, permanecen con la enfermedad renal crónica y una creatinina C-eGFR <50 ml/min, pero están fuera de la hemodiálisis y normotensos con la terapia con losartán.

5 Los pacientes cinco y seis murieron con insuficiencia orgánica multisistémica y HSCT-TMA activa a pesar de la terapia con eculizumab. Ambos pacientes estaban gravemente enfermos con daño renal grave al momento de comenzar la terapia con eculizumab y ninguno logró niveles mínimos terapéuticos sostenidos de eculizumab ni bloqueo del complemento, que se midió por CH50 (ver más abajo). Los seis pacientes toleraron la terapia con eculizumab sin efectos secundarios o reacciones atribuibles, y no hubo infecciones meningocócicas u otras infecciones bacterianas.

#### 10 Farmacocinética del eculizumab

En la Figura 9 se muestran muestras representativas de la dosis y los niveles de eculizumab durante las primeras tres semanas de tratamiento. En general, cuatro de seis pacientes tuvieron niveles de eculizumab por debajo del nivel terapéutico después de la primera dosis. Notablemente, la primera dosis de eculizumab para el paciente tres fue mayor (600 mg) que la recomendada (300 mg) para su peso de 9 kg, lo que produjo un nivel terapéutico después de la primera dosis. Los niveles mínimos terapéuticos de eculizumab > 99 µg/ml finalmente se lograron en los cuatro respondedores (pacientes uno a cuatro) mediante el uso de dosis adicionales o dosis que fueron más altas que las recomendadas actualmente. Los niveles mínimos de eculizumab permanecieron por debajo del nivel terapéutico en los dos casos que no respondieron (pacientes cinco y seis). El paciente cinco no alcanzó un nivel mínimo terapéutico durante las cinco semanas de tratamiento, a pesar del aumento significativo de la dosis a 900 mg dos veces por semana, comenzando el día 24 del tratamiento. El paciente seis recibió dos dosis de inducción semanales de 900 mg, de acuerdo con lo recomendado para su peso, antes de morir sin alcanzar los niveles terapéuticos de eculizumab. En ambos pacientes que no respondieron, el nivel de eculizumab estuvo por debajo del terapéutico tres días después de la primera dosis, pero los resultados de concentración de eculizumab en suero estaban pendientes, por lo que la dosificación no pudo ajustarse de manera oportuna. Las constantes de la tasa de eliminación y el aclaramiento sistémico del eculizumab mostraron una variabilidad significativa entre los pacientes, con un aclaramiento más rápido en los pacientes cinco y seis que estaban más enfermos al momento del tratamiento, y quizás más catabólicos que los pacientes que respondieron (datos no mostrados).

#### 30 Relación entre los niveles de eculizumab y de CH50

Los niveles de eculizumab y CH50 se midieron en los mismos puntos de tiempo y se correlacionaron fuertemente entre sí (Figura 6-7). Específicamente, un recuento de CH50 de 0-3 unidades CAE correspondió a una concentración de eculizumab > 99 µg/ml, excepto por una medición del paciente seis, que se extrajo durante una fase de eliminación extremadamente rápida en la primera semana. Por el contrario, en todos los puntos de tiempo de muestreo con un recuento de CH50 de ≥4 unidades CAE, las concentraciones de eculizumab de los pacientes estuvieron por debajo del nivel terapéutico a ≤99 µg/ml (p = 0,0001).

El bloqueo completo de la actividad del complemento (CH50 <3 unidades CAE) se logró en los cuatro respondedores (pacientes uno a cuatro) después de la segunda dosis de terapia. El bloqueo del complemento fue incompleto en los dos casos que no respondieron (pacientes cinco y seis).

Hasta la fecha, el Solicitante recetó eculizumab a 18 pacientes con HSCT-TMA de alto riesgo (edad 2,4-30 años); 3 pacientes siguen recibiendo terapia. De los otros 15 pacientes, 10 pacientes (66,7 %) pudieron resolver la HSCT-TMA y 5 murieron por complicaciones del HSCT con HSCT-TMA activa. Esta cohorte de pacientes extendida respalda la observación inicial que los pacientes con HSCT requieren una dosis farmacodinámica de bloqueo del complemento para mantener los niveles terapéuticos estables y todos los pacientes requieren una dosis de eculizumab más intensa que la recomendada para otras enfermedades. El nivel de CH50 es una prueba de laboratorio muy precisa y rápida para optimizar la dosificación del eculizumab y las mediciones de sC5b-9 indican cuándo debe esperarse una respuesta clínica. Todos los pacientes que murieron con HSCT-TMA activa no pudieron lograr la dosificación terapéutica de eculizumab incluso con el aumento de la dosis. La tasa de respuesta global a la terapia se mantiene en 66,7 % en esta cohorte extendida de pacientes. Es de destacar que uno de los pacientes actualmente en tratamiento ha logrado la normalización de sC5b-9 con una dosis personalizada de eculizumab, pero permanece con signos hematológicos y renales activos de HSCT-TMA y tiene un nivel elevado de C3a. Esto demuestra que algunos pacientes pueden requerir un bloqueo del complemento más alto en la cascada del complemento (es decir, a nivel de C3) con futuros agentes además de o en lugar del eculizumab.

#### Discusión

El Solicitante informa el uso del inhibidor del complemento terminal, eculizumab, en el tratamiento de la HSCT-TMA grave. El Solicitante observó que 66,7% de los pacientes tuvieron una resolución completa de la HSCT-TMA grave después de alcanzar los niveles terapéuticos de eculizumab. En el estudio prospectivo de HSCT-TMA del Solicitante, la supervivencia de dichos pacientes con HSCT-TMA de alto riesgo fue de 20% sin terapia de bloqueo del complemento. Los pacientes que no respondieron fallecieron sin alcanzar los niveles terapéuticos del fármaco o el bloqueo del complemento, a pesar del aumento de la dosis. Todos los pacientes con HSCT-TMA requirieron dosis más altas de eculizumab y/o administraciones más frecuentes para alcanzar y mantener los niveles terapéuticos de eculizumab en comparación con el régimen de dosificación actualmente recomendado para pacientes con aHUS. Una terapia más temprana o más

agresiva, mediante el uso de un aumento oportuno de la dosis puede permitir que el tratamiento sea más efectivo para los pacientes que no responden. Es importante destacar que el Solicitante observó que la respuesta clínica y los niveles de ecilizumab se correlacionaron bien con la actividad total del complemento (CH50), un marcador farmacodinámico de bloqueo del complemento que se mide fácilmente. La medición de la concentración de ecilizumab en suero no está  
5 ampliamente disponible y los resultados pueden tardar > 1 semana en regresar. Por lo tanto, la prueba de CH50 ofrece una evaluación más rápida del bloqueo del complemento y la correlación con el nivel terapéutico de ecilizumab, lo que permite ajustes prácticos de la dosis de manera más oportuna.

La farmacocinética del ecilizumab se analizó en base a un modelo de un compartimento. Sin embargo, la constante de la tasa de eliminación no fue constante después de cada tratamiento, sino que disminuyó con el tiempo y se estabilizó a medida que disminuía la pendiente de las concentraciones de ecilizumab transformadas logarímicamente, que se hizo  
10 más superficial después de múltiples tratamientos. Trece de 18 pacientes (72 %) mostraron concentraciones de ecilizumab <99 µg/ml 3-4 días después de la primera dosis de ecilizumab. La supresión de CH50 fue inadecuada y se asoció con un nivel por debajo del nivel terapéutico de ecilizumab de <99 µg/ml, lo que identifica la necesidad de  
15 tratamiento adicional en estos pacientes. Por el contrario, una supresión adecuada de CH50 se correlacionó fuertemente con un nivel terapéutico de ecilizumab > 99 µg/ml y una respuesta clínica, lo que indica un bloqueo exitoso del complemento y una dosificación adecuada del fármaco.

El estudio del Solicitante proporciona datos importantes sobre el tiempo de respuesta clínica al ecilizumab en pacientes con HSCT-TMA. La respuesta más rápida y completa se logró en pacientes que comenzaron la terapia con ecilizumab  
20 inmediatamente después del diagnóstico de HSCT-TMA y lograron niveles terapéuticos estables de ecilizumab. Sin embargo, pudimos lograr una respuesta hematológica y un control de la hipertensión incluso en pacientes con un curso prolongado de HSCT-TMA que había sido refractario al intercambio terapéutico de plasma. En casos con HSCT-TMA prolongada antes de la terapia con ecilizumab, la recuperación renal fue incompleta y el tiempo de recuperación fue más  
25 largo, lo que sugiere que el uso temprano de ecilizumab puede maximizar el beneficio en casos de HSCT-TMA grave.

Con base en nuestras observaciones, se pueden utilizar al menos cuatro a seis semanas de terapia con un nivel mínimo de ecilizumab terapéutico documentado o un bloqueo adecuado del complemento documentado por un nivel indetectable  
30 de CH50 antes de que se considere que un paciente no responde. Si se determina que un paciente es un eliminador rápido después de la primera dosis (es decir, 3-4 días después del inicio de la terapia), se debe considerar una dosis de inducción de ecilizumab adicional para lograr un nivel mínimo terapéutico lo más rápido posible. Otra opción es aumentar la primera dosis de ecilizumab en 300 mg por encima de la actual se recomienda la primera dosis de inducción, especialmente en pacientes críticos que pueden ser altamente catabólicos. Mientras que los pacientes con hemoglobinuria  
35 paroxística nocturna (HPN) y aHUS a menudo se comprometen a una terapia de por vida con ecilizumab, el Solicitante pudo suspender la terapia con ecilizumab en todos los respondedores después de lograr una respuesta hematológica y renal. El curso exitoso más corto fue de 4 semanas y la terapia más larga fue de 15 semanas. No hubo recurrencias de HSCT-TMA en respondedores después de suspender la terapia.

Todos los pacientes que se evaluaron en la cohorte tuvieron niveles elevados de sC5b-9, lo que documenta una vía de  
40 complemento terminal activada. Recientemente demostramos que tanto la desregulación de la vía alternativa como la clásica se pueden observar en la HSCT-TMA. Afortunadamente, el complemento que se activa por la vía alternativa o clásica puede bloquearse por el bloqueador terminal del complemento ecilizumab, lo que convierte a este medicamento en una terapia apropiada independientemente de la vía del complemento involucrada en la patogénesis de la HSCT-TMA. En conclusión, el ecilizumab es una opción terapéutica prometedora para pacientes con HSCT-TMA que tienen un alto  
45 riesgo de muerte. El inicio temprano de la terapia puede prevenir el daño irreversible de los órganos y la toxicidad es baja. La dosificación de ecilizumab en pacientes con HSCT-TMA debe guiarse por pruebas farmacocinéticas o farmacodinámicas, y deben explorarse esquemas de dosificación más agresivos en los pacientes más enfermos y catabólicos. El CH50 sirve como un marcador farmacodinámico preciso y fácilmente disponible del bloqueo del  
50 complemento, lo que permite un ajuste rápido de la dosis, tal vez sin necesidad de seguir el nivel del fármaco.

#### Referencias

1. George JN, Li X, McMinn JR, Terrell DR, Vesely SK, Selby GB. Thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic  
55 uremic syndrome following allogeneic HPC transplantation: a diagnostic dilemma. *Transfusion*. 2004;44:294-304.
2. Kersting S, Koomans HA, Hene RJ, Verdonck LF. Acute renal failure after allogeneic myeloablative stem cell  
60 transplantation: retrospective analysis of incidence, risk factors and survival. *Bone Marrow Transplant*. 2007;39:359-65.
3. Parikh CR, McSweeney P, Schrier RW. Acute renal failure independently predicts mortality after myeloablative  
65 allogeneic hematopoietic cell transplant. *Kidney Int*. 2005;67:1999-2005.
4. Jodele S, Davies SM, Lane A, Khoury J, Dandoy C, Goebel J, y otros. Refined diagnostic and risk criteria for HSCT-  
associated thrombotic microangiopathy: a prospective study in children and young adults. *Blood*. 2014;Jul  
24;124(4):645-53.

5. Keir L, Coward RJ. Advances in our understanding of the pathogenesis of glomerular thrombotic microangiopathy. *Pediatr Nephrol.* 2011;26:523-33.
- 5 6. Waters AM, Licht C. aHUS caused by complement dysregulation: new therapies on the horizon. *Pediatr Nephrol.* 2011;26:41-57.
7. Tsai HM. Untying the knot of thrombotic thrombocytopenic purpura and atypical hemolytic uremic syndrome. *Am J Med.* 2013;126:200-9.
- 10 8. Jodele S, Licht C, Goebel J, Dixon BP, Zhang K, Sivakumaran TA, et al. Abnormalities in the alternative pathway of complement in children with hematopoietic stem cell transplant-associated thrombotic microangiopathy. *Blood.* 2013;122:2003-7.
- 15 9. Jodele S, Hirsch R, Laskin B, Davies S, Witte D, Chima R. Pulmonary arterial hypertension in pediatric patients with hematopoietic stem cell transplant-associated thrombotic microangiopathy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19:202-7.
- 20 10. Lerner D, Dandoy C, Hirsch R, Laskin B, Davies SM, Jodele S. Pericardial effusion in pediatric SCT recipients with thrombotic microangiopathy. *Bone Marrow Transplant.* 2014;Jun;49(6):862-3.
11. Inamoto Y, Ito M, Suzuki R, Nishida T, Iida H, Kohno A, y otros. Clinicopathological manifestations and treatment of intestinal transplant-associated microangiopathy. *Bone Marrow Transplant.* 2009;44:43-9.
- 25 12. Glezerman IG, Jhaveri KD, Watson TH, Edwards AM, Papadopoulos EB, Young JW, y otros. Chronic kidney disease, thrombotic microangiopathy, and hypertension following T cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16:976-84.
- 30 13. Hoffmeister PA, Hingorani SR, Storer BE, Baker KS, Sanders JE. Hypertension in long-term survivors of pediatric hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16:515-24.
- 35 14. Laskin BL, Nehus E, Goebel J, Khoury JC, Davies SM, Jodele S. Cystatin C-estimated glomerular filtration rate in pediatric autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18:1745-52.
15. Laskin BL, Goebel J, Davies SM, Khoury JC, Bleesing JJ, Mehta PA, y otros. Early clinical indicators of transplant-associated thrombotic microangiopathy in pediatric neuroblastoma patients undergoing auto-SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46:682-9.
- 40 16. Schwartz GJ, Furth SL. Glomerular filtration rate measurement and estimation in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2007;22:1839-48.
17. Jodele S, Fukuda T, Vinks A, Mizuno K, Laskin BL, Goebel J, y otros. Eculizumab Therapy in Children with Severe Hematopoietic Stem Cell Transplantation-Associated Thrombotic Microangiopathy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;Abril;20(4):518-25.
- 45 18. Inker LA, Schmid CH, Tighiouart H, Eckfeldt JH, Feldman HI, Greene T, y otros. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *N Engl J Med.* 2012;367:20-9.
- 50 19. Nehus EJ, Laskin BL, Kathman TI, Bissler JJ. Performance of cystatin C-based equations in a pediatric cohort at high risk of kidney injury. *Pediatr Nephrol.* 2013;28:453-61.
20. Hingorani S, Gooley T, Pao E, Sandmaier B, McDonald G. Urinary cytokines after HCT: evidence for renal inflammation in the pathogenesis of proteinuria and kidney disease. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49:403-9.
- 55 21. Hingorani SR, Seidel K, Lindner A, Aneja T, Schoch G, McDonald G. Albuminuria in hematopoietic cell transplantation patients: prevalence, clinical associations, and impact on survival. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14:1365-72.
22. Laskin BL, Goebel J, Davies SM, Jodele S. Small vessels, big trouble in the kidneys and beyond: hematopoietic stem cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy. *Blood.* 2011;118:1452-62.
- 60 23. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics.* 2004;114:555-76.
- 65 24. Goodwin JE, Geller DS. Glucocorticoid-induced hypertension. *Pediatr Nephrol.* 2012;27:1059-66.

25. Moulder JE, Cohen EP, Fish BL. Captopril and losartan for mitigation of renal injury caused by single-dose total-body irradiation. *Radiation research*. 2011;175:29-36.
- 5 26. Hingorani S. Chronic kidney disease after liver, cardiac, lung, heart-lung, and hematopoietic stem cell transplant. *Pediatr Nephrol*. 2008;23:879-88.
27. Haines HL, Laskin BL, Goebel J, Davies SM, Yin HJ, Lawrence J, y otros. Blood, and not urine, BK viral load predicts renal outcome in children with hemorrhagic cystitis following hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17:1512-9.
- 10 28. O'Donnell PH, Swanson K, Josephson MA, Artz AS, Parsad SD, Ramaprasad C, y otros. BK virus infection is associated with hematuria and renal impairment in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15:1038-48 e1.
- 15 29. Laskin BL, Maisel J, Goebel J, Yin HJ, Luo G, Khoury JC, y otros. Renal Arteriolar C4d Deposition: A Novel Characteristic of Hematopoietic Stem Cell Transplantation-Associated Thrombotic Microangiopathy. *Transplantation*. 2013;Jul 27;96(2):217-23.
- 20 30. Dandoy CE, Hirsch R, Chima R, Davies SM, Jodele S. Pulmonary hypertension after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19:1546-56.
31. Houtchens J, Martin D, Klinger JR. Diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary medicine*. 2011;2011:845864.
- 25 32. Perkowska-Ptasinska A, Sulikowska-Rowinska A, Pazik J, Komuda-Leszek E, Durlik M. Thrombotic nephropathy and pulmonary hypertension following autologous bone marrow transplantation in a patient with acute lymphoblastic leukemia: case report. *Transplant Proc*. 2006;38:295-6.
- 30 33. Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122:4306-13.
34. Milan A, Magnino C, Veglio F. Echocardiographic indexes for the non-invasive evaluation of pulmonary hemodynamics. *Journal of the American Society of Echocardiography: official publication of the American Society of Echocardiography*. 2010;23:225-39; quiz 332-4.
- 35 35. Galie N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, y otros. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European heart journal*. 2009;30:2493-537.
- 40 36. Aldoss O, Gruenstein DH, Bass JL, Steinberger J, Zhang Y, Defor TE, y otros. Pericardial effusion after pediatric hematopoietic cell transplant. *Pediatr Transplant*. 2013;17:294-9.
- 45 37. Norkin M, Ratanatharathorn V, Ayash L, Abidi MH, Al-Kadhimi Z, Lum LG, y otros. Large pericardial effusion as a complication in adults undergoing SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46:1353-6.
38. Mohammed J, Filler G, Price A, Sharma AP. Cardiac tamponade in diarrhoea-positive haemolytic uraemic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:679-81.
- 50 39. Sagrista-Sauleda J, Merce AS, Soler-Soler J. Diagnosis and management of pericardial effusion. *World journal of cardiology*. 2011;3:135-43.
40. Aljitawi OS, Rodriguez L, Madan R, Ganguly S, Abhyankar S, McGuirk JP. Late-onset intestinal perforation in the setting of posttransplantation microangiopathy: a case report. *Transplant Proc*. 2010;42:3892-3.
- 55 41. Hewamana S, Austen B, Murray J, Johnson S, Wilson K. Intestinal perforation secondary to haematopoietic stem cell transplant associated thrombotic microangiopathy. *Eur J Haematol*. 2009;83:277.
42. Narimatsu H, Kami M, Hara S, Matsumura T, Miyakoshi S, Kusumi E, y otros. Intestinal thrombotic microangiopathy following reduced-intensity umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36:517-23.
- 60 43. Nishida T, Hamaguchi M, Hirabayashi N, Haneda M, Terakura S, Atsuta Y, y otros. Intestinal thrombotic microangiopathy after allogeneic bone marrow transplantation: a clinical imitator of acute enteric graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33:1143-50.
- 65

44. Yamada-Fujiwara M, Miyamura K, Fujiwara T, Tohmiya Y, Endo K, Onishi Y, y otros. Diagnosis of intestinal graft-versus-host disease and thrombotic microangiopathy after allogeneic stem cell transplantation. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2012;227:31-7.
- 5 45. Fujino M, Kim Y, Ito M. Intestinal thrombotic microangiopathy induced by FK506 in rats. *Bone Marrow Transplant*. 2007;39:367-72.
46. Piscitelli D, Fiore MG, Rossi R, Casiello M, Sanguedolce F. Unusual case report of thrombotic microangiopathy of the small bowel following liver transplantation, a possible immunosuppressant-induced disease with histological and ultrastructural findings. *TheScientificWorldJournal*. 2009;9:1031-4.
- 10 47. Dierickx D, Monbaliu D, De Rycke A, Wisanto E, Lerut E, Devos T, y otros. Thrombotic microangiopathy following intestinal transplantation: a single center experience. *Transplant Proc*. 2010;42:79-81.
- 15 48. Martinez MT, Bucher C, Stussi G, Heim D, Buser A, Tsakiris DA, y otros. Transplant-associated microangiopathy (TAM) in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36:993-1000.
49. Fuge R, Bird JM, Fraser A, Hart D, Hunt L, Cornish JM, y otros. The clinical features, risk factors and outcome of thrombotic thrombocytopenic purpura occurring after bone marrow transplantation. *Br J Haematol*. 2001;113:58-64.
- 20 50. Staykov D, Schwab S. Posterior reversible encephalopathy syndrome. *Journal of intensive care medicine*. 2012;27:11-24.
51. Roth C, Ferbert A. The posterior reversible encephalopathy syndrome: what's certain, what's new? *Practical neurology*. 2011;11:136-44.
- 25 52. Ishikawa Y, Nishio S, Sasaki H, Kudo R, Goto H, Ito M, y otros. Transplantation-associated thrombotic microangiopathy after steroid pulse therapy for polyserositis related to graft-versus-host disease. *Clin Exp Nephrol*. 2011;15:179-83.
- 30 53. Batts ED, Lazarus HM. Diagnosis and treatment of transplantation-associated thrombotic microangiopathy: real progress or are we still waiting? *Bone Marrow Transplant*. 2007;40:709-19.
54. Kojouri K, George JN. Thrombotic microangiopathy following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Oncol*. 2007;19:148-54.
- 35 55. Nakamae H, Yamane T, Hasegawa T, Nakamae M, Terada Y, Hagihara K, y otros. Risk factor analysis for thrombotic microangiopathy after reduced-intensity or myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol*. 2006;81:525-31.
- 40 56. Hale GA, Bowman LC, Rochester RJ, Benaim E, Heslop HE, Krance RA, y otros. Hemolytic uremic syndrome after bone marrow transplantation: clinical characteristics and outcome in children. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:912-20.
- 45 57. Worel N, Greinix HT, Leitner G, Mitterbauer M, Rabitsch W, Rosenmayr A, y otros. ABO-incompatible allogeneic hematopoietic stem cell transplantation following reduced-intensity conditioning: close association with transplant-associated microangiopathy. *Transfus Apher Sci*. 2007;36:297-304.
- 50 58. Willems E, Baron F, Seidel L, Frere P, Fillet G, Beguin Y. Comparison of thrombotic microangiopathy after allogeneic hematopoietic cell transplantation with high-dose or nonmyeloablative conditioning. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:689-93.
59. Rosenthal J, Pawlowska A, Bolotin E, Cervantes C, Maroongroge S, Thomas SH, y otros. Transplant-associated thrombotic microangiopathy in pediatric patients treated with sirolimus and tacrolimus. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;57:142-6.
- 55 60. Rodriguez R, Nakamura R, Palmer JM, Parker P, Shayani S, Nademanee A, y otros. A phase II pilot study of tacrolimus/sirolimus GVHD prophylaxis for sibling donor hematopoietic stem cell transplantation using 3 conditioning regimens. *Blood*. 2010;115:1098-105.
- 60 61. Cutler C, Henry NL, Magee C, Li S, Kim HT, Alyea E, y otros. Sirolimus and thrombotic microangiopathy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:551-7.
- 65 62. Platzbecker U, von Bonin M, Goekkurt E, Radke J, Binder M, Kiani A, y otros. Graft-versus-host disease prophylaxis with everolimus and tacrolimus is associated with a high incidence of sinusoidal obstruction syndrome and microangiopathy: results of the EVTAC trial. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15:101-8.

63. Changsirikulchai S, Myerson D, Guthrie KA, McDonald GB, Alpers CE, Hingorani SR. Renal thrombotic microangiopathy after hematopoietic cell transplant: role of GVHD in pathogenesis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4:345-53.
- 5 64. Tichelli A, Gratwohl A. Vascular endothelium as 'novel' target of graft-versus-host disease. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008;21:139-48.
- 10 65. Cooke KR, Jannin A, Ho V. The contribution of endothelial activation and injury to end-organ toxicity following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14:23-32.
66. Biedermann BC. Vascular endothelium and graft-versus-host disease. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2008;21:129-38.
- 15 67. Takatsuka H, Takemoto Y, Yamada S, Wada H, Tamura S, Fujimori Y, y otros. Complications after bone marrow transplantation are manifestations of systemic inflammatory response syndrome. *Bone Marrow Transplant*. 2000;26:419-26.
- 20 68. Nakamura Y, Yujiri T, Ando T, Hisano S, Tanizawa Y. Nephrotic syndrome associated with thrombotic microangiopathy following allogeneic stem-cell transplantation for myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 2007;136:857-9; respuesta del autor 9-60.
- 25 69. Cho BS, Min CK, Eom KS, Kim YJ, Kim HJ, Lee S, y otros. Clinical impact of thrombotic microangiopathy on the outcome of patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41:813-20.
- 30 70. Chang A, Hingorani S, Kowalewska J, Flowers ME, Aneja T, Smith KD, y otros. Spectrum of renal pathology in hematopoietic cell transplantation: a series of 20 patients and review of the literature. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2:1014-23.
71. Lopes da Silva R, Ferreira I, Teixeira G, Cordeiro D, Mafra M, Costa I, y otros. BK virus encephalitis with thrombotic microangiopathy in an allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipient. *Transpl Infect Dis*. 2011;13:161-7.
- 35 72. Uderzo C, Bonanomi S, Busca A, Renoldi M, Ferrari P, Iacobelli M, y otros. Risk factors and severe outcome in thrombotic microangiopathy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation*. 2006;82:638-44.
73. Schwimmer J, Nadasdy TA, Spitalnik PF, Kaplan KL, Zand MS. De novo thrombotic microangiopathy in renal transplant recipients: a comparison of hemolytic uremic syndrome with localized renal thrombotic microangiopathy. *Am J Kidney Dis*. 2003;41:471-9.
- 40 74. Labrador J, Lopez-Corral L, Lopez-Godino O, Vazquez L, Cabrero-Calvo M, Perez-Lopez R, y otros. Risk factors for thrombotic microangiopathy in allogeneic hematopoietic stem cell recipients receiving GVHD prophylaxis with tacrolimus plus MTX or sirolimus. *Bone Marrow Transplant*. 2014;May;49(5):684-90.
- 45 75. Shayani S, Palmer J, Stiller T, Liu X, Thomas SH, Khuu T, y otros. Thrombotic microangiopathy associated with sirolimus level after allogeneic hematopoietic cell transplantation with tacrolimus/sirolimus-based graft-versus-host disease prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19:298-304.
- 50 76. Siami K, Kojouri K, Swisher KK, Selby GB, George JN, Laszik ZG. Thrombotic microangiopathy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: an autopsy study. *Transplantation*. 2008;85:22-8.
77. Mii A, Shimizu A, Masuda Y, Fujino T, Kaneko T, Utsumi K, y otros. Renal thrombotic microangiopathy associated with chronic humoral graft versus host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Pathol Int*. 2011;61:34-41.
- 55 78. Mii A, Shimizu A, Kaneko T, Fujita E, Fukui M, Fujino T, y otros. Renal thrombotic microangiopathy associated with chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pathol Int*. 2011;61:518-27.
- 60 79. Sadeghi B, Al-Chaqmaqchi H, Al-Hashmi S, Brodin D, Hassan Z, Abedi-Valugerdi M, y otros. Early-phase GVHD gene expression profile in target versus non-target tissues: kidney, a possible target? *Bone Marrow Transplant*. 2013;48:284-93.
- 65 80. Brukamp K, Doyle AM, Bloom RD, Bunin N, Tomaszewski JE, Cizman B. Nephrotic syndrome after hematopoietic cell transplantation: do glomerular lesions represent renal graft-versus-host disease? *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1:685-94.

81. Ho VT, Cutler C, Carter S, Martin P, Adams R, Horowitz M, y otros. Blood and marrow transplant clinical trials network toxicity committee consensus summary: thrombotic microangiopathy after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11:571 - 5.
- 5 82. Ruutu T, Barosi G, Benjamin RJ, Clark RE, George JN, Gratwohl A, y otros. Diagnostic criteria for hematopoietic stem cell transplant-associated microangiopathy: results of a consensus process by an International Working Group. *Haematologica.* 2007;92:95-100.
- 10 83. Cho BS, Yahng SA, Lee SE, Eom KS, Kim YJ, Kim HJ, y otros. Validation of recently proposed consensus criteria for thrombotic microangiopathy after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation.* 2010;90:918-26.
- 15 84. van der Plas RM, Schiphorst ME, Huizinga EG, Hene RJ, Verdonck LF, Sixma JJ, y otros. von Willebrand factor proteolysis is deficient in classic, but not in bone marrow transplantation-associated, thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1999;93:3798-802.
- 20 85. Peyvandi F, Siboni SM, Lambertenghi Deliliers D, Lavoretano S, De Fazio N, Moroni B, y otros. Prospective study on the behaviour of the metalloprotease ADAMTS13 and of von Willebrand factor after bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 2006;134:187-95.
- 25 86. Carreras E, Diaz-Ricart M. The role of the endothelium in the short-term complications of hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46:1495-502.
- 30 87. Holmes LV, Strain L, Staniforth SJ, Moore I, Marchbank K, Kavanagh D, y otros. Determining the population frequency of the CFHR3/CFHR1 deletion at 1q32. *PLoS one.* 2013;8:e60352.
- 35 88. Legendre CM, Licht C, Loirat C. Eculizumab in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med.* 2013;369:1379-80.
- 40 89. Tati R, Kristoffersson AC, Stahl AL, Rebetz J, Wang L, Licht C, y otros. Complement activation associated with ADAMTS13 deficiency in human and murine thrombotic microangiopathy. *J Immunol.* 2013;191:2184-93.
- 45 90. Reti M, Farkas P, Csuka D, Razso K, Schlammadinger A, Udvardy ML, y otros. Complement activation in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* 2012;10:791-8.
- 50 91. Cataland SR, Holers VM, Geyer S, Yang S, Wu HM. Biomarkers of the alternative pathway and terminal complement activity at presentation confirms the clinical diagnosis of aHUS and differentiates aHUS from TTP. *Blood.* 2014;Jun 12;123(24):3733-8.
- 55 92. Orth D, Khan AB, Naim A, Grif K, Brockmeyer J, Karch H, y otros. Shiga toxin activates complement and binds factor H: evidence for an active role of complement in hemolytic uremic syndrome. *J Immunol.* 2009;182:6394-400.
93. Thurman JM, Marians R, Emlen W, Wood S, Smith C, Akana H, y otros. Alternative pathway of complement in children with diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4:1920-4.
94. Lapeyraque AL, Malina M, Fremeaux-Bacchi V, Boppel T, Kirschfink M, Oualha M, y otros. Eculizumab in severe Shiga-toxin-associated HUS. *N Engl J Med.* 2011;364:2561-3.
95. Menne J, Nitschke M, Stinglele R, Abu-Tair M, Beneke J, Bramstedt J, y otros. Validation of treatment strategies for enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 induced haemolytic uraemic syndrome: case-control study. *BMJ.* 2012;345:e4565.
96. Kielstein JT, Beutel G, Fleig S, Steinhoff J, Meyer TN, Hafer C, y otros. Best supportive care and therapeutic plasma exchange with or without eculizumab in Shiga-toxin-producing *E. coli* O104:H4 induced haemolytic-uraemic syndrome: an analysis of the German STEC-HUS registry. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27:3807-15.
97. Noris M, Mescia F, Remuzzi G. STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nature reviews Nephrology.* 2012;8:622-33.
- 60 98. Song D, Wu LH, Wang FM, Yang XW, Zhu D, Chen M, y otros. The spectrum of renal thrombotic microangiopathy in lupus nephritis. *Arthritis research & therapy.* 2013;15:R12.
- 65 99. Crovetto F, Borsa N, Acaia B, Nishimura C, Frees K, Smith RJ, y otros. The genetics of the alternative pathway of complement in the pathogenesis of HELLP syndrome. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine: the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet.* 2012;25:2322-5.

100. Totina A, Iorember F, El-Dahr SS, Yosypiv IV. Atypical hemolytic-uremic syndrome in a child presenting with malignant hypertension. *Clinical Pediatrics*. 2013;52:183-6.
- 5 101. Nadasdy T. Thrombotic microangiopathy in renal allografts: the diagnostic challenge. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2014;19:283-92.
102. Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorrow ML, Boeckh M, y otros. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2010;363:2091-101.
- 10 103. Rajpal JS, Patel N, Vogel RI, Kashtan CE, Smith AR. Improved survival over the last decade in pediatric patients requiring dialysis after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19:661-5.
104. Arai Y, Yamashita K, Mizugishi K, Watanabe T, Sakamoto S, Kitano T, y otros. Serum neutrophil extracellular trap levels predict thrombotic microangiopathy after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19:1683-9.
- 15 105. Jodele S, Laskin BL, Goebel J, Khoury JC, Pinkard SL, Carey PM, y otros. Does early initiation of therapeutic plasma exchange improve outcome in pediatric stem cell transplant-associated thrombotic microangiopathy? *Transfusion*. 2013;53:661-7.
- 20 106. Licht C, Weyersberg A, Heinen S, Stapenhorst L, Devenge J, Beck B, y otros. Successful plasma therapy for atypical hemolytic uremic syndrome caused by factor H deficiency owing to a novel mutation in the complement cofactor protein domain 15. *Am J Kidney Dis*. 2005;45:415-21.
- 25 107. Marr H, McDonald EJ, Merriman E, Smith M, Mangos H, Stoddart C, y otros. Successful treatment of transplant-associated microangiopathy with rituximab. *N Z Med J*. 2009;122:72-4.
108. Carella AM, D'Arena G, Greco MM, Nobile M, Cascavilla N. Rituximab for allo-SCT-associated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41:1063-5.
- 30 109. Au WY, Ma ES, Lee TL, Ha SY, Fung AT, Lie AK, y otros. Successful treatment of thrombotic microangiopathy after haematopoietic stem cell transplantation with rituximab. *Br J Haematol*. 2007;137:475-8.
- 35 110. Jodele S, Bleesing JJ, Mehta PA, Filipovich AH, Laskin BL, Goebel J, y otros. Successful early intervention for hyperacute transplant-associated thrombotic microangiopathy following pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant*. 2012;16:E39-42.
111. Choi CM, Schmaier AH, Snell MR, Lazarus HM. Thrombotic microangiopathy in haematopoietic stem cell transplantation: diagnosis and treatment. *Drugs*. 2009;69:183-98.
- 40 112. Naina HV, Gertz MA, Elliott MA. Thrombotic microangiopathy during peripheral blood stem cell mobilization. *J Clin Apher*. 2009;24:259-61.
- 45 113. San T, Moini H, Emerk K, Bilsel S. Protective effect of defibrotide on perfusion induced endothelial damage. *Thrombosis Research*. 2000;99:335-41.
114. Schroder H. Defibrotide protects endothelial cells, but not L929 tumour cells, from tumour necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 1995;47:250-2.
- 50 115. Sucak GT, Aki ZS, Yagci M, Yegin ZA, Ozkurt ZN, Haznedar R. Treatment of sinusoidal obstruction syndrome with defibrotide: a single-center experience. *Transplant Proc*. 2007;39:1558-63.
116. Chalandon Y, Roosnek E, Mermillod B, Newton A, Ozsahin H, Wacker P, y otros. Prevention of veno-occlusive disease with defibrotide after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2004;10:347-54.
- 55 117. Carmona A, Diaz-Ricart M, Palomo M, Molina P, Pino M, Rovira M, y otros. Distinct deleterious effects of cyclosporine and tacrolimus and combined tacrolimus-sirolimus on endothelial cells: protective effect of defibrotide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19:1439-45.
- 60 118. Corbacioglu S, Cesaro S, Faraci M, Valteau-Couanet D, Gruhn B, Rovelli A, y otros. Defibrotide for prophylaxis of hepatic veno-occlusive disease in paediatric haemopoietic stem-cell transplantation: an open-label, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet*. 2012;379:1301-9.

119. Uderzo C, Fumagalli M, De Lorenzo P, Busca A, Vassallo E, Bonanomi S, y otros. Impact of thrombotic thrombocytopenic purpura on leukemic children undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000;26:1005-9.
- 5 120. Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, Hochster H, Haas M, Weisstuch J, y otros. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med.* 2008;358:1129-36.
121. Noris M, Remuzzi G. Atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med.* 2009;361:1676-87.
- 10 122. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:1046-56.
123. Kurniati NF, van Meurs M, Vom Hagen F, Jongman RM, Moser J, Zwiers PJ, y otros. Pleiotropic effects of angiopoietin-2 deficiency do not protect mice against endotoxin-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28:567-75.
- 15 124. Imhof BA, Aurrand-Lions M. Angiogenesis and inflammation face off. *Nature medicine.* 2006;12:171-2.
125. Ueda N, Chihara D, Kohno A, Tatekawa S, Ozeki K, Watamoto K, y otros. Predictive Value of Circulating Angiopoietin-2 for Endothelial Damage-Related Complications in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2014;20:1335-40.
- 20 126. Richardson PG, Soiffer RJ, Antin JH, Uno H, Jin Z, Kurtzberg J, y otros. Defibrotide for the treatment of severe hepatic veno-occlusive disease and multiorgan failure after stem cell transplantation: a multicenter, randomized, dose-finding trial. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16:1005-17.
- 25 127. Wuhl E, Trivelli A, Picca S, Litwin M, Peco-Antic A, Zurowska A, y otros. Strict blood-pressure control and progression of renal failure in children. *N Engl J Med.* 2009;361:1639-50.
- 30 128. Lovric S, Lukasz A, Hafer C, Kielstein JT, Haubitz M, Haller H, y otros. Removal of elevated circulating angiopoietin-2 by plasma exchange--a pilot study in critically ill patients with thrombotic microangiopathy and anti-glomerular basement membrane disease. *Thrombosis and haemostasis.* 2010;104:1038-43.

35 Todos los porcentajes y relaciones se calculan en peso a menos que se indique lo contrario.

Todos los porcentajes y proporciones se calculan en función de la composición total a menos que se indique lo contrario.

40 La cita de cualquier documento no es una admisión de que es una técnica anterior con respecto a cualquier invención descrita o reivindicada en la presente o que solo, o en combinación con cualquier otra referencia o referencias, enseña, sugiere o describe tal invención. Además, en la medida en que cualquier significado o definición de un término en este documento entre en conflicto con cualquier significado o definición del mismo término en un documento incorporado por referencia, prevalecerá el significado o definición asignado a ese término en este documento.

45 Cuando se describen múltiples características/modalidades, debe entenderse que una característica/modalidad puede combinarse con cualquier otra característica/modalidad de la descripción.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal humanizado capaz de inhibir el complemento terminal para usar en el tratamiento de la microangiopatía trombótica asociada al trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) (HSCT-TMA) en un sujeto que se ha sometido a un trasplante de médula ósea, en donde dicho tratamiento comprende administrar dicho anticuerpo monoclonal humanizado a dicho sujeto, en donde dicho anticuerpo monoclonal humanizado es el eculizumab y se administra de una manera suficiente para alcanzar un nivel terapéutico de eculizumab en dicho sujeto, en donde dicho nivel terapéutico comprende un nivel mínimo de eculizumab en suero sanguíneo mayor que o al menos de 99 µg/ml.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal humanizado para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha etapa de administración se repite todos los días, o cada dos días, o cada tres días hasta que se alcance un nivel mínimo de eculizumab en suero sanguíneo mayor que o al menos de 99 µg/ml en dicho sujeto.
- 15 3. El anticuerpo monoclonal humanizado para usar de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la administración de eculizumab comprende al menos dos dosis, o al menos tres dosis, o al menos cuatro dosis, o más de cuatro dosis.
- 20 4. El anticuerpo monoclonal humanizado para usar de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde dicha etapa de administración se realiza durante un período de tiempo suficiente para lograr una respuesta hematológica favorable, en donde una respuesta hematológica favorable comprende la resolución de marcadores hematológicos de la TMA, preferentemente en donde dicha etapa de administración se realiza durante un período de tiempo suficiente para lograr una respuesta completa, en donde dicha respuesta completa comprende la normalización de los parámetros hematológicos de dicho sujeto, preferentemente en donde una respuesta hematológica favorable comprende una o más de la normalización de la lactato deshidrogenasa (LDH), la resolución de la necesidad de transfusiones de glóbulos rojos y plaquetas, y la desaparición de esquistocitos.
- 25 5. El anticuerpo monoclonal humanizado para usar de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde dicha etapa de administración se realiza durante un período de tiempo suficiente para lograr una respuesta completa, en donde dicha respuesta completa comprende la normalización de los parámetros hematológicos de dicho sujeto, una respuesta renal medida como una duplicación de la tasa de filtración glomerular estimada en cistatina C (eGFR) y la mejora de la proteinuria a valores por debajo del rango nefrótico según lo definido por la relación aleatoria de proteína en orina a creatinina por debajo de 2 mg/mg.
- 30

Figura 1

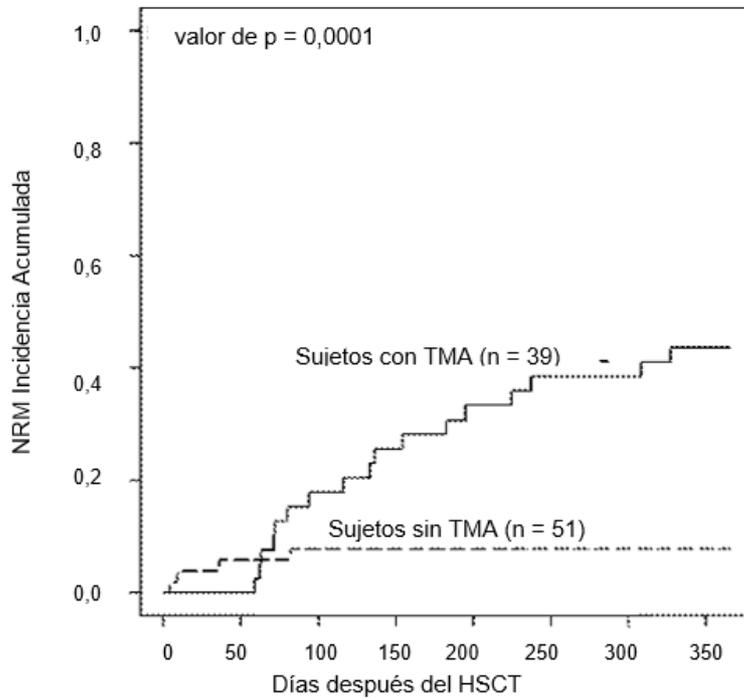


Figura 2

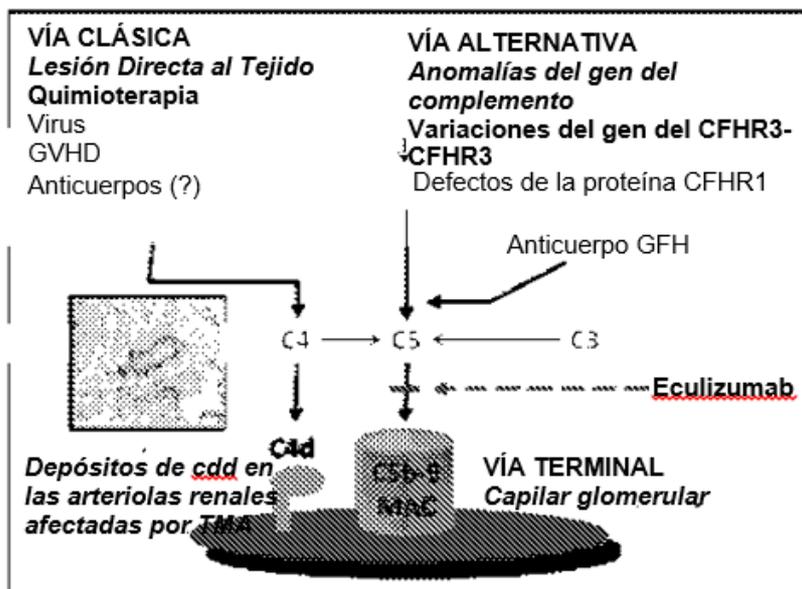


Figura 3

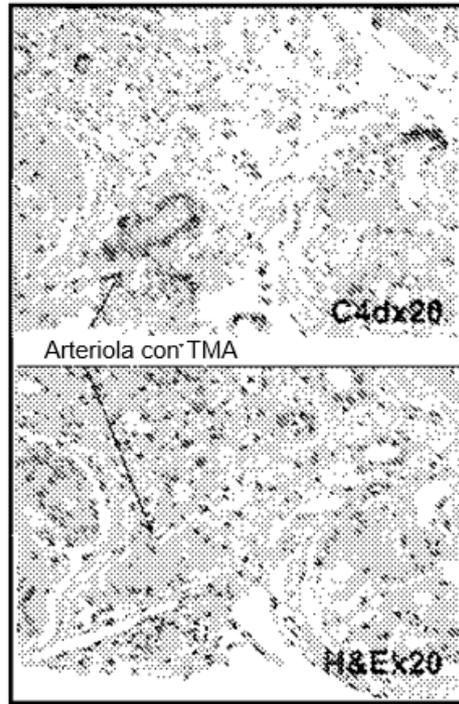


Figura 4.

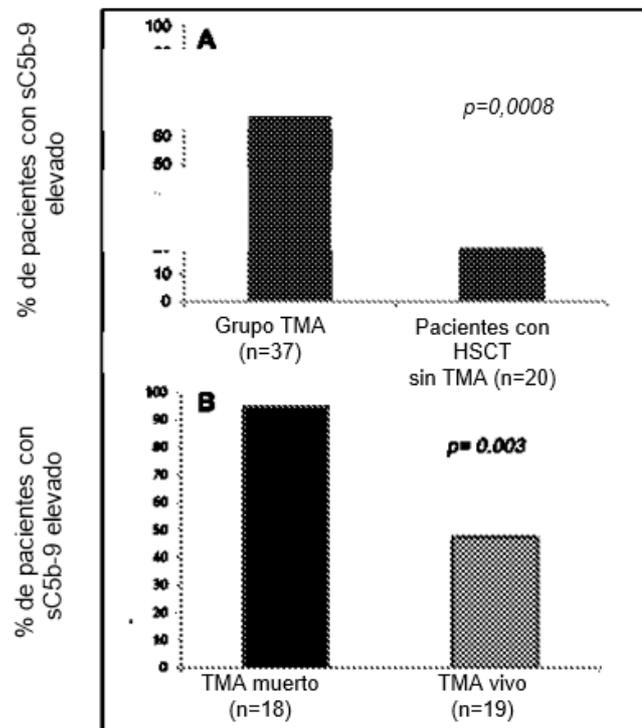


Figura 5

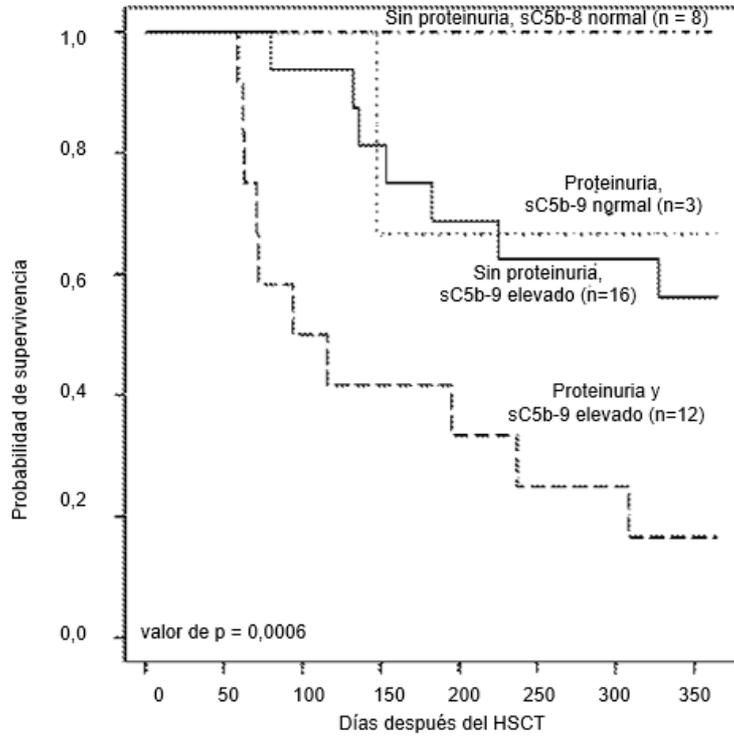


Figura 6

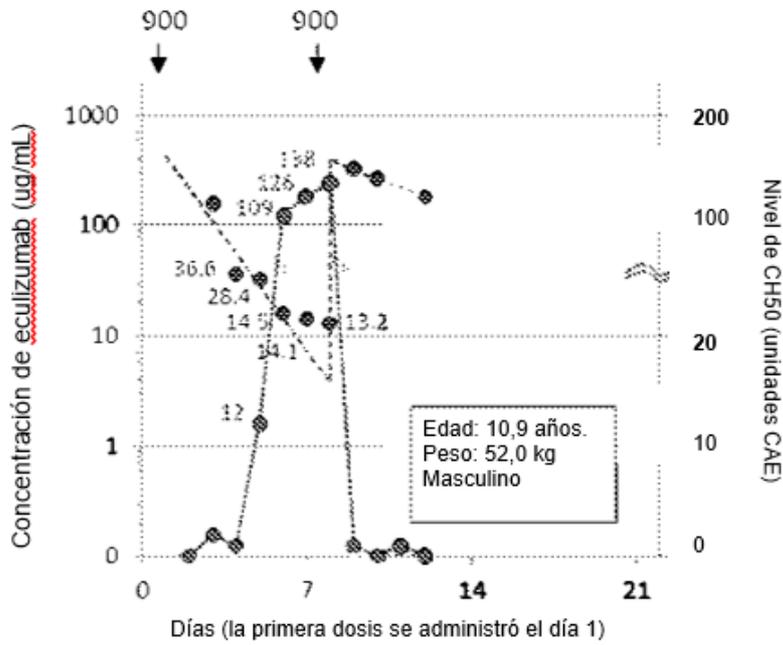


Figura 7

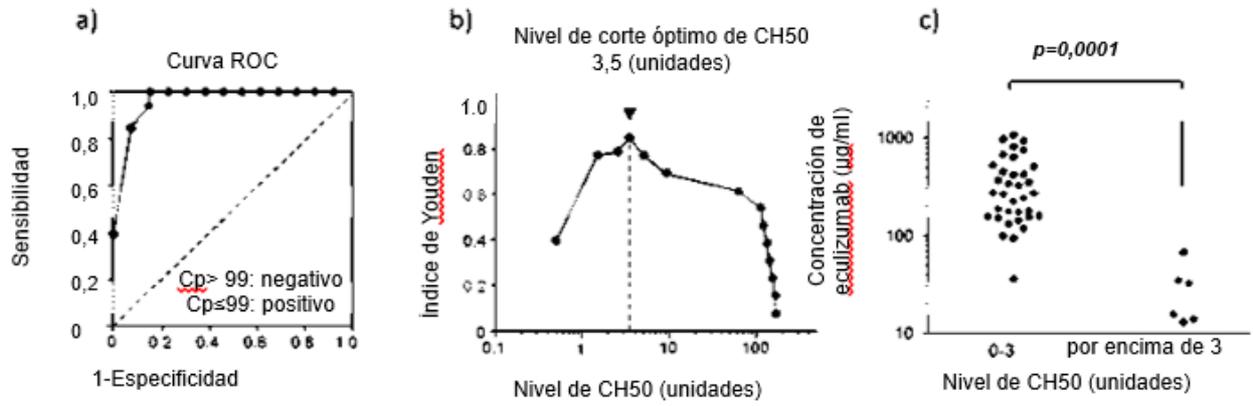


Figura 8a)

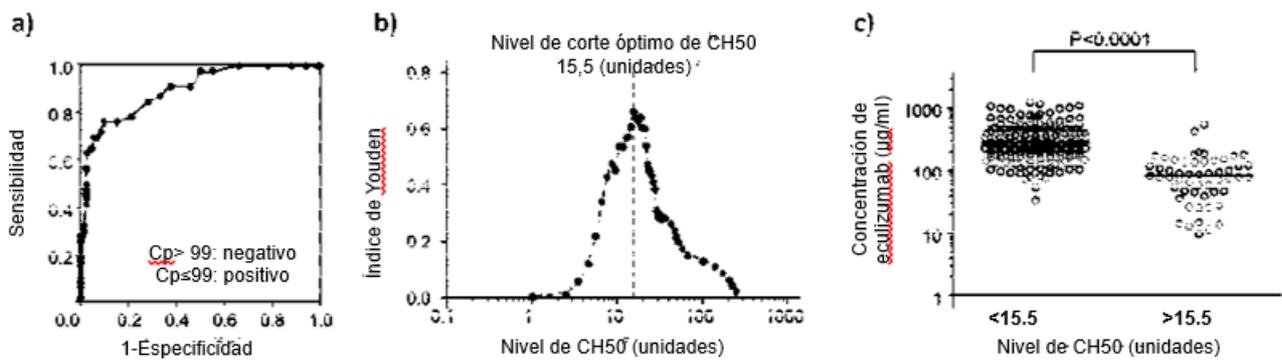


Figura 8b

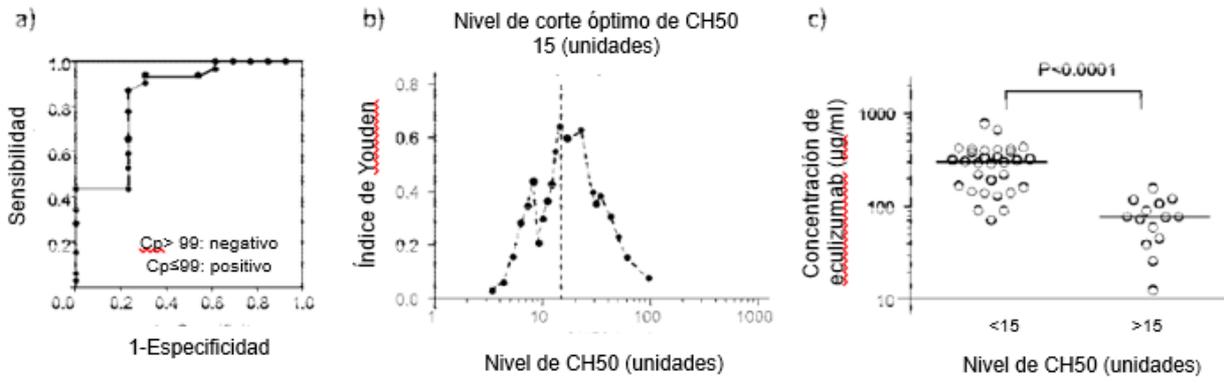


Figura 9

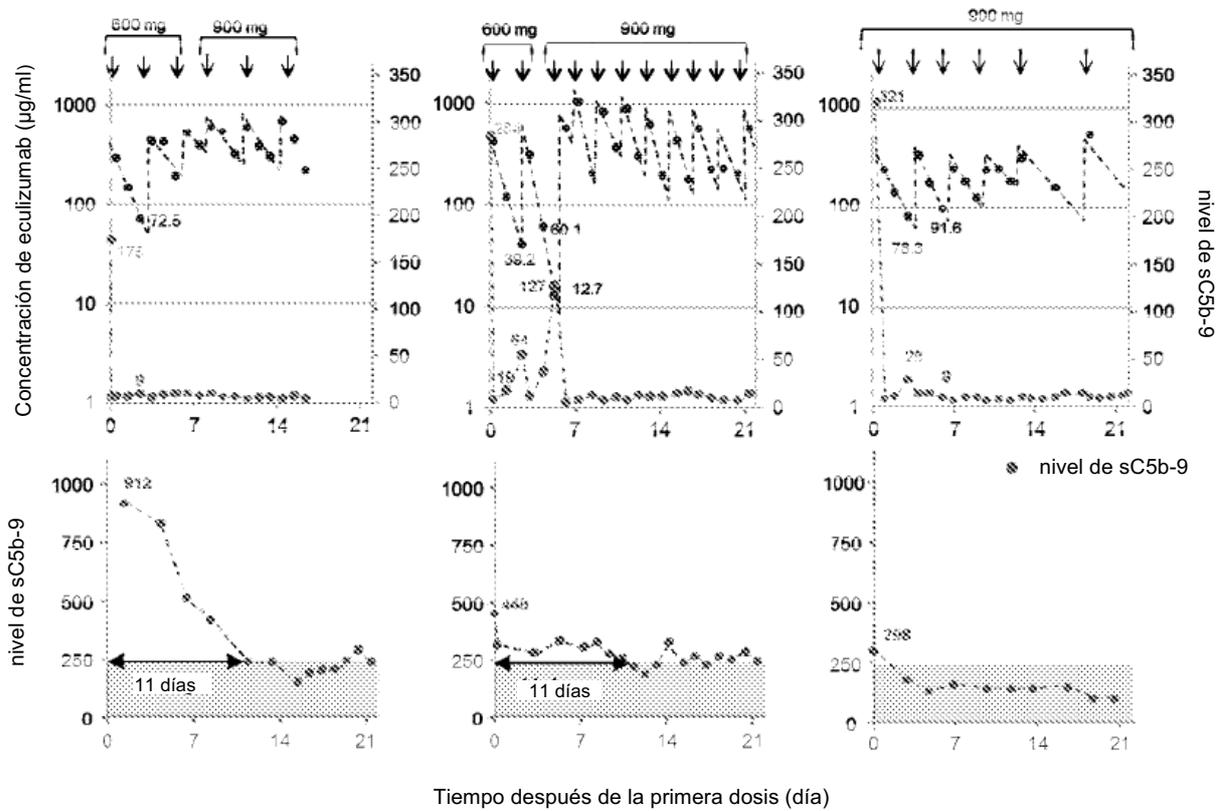
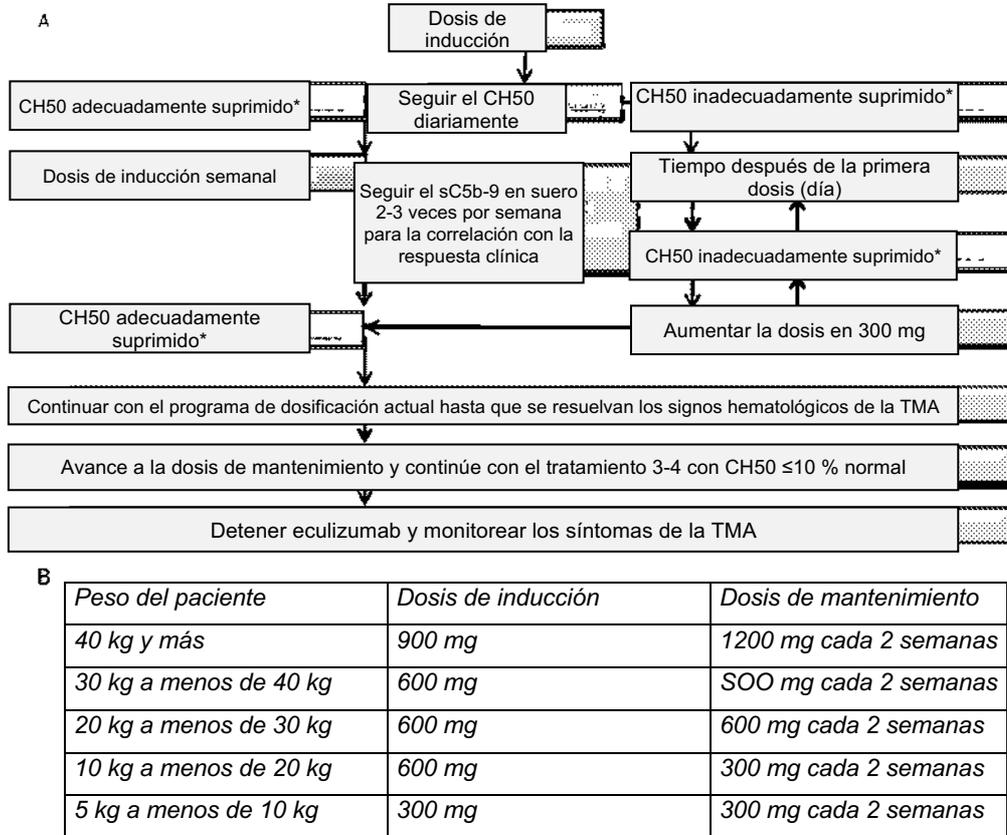


Figura 10



\*la supresión adecuada de CH50 es 0-3 por la prueba de inmunoensayo enzimático o 0-15 por la prueba de hemólisis.

NOTA: Si el paciente recibe un intercambio terapéutico de plasma (TPE), este procedimiento debe interrumpirse antes de comenzar la terapia con eculizumab para no eliminar el medicamento de la sangre.