



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina y Psiquiatría

**PREDICCIÓN DE LAS COMPLICACIONES DE ORIGEN ENDOTELIAL
EN LA TERAPIA CELULAR**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTORA EN MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
PRESENTADA POR**

Miriam Sánchez Escamilla

Bajo la dirección de los Doctores

Lucrecia Yáñez San Segundo

Miguel Ángel Perales

Santander, 2023



Dra. **LUCRECIA YÁÑEZ SAN SEGUNDO**, Profesora Asociada de Ciencias de la Salud en la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICA:

que el trabajo titulado “**Predicción de las complicaciones de origen endotelial en la terapia celular**” presentado por

Dña. **MIRIAM SÁNCHEZ ESCAMILLA**

para optar al grado de **DOCTORA EN MEDICINA** ha sido realizado bajo su dirección.

Y para que conste y surta a efectos oportunos, firmo el presente certificado en Santander, 17 de Julio de 2023.

Fdo.



Dra. **MIGUEL ANGEL PERALES**, Profesora Titular del departamento de Medicina en la Universidad "*Weill Cornell Medical College*",

CERTIFICA:

que el trabajo titulado "**Predicción de las complicaciones de origen endotelial en la terapia celular**" presentado por

Dña. **MIRIAM SÁNCHEZ ESCAMILLA**

para optar al grado de **DOCTORA EN MEDICINA** ha sido realizado bajo su dirección.

Y para que conste y surta a efectos oportunos, firmo el presente certificado en Nueva York, 17 de Julio de 2023.

Fdo.

Una firma manuscrita en tinta azul que parece corresponder a Miguel Ángel Perales.

A **Dani**, por aparecer y ser *luz*.

AGRADECIMIENTOS

A mis **padres y hermano**, por ser mi *hogar*.

A mis **abuelos** por cuidarme y enseñarme a *cuidar*.

A mis **amigas y amigos** por ser *familia*.

A mis **compañeras de La Décima** por hacerme *reír* en los días buenos y en los no tan buenos.

A mi **servicio** por *confiar* en mí.

A **Lucrecia y Miguel Ángel** por ser pacientes, *enseñarme* a escribir y dedicarme tantas horas de su tiempo.

A **Arancha**.

TABLA DE CONTENIDOS

1. SIGLAS Y ABREVIATURAS	13
2. MOTIVACIÓN DE LA TESIS	15
3. INTRODUCCIÓN AL TEMA	17
3.1. TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS (TPH)	17
3.1.1. Historia del trasplante	17
3.1.2. Tipos de trasplante de médula	19
3.1.3. Trasplante en la actualidad	20
3.1.4. Retos del trasplante	21
3.2. CÉLULAS CAR-T	23
3.2.1. Desarrollo y aparición de la terapia CAR-T	23
3.2.2. CAR-T en la actualidad	23
3.2.3. Retos de la terapia CAR-T	26
3.3. DAÑO ENDOTELIAL	27
3.3.1. Endotelio y disfunción endotelial	27
3.3.2. Activación y daño de las células endoteliales en el TPH	28
3.3.3. Causas	30
4. PRINCIPALES COMPLICACIONES DE ORIGEN ENDOTELIAL	31
4.1. COMPLICACIONES POST TRASPLANTE	31
4.1.1. Complicaciones de origen endotelial post-TPH	31
4.1.2. Fisiopatogenia de los síndromes de origen endotelial	33
4.2. COMPLICACIONES POST TERAPIA CAR-T	35
4.2.1. Síndrome de liberación de citocinas (SLC)	35
4.2.2. Neurotoxicidad	37
5. IMPACTO DE LA FÓRMULA EASIX EN EL TRASPLANTE Y LA TERAPIA CELULAR	41
5.1. FÓRMULA EASIX (<i>Endothelial Activation and Stress Index</i>)	41
5.1.1. Origen de la fórmula	41
5.1.2. Estudios que analizan EASIX en la predicción del daño endotelial	42
5.2. EASIX EN LA PREDICCIÓN DE EICR Y DE LOS RESULTADOS POST-TRASPLANTE ALOGÉNICO	43
5.2.1. Justificación del manuscrito número 1	43
5.3. EASIX EN LA PREDICCIÓN DE SÍNDROME DE LIBERACIÓN DE CITOCINAS E ICANS	44
5.3.1. Justificación del manuscrito número 2	44
6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS DE LOS ESTUDIOS	45

6.1.	MANUSCRITO 1: LA FÓRMULA EASIX PREDICE UNA MENOR SUPERVIVENCIA TRAS EL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.	45
6.2.	MANUSCRITO 2: EASIX MODIFICADO PREDICE EL SÍNDROME DE LIBERACIÓN DE CITOCINAS GRAVE Y LA NEUROTOXICIDAD TRAS EL TRATAMIENTO CON CÉLULAS CAR-T.	46
7.	RESULTADOS	47
7.1.	7.1. LA FÓRMULA EASIX PREDICE UNA MENOR SUPERVIVENCIA TRAS EL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.	47
7.1.1.	Diseño del estudio:	47
7.1.2.	Análisis estadístico	48
7.1.3.	Resultados:	49
7.2.	EASIX MODIFICADO PREDICE EL SÍNDROME DE LIBERACIÓN DE CITOCINAS GRAVE Y LA NEUROTOXICIDAD TRAS EL TRATAMIENTO CON CÉLULAS CAR-T.	61
7.2.1.	Diseño del estudio	61
7.2.2.	Análisis estadístico	61
7.2.3.	Resultados	62
8.	DISCUSIÓN	85
8.1.	SOBRE EL PRIMER MANUSCRITO DE LA TESIS	86
8.2.	SOBRE EL SEGUNDO MANUSCRITO DE LA TESIS	87
8.3.	ESTUDIOS DE VALIDACIÓN DE EASIX Y PERSPECTIVAS DE FUTURO	89
9.	CONCLUSIONES	93
9.1.	MANUSCRITO NÚMERO 1	93
9.2.	MANUSCRITO NÚMERO 2	93
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
11.	FIGURAS Y TABLAS	105

1. SIGLAS Y ABREVIATURAS

Alo-TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico
Auto-TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos autólogo
BHE	Barrera hematoencefálica
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CE	Célula endotelial
CLS	<i>Capillary leak syndrome</i>
CNI	Inhibidor de la calcineurina
Cr	Creatinina
EASIX	<i>Endothelial activation and stress index</i>
EASIX-d0	EASIX-día 0
EASIX-d100	EASIX-día 100
EASIX-d30	EASIX-día 30
EASIX-F	EASIX-Ferritina
EASIX-FC	EASIX-Ferritina y PCR
EASIX-GVHD	<i>EASIX-Graft versus host disease</i>
EASIX-pre	EASIX-pretrasplante
EICR	Enfermedad injerto contra receptor
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMO	Fallo multiórgano
FVW	Factor de Von Willebrand
G-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas
HAD	Hemorragia alveolar difusa
HCT-CI	<i>Hematopoietic Comorbidity Index</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IA	Incidencia acumulada
IC	Intervalo de confianza
ICAM-1	<i>Intercellular Cell Adhesion Molecule 1</i>
ICANS	<i>Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome</i>
ICT	Irradiación corporal total
IEC	<i>Immune effector cell</i>
IFN-gamma	Interferón gamma
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6

IPS	<i>Idiopathic pneumonia syndrome</i>
IR	Intensidad reducida
LAL-B	Leucemia aguda linfoblástica B
LBDCG	Linfoma B difuso de células grandes
LCM	Linfoma de células del manto
LDH	Lactato deshidrogenasa
LF	Linfoma folicular
LNH-B	Linfoma no Hodgkin B
MAT	Microangiopatía trombótica
m-EASIX	EASIX modificado
MM	Mieloma múltiple
MO	Médula Ósea
MRT	Mortalidad relacionada con el trasplante
NMA	No mieloablativo
NRM	Mortalidad no relacionada con recaída
PRES	<i>Posterior reversible encephalopathy syndrome</i>
RC	Remisión completa
RMN	Resonancia magnética nuclear
RP	Remisión parcial
s-EASIX	EASIX simplificado
SG	Supervivencia global
SI	Síndrome del implante
SLC	Síndrome de liberación de citocinas
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SOS	Síndrome de obstrucción sinusoidal
SP	Sangre Periférica
ST2	Supresor de tumorigénesis 2
TCA	Terapia celular adoptiva
TM	Trombomodulina
TNF-alfa	Factor de necrosis tumoral alfa
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
VCAM-1	<i>Vascular Cell adhesion molecule 1</i>

2. MOTIVACIÓN DE LA TESIS

Puede que en ocasiones no seamos capaces de ver nuestro futuro, por ello, siempre hay otras personas que nos acompañan y que, por suerte, nos visionan dentro de unos años y nos motivan a lo largo del recorrido. Mi tesis empezó en noviembre de 2016 mientras rotaba de *observer* en el **Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC)** de Nueva York y el **Dr. Perales** me preguntó si quería volver allí para pasar unos años investigando con ellos. En ese momento no fui consciente, pero desde aquella entrevista, tuve la inquietud constante por regresar.

Gracias al **Servicio de Hematología del Hospital Marqués de Valdecilla**, dos años más tarde yo estaba allí, investigando en uno de los hospitales más importantes del mundo, viviendo en Nueva York de nuevo, ciudad a la que siempre volveré. Sin embargo, mi interés en el trasplante de médula ósea empezó mucho antes, en el último año de carrera, durante mis prácticas, en las que tuve la suerte de poder conocer la unidad de trasplante del **Hospital Morales Meseguer (Murcia)**. Ellos son los culpables de que, a día de hoy, siga viendo pacientes trasplantados en mi día a día.

Mi amor por la hematología se lo debo a mis compañeras de servicio, en especial a Arancha, a todo el personal de “**La 10ª planta**” de Valdecilla y a nuestros **pacientes**. Durante mi residencia fui aprendiendo todo lo que pude sobre trasplante de médula, de la mano de **la Dra. Bermúdez y la Dra. Yáñez**, pude también aprender a manejar bases de datos, a escribir mis primeros *abstracts* y a participar en los primeros congresos. Las preguntas durante los pases de planta del **Dr. Richard** también hicieron lo suyo.

Gracias al contrato post-MIR **López-Albo-Wenceslao** del instituto de investigación Valdecilla (IDIVAL) pude desarrollar durante dos años mi labor como investigadora

clínica en el hospital MSKCC y después en mi hospital, Valdecilla. Bajo la supervisión del Dr. Perales y la Dra. Yáñez, pude participar en diferentes trabajos de investigación durante mi estancia en Nueva York, todos ellos en pacientes post-trasplante o post-terapia CAR-T, que en ese momento (2018) empezaba a utilizarse fuera de nuestro país.

El desarrollo de estrategias de mejora en la terapia celular nos ofrece un mejor conocimiento y manejo de las **complicaciones asociadas a estos tratamientos**, entre las cuales se incluyen el **daño endotelial** y sus distintas manifestaciones. Poder ser capaces de mejorar el pronóstico de nuestros pacientes conociendo mejor sus complicaciones fue uno de los principales motivos que hicieron posible los trabajos desarrollados en esta tesis doctoral.

Espero ser capaz de plasmar en las siguientes páginas mi pasión por el trasplante y la terapia celular, y poder agradecer de esta forma todo el conocimiento que mis mentores han compartido conmigo.

3. INTRODUCCIÓN AL TEMA

3.1. TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS (TPH)

3.1.1. Historia del trasplante

Para empezar a hablar de trasplante necesitamos conocer al Profesor Edward Donnall Thomas (Mart, Texas 1920 – Seattle, Washington, 2012) considerado el “padre del trasplante de médula”. Sus primeros estudios, desarrollados en modelos caninos¹, supusieron los inicios del trasplante de médula ósea. No obstante, el camino no sería fácil, dado que aún desconocían la importancia de la compatibilidad genética entre receptores y donantes definida a finales de los años 50 gracias al descubrimiento del sistema de compatibilidad del antígeno leucocitario humano (HLA)^{2,3} lo cual le valió a B. Benacerraf, J. Dausset y G. Snell⁴ el premio Nobel de Fisiología y Medicina⁵.

Los primeros trasplantes hasta los años 80 fueron extremadamente complicados y se asociaron a una alta mortalidad por múltiples causas. El Profesor ED. Thomas recibió el Nobel en 1990 por su investigación en el campo del trasplante de médula, a los 70 años de edad, ya retirado de la atención a los pacientes⁶⁻⁸. A partir de los años 70, la supervivencia tras el trasplante fue incrementándose (de un 10-15% hasta un 60-70%) sobre todo tras conseguir una mejor selección de los pacientes candidatos al procedimiento (menor carga tumoral y mejor estado basal)⁸. Posteriormente, se han publicado estudios que demuestran cómo ha ido mejorando la probabilidad de sobrevivir a un trasplante de médula gracias no sólo a la mejor selección del paciente sino a la adaptación de cada trasplante a las características del paciente y de su enfermedad⁹ (figura 1).

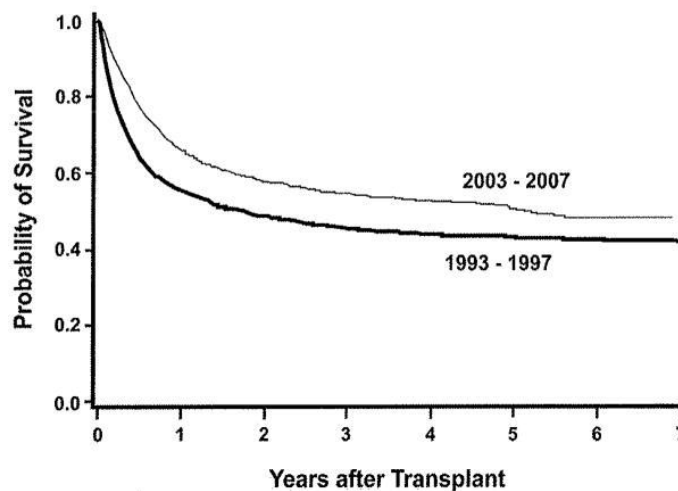


Figura 1: Probabilidad de supervivencia tras un trasplante alogénico.

Fuente: Gooley, T. A et al. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. The New England journal of medicine, 363(22), 2091–2101⁹.

En 2010 se publica un estudio del hospital *Fred Hutchinson Cancer Research Center* (FHCRC), centro pionero en el trasplante de médula⁹(figuras 1 y 2). En este estudio se analizaron 1148 pacientes que recibieron un primer trasplante alogénico en el centro y se dividieron en 2 períodos: 1993-1997 y 2003-2007. Realizaron un análisis de mortalidad comparando ambos periodos temporales, objetivando un claro descenso de la mortalidad (figura 2), junto con un descenso de las infecciones y las tasas de EICR⁹.

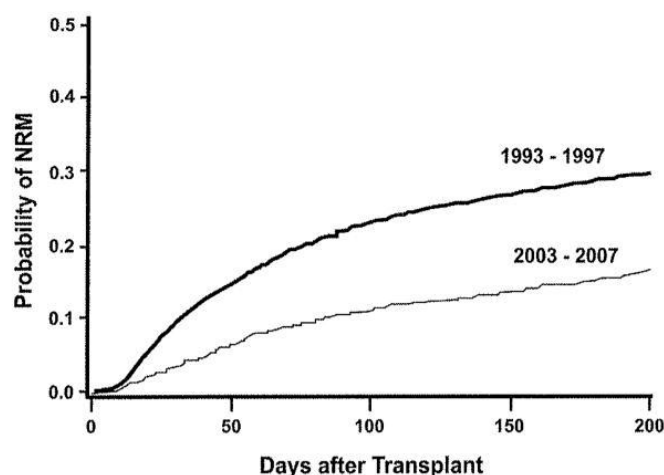


Figura 2: Probabilidad de muerte no relacionada con la recaída (NRM) al día 200 del trasplante alogénico.

Fuente: Gooley, T. A et al. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. The New England journal of medicine, 363(22), 2091–2101⁹.

Durante estas décadas, múltiples cambios en el trasplante han contribuido a mejorar los resultados del procedimiento. Los más importantes han sido, además de una mejor selección del paciente como ya se ha comentado, una reducción en la intensidad de los regímenes de acondicionamiento ajustando las dosis de fármacos como la ciclofosfamida y limitando las dosis de radioterapia. Además, se ha avanzado en un mejor conocimiento de las complicaciones relacionadas con el trasplante como son la enfermedad injerto contra receptor (EICR) o las infecciones⁹.

3.1.2. Tipos de trasplante de médula

En cuanto a los tipos de TPH, en función del origen de las células hematopoyéticas se establecen principalmente dos tipos: los que utilizan células del propio paciente: TPH autólogo (Auto-TPH); y los que requieren de la selección de un donante para la recolección de las células: TPH alogénico (Alo-TPH). La selección de la fuente de progenitores hematopoyéticos (médula ósea [MO] o sangre periférica [SP]), el grado de compatibilidad con el donante seleccionado (familiar, no emparentado, idénticos o dispares), la intensidad del acondicionamiento pre-trasplante (mieloablativo, no mieloablativo o de intensidad reducida [IR]) y la profilaxis frente a la EICR utilizados, son los principales factores a tener en cuenta para el éxito del TPH como estrategia curativa¹⁰.

En 2012 se publica un importante estudio que compara las principales fuentes de progenitores en el trasplante alogénico (MO y SP)¹¹. Se analizaron un total de 551 pacientes en 48 centros americanos sin observar diferencias en cuanto a la supervivencia en función de la fuente de progenitores. En los análisis exploratorios se observó que la fuente de SP podría reducir el riesgo de fallo de implante y que la MO podría reducir la aparición de EICR crónica. En el Alo-TPH además de la selección de la fuente es importante la selección del mejor donante compatible para el paciente^{12,13}. Podemos tener donantes familiares o donantes no emparentados, estos últimos proceden de los registros de donantes de médula, en nuestro país se encuentra el Registro de Donantes de Médula (REDMO).

3.1.3. Trasplante en la actualidad

En las últimas décadas, el uso del TPH se ha incrementado progresivamente posicionándose como la única estrategia curativa para múltiples enfermedades hematológicas. Durante el año 2019 se reportaron datos de 51 países de Europa y países colaboradores, registrados por EBMT (*European Society for Blood and Marrow Transplantation*)¹⁴(figura 3). En 2019 se realizaron un total de 48.512 trasplantes en 43.581 pacientes, 19.798 trasplantes alogénicos (41%) y 28.714 trasplantes autólogos (59%). Las principales indicaciones fueron enfermedades hematológicas mieloides 10.764 (25%), linfoides 27.895 (64%), y enfermedades no neoplásicas 3173 (7%). Desde 1990 a 2019, se observó un significativo aumento en el número de centros que reportaron datos a EBMT (143 vs. 700)¹⁴.

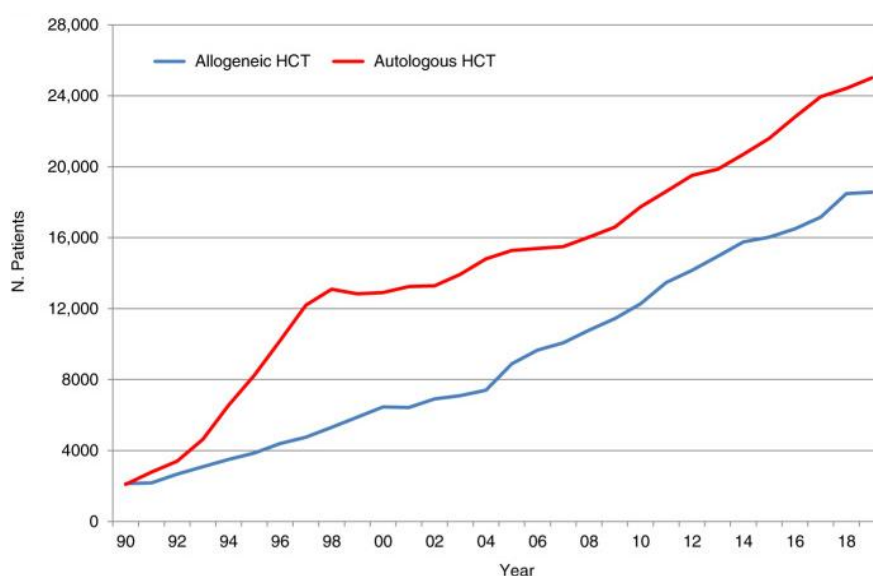


Figura 3: Datos de TPH del registro EBMT desde 1999 hasta 2019. Número de pacientes que reciben un trasplante autólogo o alogénico.

Fuente: Passweg, J. R et al. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy survey of the EBMT: monitoring of activities and trends over 30 years. *Bone marrow transplantation*, 56(7), 1651–1664¹⁴.

En cuanto a los datos de la última revisión del CIBMTR (*Center for International Blood and Marrow Transplant Research*) en el año 2021 se realizaron más de 8.000 trasplantes alogénicos y en torno a 12.000 trasplante autólogos (figura 4). Comparando los datos con el siglo anterior, vemos que se ha multiplicado por dos el número de Alo-TPH y casi por tres el número de Auto-TPH¹⁵.

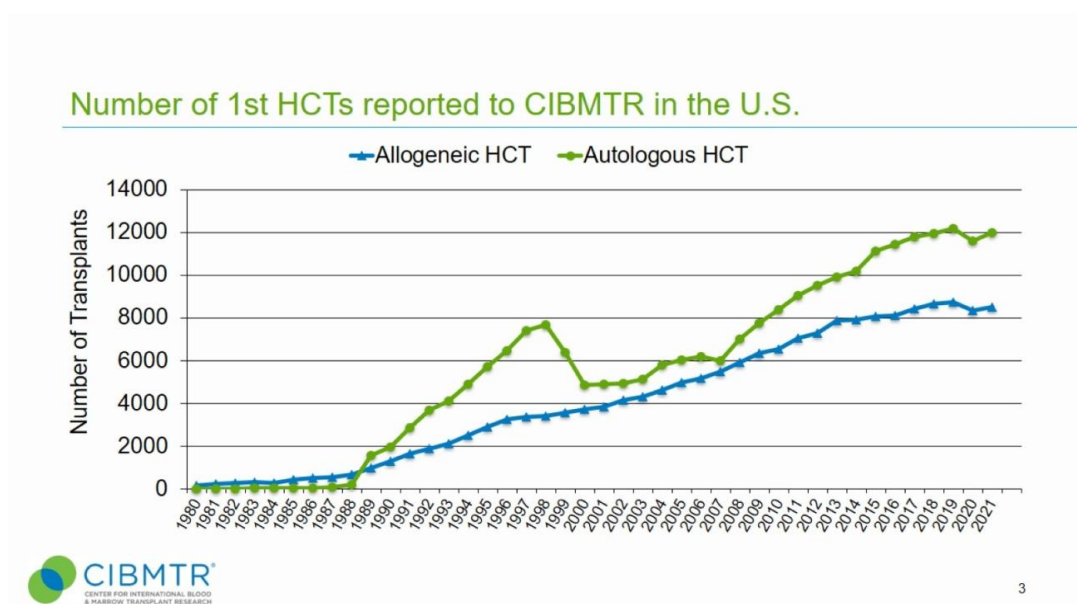


Figura 4: Datos anuales en TPH del CIBMTR.

Fuente: Annual report CIBMTR 2022¹⁵

En cuanto a los resultados del trasplante, la última actualización del CIBMTR muestra un claro incremento no sólo en las cifras de trasplantes realizados sino también en las tasas de supervivencia, tanto en pacientes adultos como en pacientes pediátricos y adultos jóvenes¹⁶.

3.1.4. Retos del trasplante

A pesar de los avances en el TPH, hay una tasa de pacientes que fallece tras el mismo, principalmente debido a recaída o progresión de la enfermedad hematológica o por muerte relacionada con el trasplante (MRT) o mortalidad no relacionada con recaída (NRM)^{9,17}. Los intentos por mejorar el manejo de las diferentes complicaciones post-TPH van enfocados principalmente a disminuir la tasa de recaída y MRT o NRM, mejorando las estrategias de profilaxis antibiótica, anticipación del tratamiento de algunas infecciones (citomegalovirus o

aspergilosis), manejo riguroso de las toxicidades asociadas a fármacos (microangiopatía, daño renal o cardiotoxicidad) y mejoras en el manejo y el tratamiento de la enfermedad injerto contra receptor (EICR) en su forma aguda o crónica^{9,13}(figura 5).

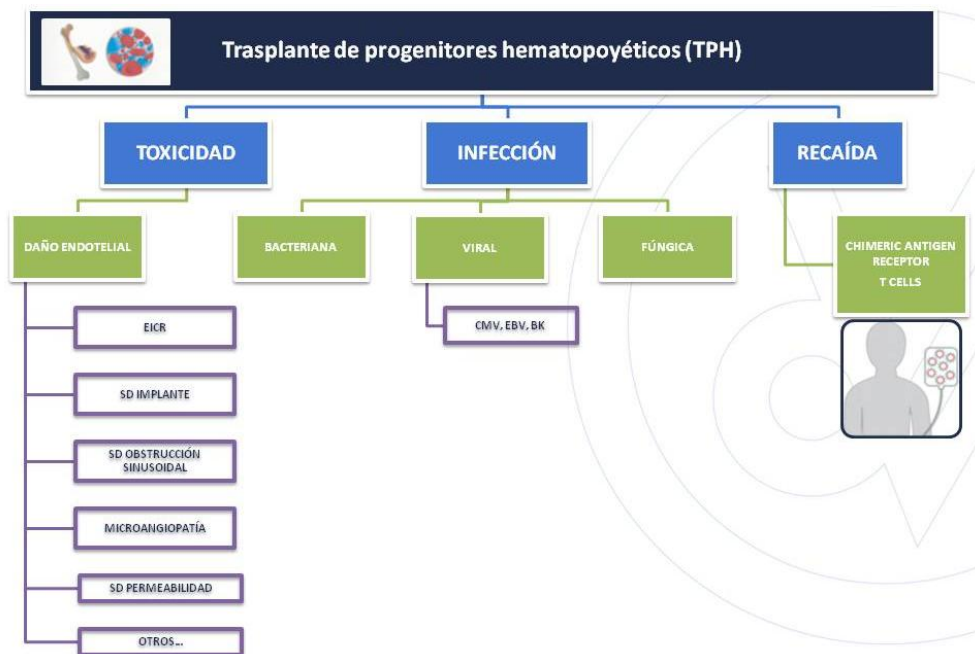


Figura 5: Retos del TPH

Fuente: Realizada por la Dra. Sánchez Escamilla, adaptado de: E. Carreras, C. Dufour, M. Mohty, and N. Kröger, "The EBMT Handbook," *Hematop. stem cell Transplant. Cell. Ther.*, pp. 1–688, 2019¹³.

Otro de los retos del trasplante alogénico es la disponibilidad de un donante compatible con el paciente. En la mayoría de casos, el paciente puede disponer de un donante familiar (idéntico o haploidéntico) o de lo contrario, podría disponer de un donante no emparentado (compatible o dispar)¹⁸. En el caso de los pacientes con diversidad racial, la búsqueda de un donante compatible suele ser más complicada que en el resto de situaciones. No obstante, estos pacientes, cada vez pueden acceder a mejores prestaciones sanitarias lo cual conlleva un aumento en el número de trasplantes realizados. El empleo de plataformas de trasplante con donantes alternativos como es el caso del trasplante haploidéntico y el uso de la ciclofosfamida post-trasplante, ha supuesto una mejora en la accesibilidad al trasplante para muchos pacientes¹⁹.

3.2. CÉLULAS CAR-T

3.2.1. Desarrollo y aparición de la terapia CAR-T

En los últimos años, los avances en ingeniería celular nos han permitido modificar genéticamente a los linfocitos T del propio paciente para que estos puedan atacar a las células tumorales. Los linfocitos son seleccionados y modificados en el laboratorio para expresar en su membrana celular el receptor de antígeno quimérico (CAR, *chimeric antigen receptor*) específico, contra un determinado antígeno tumoral. Con este tratamiento los resultados en diferentes enfermedades hematológicas refractarias han supuesto una revolución en este campo. Actualmente las células CAR-T están aprobadas y financiadas en nuestro país para pacientes con leucemias agudas linfoblásticas B (LAL-B) o linfomas no Hodgkin B (LNH-B). En un futuro próximo se prevé la aprobación también para otras enfermedades hematológicas como el mieloma múltiple (MM). No obstante, la manipulación del sistema inmune secundaria al tratamiento con células CAR-T ocasiona efectos secundarios que, en algunos casos, amenazan la vida del paciente. Estos efectos secundarios son fundamentalmente el síndrome de liberación de citocinas (SLC) y el ICANS por sus siglas en inglés (*Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome*)²⁰.

3.2.2. CAR-T en la actualidad

A finales del año 2017, las agencias reguladoras de medicamentos en Europa y Estados Unidos (*European Medicines Agency* [EMA] y *Food and Drug Agency* [FDA]) aprobaron el uso de los primeros dos medicamentos CAR-T comerciales. Tisagenlecleucel (Kymriah®, Novartis) está indicado para pacientes de hasta 25 años con LAL-B en recaída o refractaria a más de 2 líneas de tratamiento o en pacientes mayores de 18 años con LNH-B en recaída o refractarios a más de 2 líneas de tratamiento, los resultados del ensayo clínico ELIANA²¹ dieron lugar a su aprobación en LAL-B y los del ensayo JULIET²² a su aprobación en LNH-B. Por otra parte, axicabtagene ciloleucel (Yescarta®, Kite-Gilead) recibió la indicación también

para pacientes mayores de 18 años con LNH-B (incluyendo linfoma mediastínico primario) en recaída o refractarios a más de 2 líneas de tratamiento, en base a los resultados del ensayo ZUMA-1²³. Tras los dos primeros medicamentos CAR-T aprobados, fueron apareciendo más estudios positivos para aprobación de diferentes tipos de CAR-T en otras enfermedades hematológicas como el MM^{24,25} (tabla 1).

Fármaco	Tisa-Cel	Axi-Cel	Liso-Cel	Brexu-Cel	Ide-Cel	Cilta-Cel
Diana	CD19	CD19	CD19	CD19	BCMA	BCMA
Indicación	LAL-B y LBDCG	LBDCG y Folicular	LBDCG	LCM y LAL-B	Mieloma	Mieloma
Ensayo pivotal	ELIANA JULIET	ZUMA-1 ZUMA-5	TRANSCEND	ZUMA-2 ZUMA-3	KARMMA	CARTITUDE
Transducción Transfección	Lentivirus	Retrovirus	Lentivirus	Retrovirus	Lentivirus	Lentivirus
Dominio transmembrana	CD8α	CD28	CD28	CD28	CD8α	CD8α
Dominio co- estimulador	4-1BB	CD28	4-1BB	CD28	4-1BB	4-1BB
Dominio de activación	CD3ζ	CD3ζ	CD3ζ	CD3ζ	CD3ζ	CD3ζ
Autorización	AEMPS EMA FDA	AEMPS EM FDA	EMA FDA	EMA FDA	EMA FDA	EMA FDA

Tabla 1: Tipos de CAR-T comerciales aprobados por AEMPS/EMA/EMA en el tratamiento de diferentes enfermedades hematológicas.

Fuentes:

- Artículos (Locke et al. The lancet 2019²⁶, Jacobson et al. The Lancet 2021^{27,28}, Locke et al, NEJM 2022²⁹, Abramson et al. The Lancet 2020³⁰, Kamdar et al. The Lancet 2020³¹, Wang et al. NEJM 2020³², Shah et al. The Lancet 2021³³, Maude et al NEJM 2018²¹, Schuster et al NEJM 2019²², Fowler et al. Nat Med 2022³⁴, Munshi et al. NEJM 2021²⁴ y Berdeja et al. Lancet 2021²⁵)
- Páginas Web (<https://www.aemps.gob.es/>, <https://www.ema.europa.eu/en>, <https://www.fda.gov/>).

En el año 2016 el CIBMTR inició un registro de datos de todos los pacientes tratados con terapia CAR-T con el objetivo de obtener un registro similar al de TPH y poder analizar así los resultados de estos pacientes a largo plazo³⁵ (figuras 6 y 7). A día de hoy, existen seis CAR-T comerciales aprobados en Estados Unidos (EEUU) para el tratamiento de cinco enfermedades hematológicas (linfoma B difuso de células grandes [LBDCG]^{22,27,30}, linfoma de células del manto [LCM]³², linfoma folicular [LF]^{28,34}, LAL-B^{21,36} y MM^{24,25}).

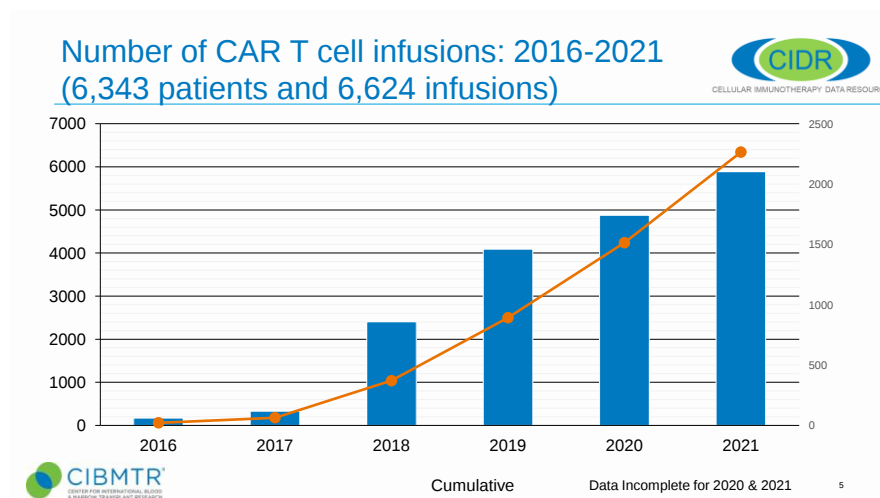


Figura 6: Número de infusiones CAR-T de 2016 a 2021 en EEUU.

Fuente: Current uses of CAR T cell Therapies in the US: CIDR summary slides, 2021. Available at: <http://www.cibmtr.org>³⁵

Dentro de las neoplasias hematológicas, las CAR-T comerciales tienen en el LNH-B su principal indicación a día de hoy, no obstante, se ha evidenciado un auge sobretodo en LCM y LF debido a las nuevas aprobaciones de esta terapia. En el año 2021 se realizaron en EEUU más de 2000 infusiones de células CAR-T. El incremento exponencial que se observa en las figuras 6 y 7 es sólo el inicio de la terapia CAR-T en la medicina moderna, dado que a día de hoy estos tratamientos se empiezan a utilizar también en otras especialidades fuera de la hematología como son la oncología o la reumatología.

Commercial CAR T cell Indications Annually: 2017-2021

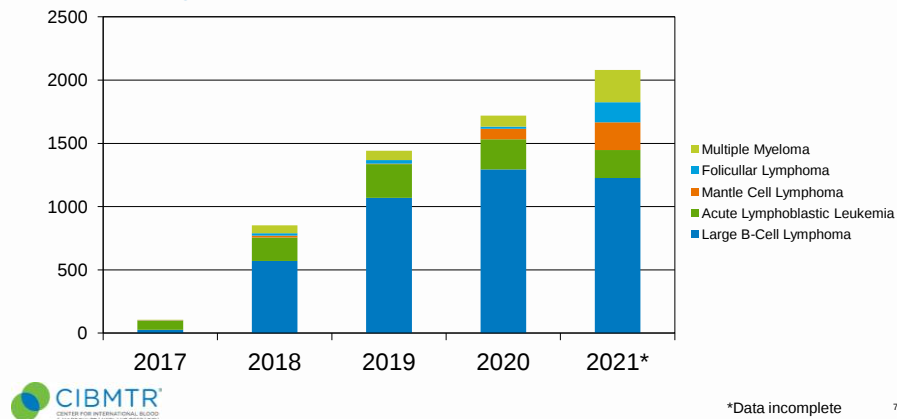


Figura 7: Indicación por tipo de enfermedad de la terapia CAR-T.

Fuente: Current uses of CAR T cell Therapies in the US: CIDR summary slides, 2021. Available at: <http://www.cibmtr.org>³⁵

3.2.3. Retos de la terapia CAR-T

A pesar de haber supuesto una revolución médica, la terapia CAR-T aún se trata de un tratamiento con menos de dos décadas de experiencia y con varios retos que van a condicionar el desarrollo de estos tratamientos en los próximos años. En primer lugar, las tasas de respuesta obtenidas en muchos casos no consiguen ser duraderas en el tiempo, provocando que el paciente recaiga tras el tratamiento y probablemente fallezca a causa de la enfermedad. En este caso, el desarrollo de nuevos modelos de CAR-T de tercera y cuarta generación, está suponiendo un reto de investigación que pronto podría dar resultados clínicos en este tipo de enfermedades^{37,38}.

Por otro lado, la terapia CAR-T no está exenta de complicaciones como el SLC y el ICANS que en ocasiones pueden ser graves e incluso mortales para los pacientes³⁹. Por lo tanto, intentar anticiparnos al desarrollo de complicaciones graves en estos tratamientos es fundamental para mejorar el pronóstico de nuestros pacientes.

3.3. DAÑO ENDOTELIAL

3.3.1. Endotelio y disfunción endotelial

El endotelio está compuesto por una fina capa mononuclear de células endoteliales (CE) que tiene como objetivo separar el torrente sanguíneo de los otros tejidos celulares. El endotelio de los vasos sanguíneos atraviesa cada uno de los tejidos realizando funciones estructurales únicas. Esto refleja la gran heterogeneidad que presentan la superficie endotelial de nuestro organismo y convierte al endotelio en un sistema muy complejo⁴⁰.

El endotelio es un órgano resiliente, debido a su constante capacidad de adaptación a los cambios del entorno, modulando el tono vascular, regulando el balance homeostático y participando en las diferentes reacciones inflamatorias⁴¹. La disfunción del endotelio ha sido asociada a múltiples enfermedades como por ejemplo la obesidad⁴², la enfermedad renal crónica⁴³ o la sepsis⁴⁴.

Durante el TPH las CE pueden verse dañadas por la quimioterapia previa al trasplante o durante el régimen de acondicionamiento, por citocinas proinflamatorias producidas en tejidos dañados, por translocación de endotoxinas bacterianas a través del tracto intestinal inflamado y por algunos fármacos utilizados durante el trasplante (como el factor estimulante de colonias de granulocitos [G-CSF], los inhibidores de la calcineurina o los inhibidores de mTOR)^{45,46}(figura 8).

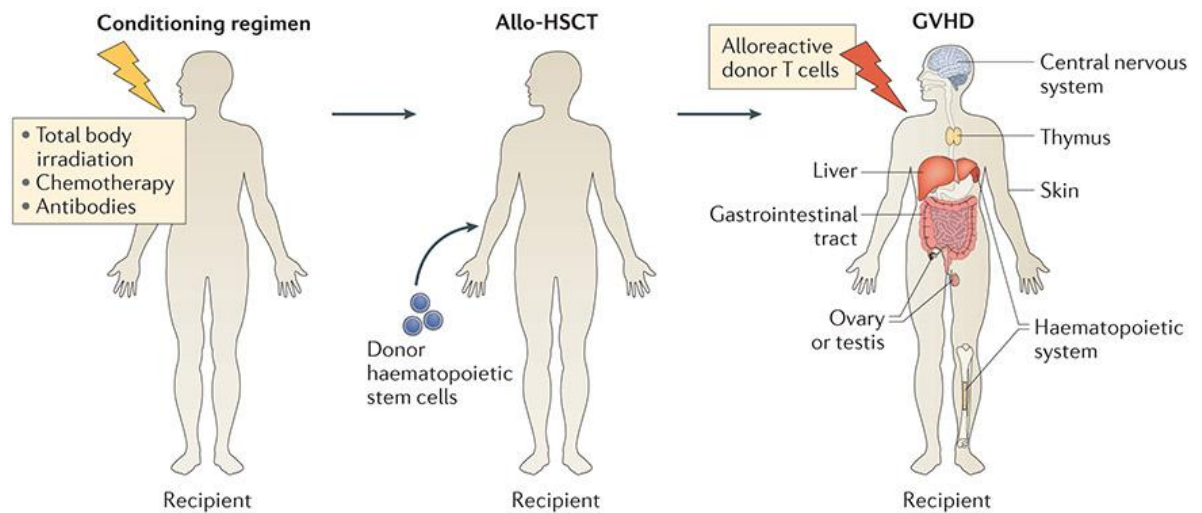


Figura 8: Factores que provocan daño del endotelio durante el trasplante alogénico.

Fuente: Shono, Y., van den Brink, M. Gut microbiota injury in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Nat Rev Cancer* 18, 283–295 (2018)⁴⁶.

3.3.2. Activación y daño de las células endoteliales en el TPH

Gracias al análisis de los factores de la coagulación, marcadores solubles o moléculas de adhesión, CE circulantes y micropartículas, diferentes grupos de investigación han sido capaces de evidenciar el daño del endotelio en el contexto del TPH⁴⁷(figura 9). Los marcadores más frecuentemente evaluados han sido el factor de Von Willebrand (FVW), la trombomodulina soluble (TM), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), el inhibidor tipo 1 del activador de plasminógeno y otros marcadores solubles como: E-selectina, la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) y la molécula de adhesión vascular (VCAM-1)⁴⁷.

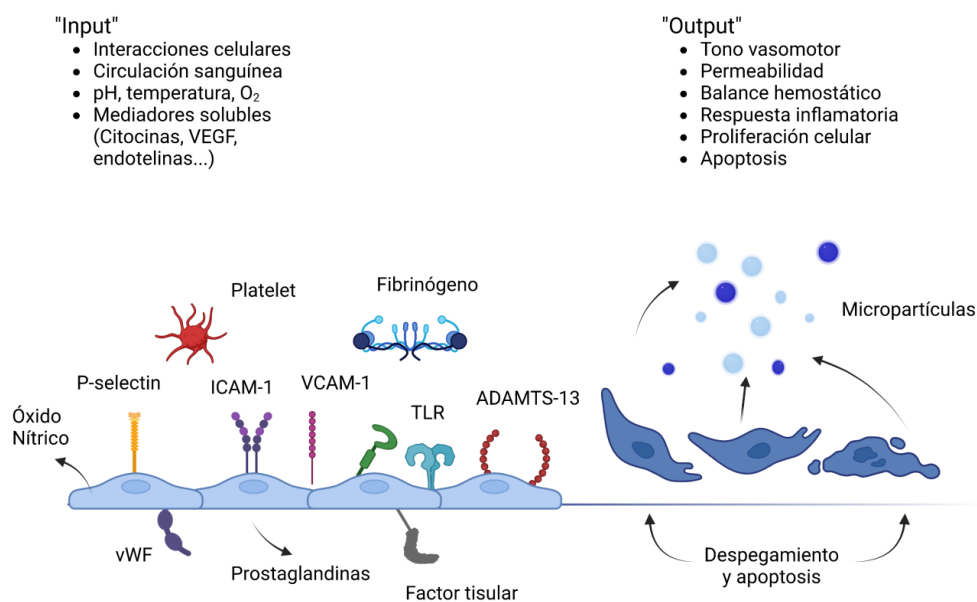


Figura 9: Descripción de los biomarcadores que influyen en el daño endotelial.

Fuente: E. Carreras and M. Díaz-Ricart BMT 2011⁴⁷.

El daño endotelial actualmente se considera fundamental en el mantenimiento de la salud de los vasos sanguíneos. La interacción entre las plaquetas y el endotelio tiene una importante función en este proceso. Las **plaquetas** se han considerado tradicionalmente las encargadas del mantenimiento de la correcta hemostasia en el organismo. En estudios recientes, se ha demostrado su importante función en los mecanismos de inflamación, vasoconstricción y desarrollo de aterosclerosis⁴⁸.

Las concentraciones séricas elevadas de **lactato deshidrogenasa (LDH)** en las complicaciones de origen endotelial son atribuibles a la liberación de ésta por parte de las células endoteliales dañadas y de las células circulantes al torrente sanguíneo⁴⁹.

La microvasculatura renal está formada por complejas uniones intercelulares que interrelacionan continuamente con el microambiente lo cual ocasiona cambios en función de la oxigenación y la osmolaridad desde la corteza hasta la región medular del riñón⁵⁰. El estrés y la disfunción endotelial contribuyen a la insuficiencia renal,

la glomerulonefritis y la glomerulonefropatía del trasplante, proporcionando un ascenso directo de los niveles de **creatinina**⁵⁰.

3.3.3. Causas

Durante el proceso del trasplante existen múltiples factores capaces de afectar la integridad de la barrera endotelial. El daño inicial ocurre previo al trasplante y tiene su origen en el régimen de acondicionamiento. Incluso bajas dosis de radioterapia han demostrado in vitro e in vivo daño de las CE^{51,52}. Otra de las causas que más daña al endotelio es el fenómeno de EICR, iniciado mediante un proceso de angiogénesis y consecuencia del fenómeno inflamatorio asociado a la propia EICR, existe un reclutamiento celular en los órganos diana afectados por esta complicación^{53,54}. La profilaxis de la EICR con fármacos como la ciclofosfamida a dosis altas o los inhibidores de la calcineurina, también ocasionan un daño endotelial⁵⁵.

Otra razón de daño de las CE durante el desarrollo de la EICR se debe al reconocimiento directo de moléculas HLA en las CE del receptor por las células T del donante. Existen estudios realizados en modelos murinos que objetivan mayor cantidad de CE circulantes coincidiendo con el desarrollo o progresión de la EICR⁵⁶. El daño endotelial se ha confirmado de manera histológica en biopsias de pacientes con EICR intestinal, mostrando áreas con lesiones de las CE que ocasionaron hemorragia pericapilar⁵⁷.

4. PRINCIPALES COMPLICACIONES DE ORIGEN ENDOTELIAL

4.1. COMPLICACIONES POST TRASPLANTE

4.1.1. Complicaciones de origen endotelial post-TPH

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) es la única opción curativa para muchas enfermedades hematológicas. Sin embargo, este procedimiento no está exento de toxicidades a corto y largo plazo, que ocasionan un aumento de la morbi-mortalidad asociada al TPH. Existe un grupo de complicaciones post-TPH que tienen su origen a nivel del endotelio vascular y que, por sus características clínicas, son difíciles de diferenciar, englobándose dentro de los llamados síndromes de origen endotelial post-TPH (figura 10)⁴⁷.

Estos síndromes ocurren después del trasplante y tienen en común las siguientes características:

- **Rápida aparición, generalmente entre el día 0 y el día 100.**
- **Diagnóstico complejo, ya que, comparten similitudes clínicas y existe un solapamiento clínico que en ocasiones dificulta separar unos síndromes de otros.**
- **Todos ellos parecen tener un origen a nivel de los capilares sanguíneos, de manera sistémica o bien de manera localizada en un órgano.**
- **Pueden evolucionar hacia un fallo multiórgano (FMO) con elevada probabilidad de fallecimiento.**

El Barcelona *Endothelium Team* es uno de los grupos de investigación más importantes a nivel internacional en el daño endotelial producido dentro del contexto del TPH y establece la siguiente clasificación para estos síndromes¹³:

- A. Síndrome de obstrucción sinusoidal (SOS):** Síndrome clínico consistente en ganancia de peso, retención hídrica con ascitis, hepatomegalia e ictericia observadas en el post-TPH, causado por la toxicidad de la terapia de acondicionamiento sobre las células endoteliales del sinusoides hepático y los hepatocitos^{58,59}.
- B. Síndrome de hiperpermeabilidad capilar o *capillary leak syndrome (CLS)*:** Se manifiesta con ganancia de peso (más del 3% del peso basal en 24 horas), edemas generalizados con mala respuesta a tratamiento diurético e hipotensión que puede derivar en un shock distributivo con fracaso respiratorio y pre-renal⁶⁰⁻⁶².
- C. Síndrome del implante (SI) o del peri-implante:** Se caracteriza por la aparición de fiebre, generalmente bien tolerada y de origen no infeccioso, rash cutáneo (mayor del 25% de la superficie corporal) asociado a hipoxia o diarrea en las 24 horas tras la recuperación granulocitaria^{63,64}. Generalmente aparece tras el TPH autólogo¹³.
- D. Hemorragia alveolar difusa (HAD):** Signos radiográficos y clínicos de hemorragia alveolar de origen no infeccioso con infiltrados multilobulillares en la prueba de imagen, en el contexto del post-TPH⁶⁵.
- E. Microangiopatía trombótica asociada al trasplante (MAT-AT):** Síndrome caracterizado por el aumento de esquistocitos en sangre periférica, trombocitopenia de nueva aparición o progresiva, elevación de LDH y descenso de la hemoglobina y las haptoglobinas; en el contexto del TPH^{66,67}.
- F. Síndrome de leucoencefalopatía posterior reversible o *posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES)*:** Síndrome caracterizado por cefalea aguda o subaguda y alteración del estado mental, convulsión, alteraciones en la visión o déficits neurológicos; mostrando un edema vasogénico bilateral subcortical en las pruebas de imagen⁶⁸. Se asocia a encefalopatía hipertensiva y tratamiento inmunosupresor post-TPH.

Inicialmente, también se consideró al **síndrome de neumonía idiopática o *Idiopathic pneumoniae syndrome (IPS)*** dentro de este grupo, sin embargo, parece que el daño endotelial no ha demostrado ser el factor más relevante en su desarrollo. Por último y con cada vez más evidencias de pertenecer a esta clasificación, la **enfermedad injerto contra receptor (EICR)**.

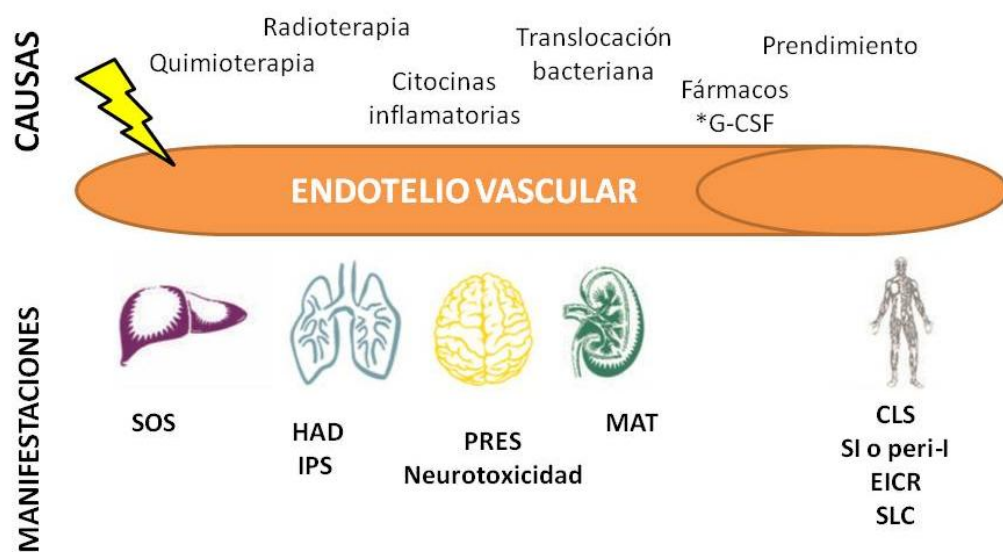


Figura 10: Factores que ocasionan daño del endotelio durante el trasplante y principales

complicaciones de origen endotelial. SOS: Síndrome de obstrucción sinusoidal; Bb: Bilirrubina; HAD: Hemorragia Alveolar Difusa; IPS: Idiopathic Pneumoniae Syndrome; PRES: Posterior reversible encephalopathy syndrome; RMN: Resonancia Magnética Cerebral; MAT: Microangiopatía Trombótica; Cr: Creatinina; LDH: Lactato Deshidrogenasa; CLS: Capillary Leak Syndrome ; SI: Síndrome del Implante; EICR: Enfermedad Injerto contra Receptor; SLC: Síndrome de Liberación de Citocinas

Fuente: Imagen realizada por Dra. Sánchez Escamilla. Adaptada de E. Carreras, and M. Díaz-Ricart, *Bone Marrow Transplant* 2011⁴⁷.

4.1.2. Fisiopatogenia de los síndromes de origen endotelial

La fisiopatogenia de este conjunto de síndromes es debida a una activación y daño mantenidos sobre las células del endotelio durante el procedimiento del trasplante, debido a una gran multitud de factores como (figura 11)⁴⁷:

- El tratamiento de quimio o radioterapia de acondicionamiento.
- La producción de citocinas pro-inflamatorias derivada del daño orgánico.

- La translocación de microbacterias a través de la ruptura de barreras mucosas.
- El empleo de fármacos que ocasionan daño directo sobre el endotelio vascular (factor estimulante de colonias granulocíticas [G-CSF] o inhibidores de la calcineurina [CNI]).
- El complejo proceso de prendimiento de las células hematopoyéticas.

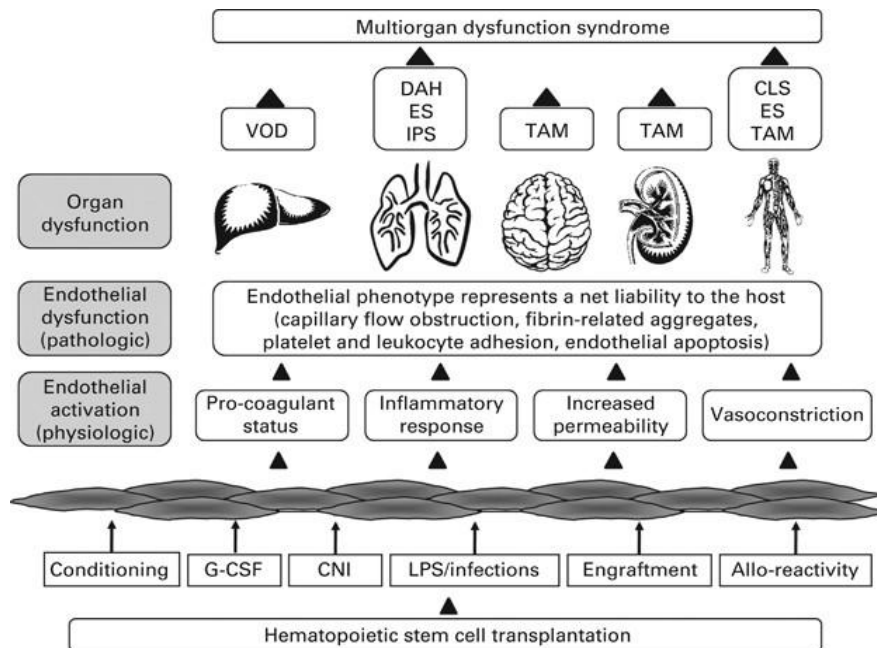


Figura 11: Síndromes de origen endotelial post-TPH

Fuente: E. Carreras et al, *Bone Marrow Transplantation* 2011⁴⁷.

4.2. COMPLICACIONES POST TERAPIA CAR-T

La terapia celular adoptiva (TCA) ha cambiado el paradigma de la hematología y de la terapia celular en los últimos años y se basa en el uso de células del propio paciente, modificadas genéticamente para expresar el receptor de antígeno quimérico o CAR, definido previamente, en su membrana, capaz de reconocer a las células malignas y provocar la unión y activación de los linfocitos T del propio paciente, desencadenando la eliminación de las células malignas.

No obstante, las células CAR-T no están exentas de complicaciones graves, siendo las más frecuentes el síndrome de liberación de citocinas (SLC) y la neurotoxicidad o síndrome de neurotoxicidad asociado a células inmunoefectoras (ICANS por sus siglas en inglés)⁶⁹. Ambas toxicidades presentan una fisiopatogenia no del todo conocida y en investigación. Se postulan diversas teorías entre las que cobra también especial importancia la presencia de daño en el endotelio vascular que ocasione mayor frecuencia y gravedad de ambas complicaciones⁷⁰.

Sabemos que los pacientes que reciben tratamiento con células CAR-T y desarrollan SLC e ICANS graves ($\geq$ grado 3) presentan alteraciones hemodinámicas y tendencia a la coagulopatía con activación endotelial evidente y aumento de la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica⁷¹. Múltiples marcadores pro-inflamatorios se han identificado y correlacionado con la aparición de SLC y/o ICANS grave (interferón-gamma, interleucina-6, interleucina-1, interleucina-10, angiotensina-2,...)⁷¹⁻⁷⁴. Además, marcadores bioquímicos usados en la rutina también se han asociado con la gravedad del SLC y el ICANS^{71,72,75-78}.

4.2.1. Síndrome de liberación de citocinas (SLC)

El SLC es el efecto adverso más frecuente tras el tratamiento con células CAR-T. La incidencia de SLC en pacientes con LAL-B y LNH-B tratados con tisagenlecleucel es del 77% y 57% respectivamente^{21,22,79}. Por otro lado, en los pacientes con axicabtagene ciloleucel, la incidencia de SLC es del 93%^{23,26,27}. Las diferencias entre

ambos productos no se pueden comparar ya que utilizaron sistemas de medida distintos⁸⁰.

Clínicamente, el SLC se caracteriza por la aparición de fiebre tras la infusión del CAR-T de manera precoz (rango de 1-12 día con su pico máximo en torno al día 2-3 post-infusión)⁸¹. Además de la fiebre, pueden aparecer diferentes síntomas como cuadro pseudogripal, fatiga, cefalea, mialgias, artralgias y malestar general. En función de la aparición de hipotensión o hipoxia y su evolución, se decidirá la severidad del SLC según los criterios de la *American Society Transplant and Cellular Therapy (ASTCT)*⁶⁹. El tratamiento del SLC se basa en tocilizumab (inhibidor del receptor de la interleucina-6 [IL-6]) y corticoides⁸².

El mecanismo fisiopatológico del SLC se divide fundamentalmente en dos fases. En primer lugar existe una interacción entre la célula CAR-T y su diana celular provocando una activación y expansión del CAR-T, lo cual ocasiona en un primer lugar una lisis directa de las células tumorales⁸¹. Durante esta primera fase tras la infusión del producto se genera un aumento de citocinas pro-inflamatorias en sangre periférica lo cual provoca una respuesta inflamatoria sistémica en el organismo generando hipoxia y daño tisular, y a su vez, daño de las células endoteliales de forma directa⁸³.

Dentro de las citocinas que aumentan durante el SLC se ha estudiado que las más frecuentes son la interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) e interferón gamma (IFN-gamma). En segundo lugar, la combinación de esta activación y liberación de citocinas provoca el reclutamiento de monocitos y macrófagos al torrente sanguíneo para promover la lisis tumoral. La activación macrofágica continúa aumentando en sangre los niveles de interleucinas y otros mediadores inflamatorios lo cual provoca la progresión del SLC a grados más severos.

Posteriormente, para finalizar, se produce la fase de resolución de los síntomas en la mayoría de los casos gracias al descenso del nivel de citocinas en sangre lo cual frena la respuesta inflamatoria sistémica permitiendo una teórica persistencia de “células CAR-T memoria” en el organismo (figura 12)⁸³.

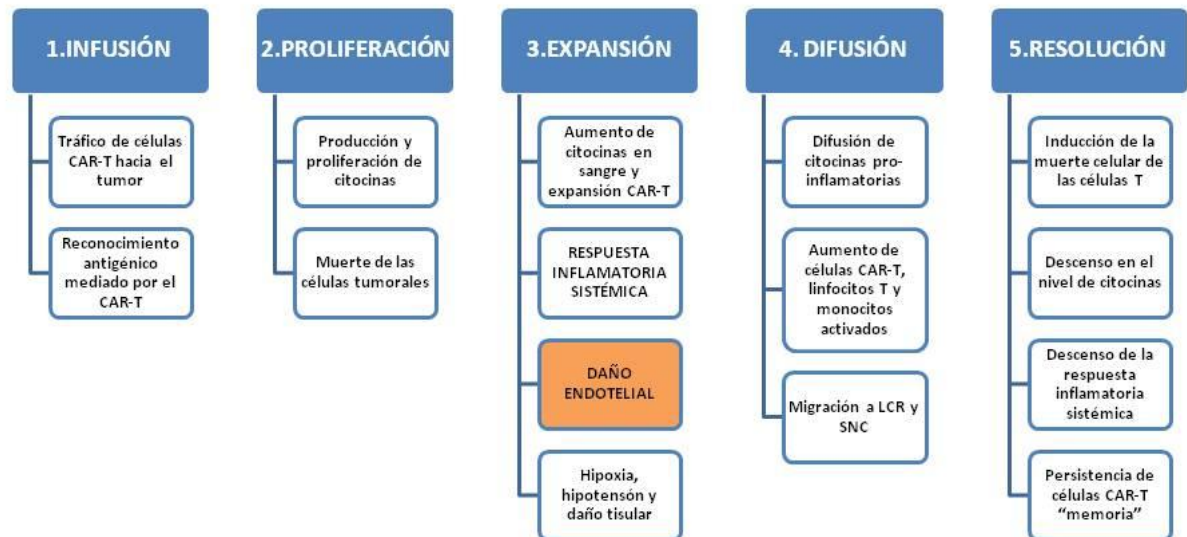


Figura 12: Diferentes fases del síndrome de liberación de citocinas.

Fuente: Imagen realizada por la Dra. Sánchez Escamilla y adaptada de *Morris, E.C. et al. Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. Nat Rev Immunol 22, 85–96 (2022)⁸³

4.2.2. Neurotoxicidad

La neurotoxicidad asociada al CAR-T o ICANS, tiene una incidencia del 0 al 87% en función del tipo de CAR-T utilizado y las características de los pacientes. Frecuentemente aparece tras el desarrollo de un SLC, aunque hasta en un 10% de pacientes el ICANS puede aparecer en ausencia de SLC previo (figura 13)^{81,83}. Los pacientes con frecuencia desarrollan ICANS en los días posteriores al SLC, los primeros síntomas de ICANS suelen ser la bradipsiquia, alteraciones en el lenguaje, temblores, debilidad transitoria de alguna extremidad, alteraciones del comportamiento, ataxias y disgrafía^{76,78,84–86}. En los casos más graves, la sintomatología puede evolucionar a crisis epilépticas localizadas o generalizadas e incluso edema cerebral agudo focal o difuso⁸⁷.

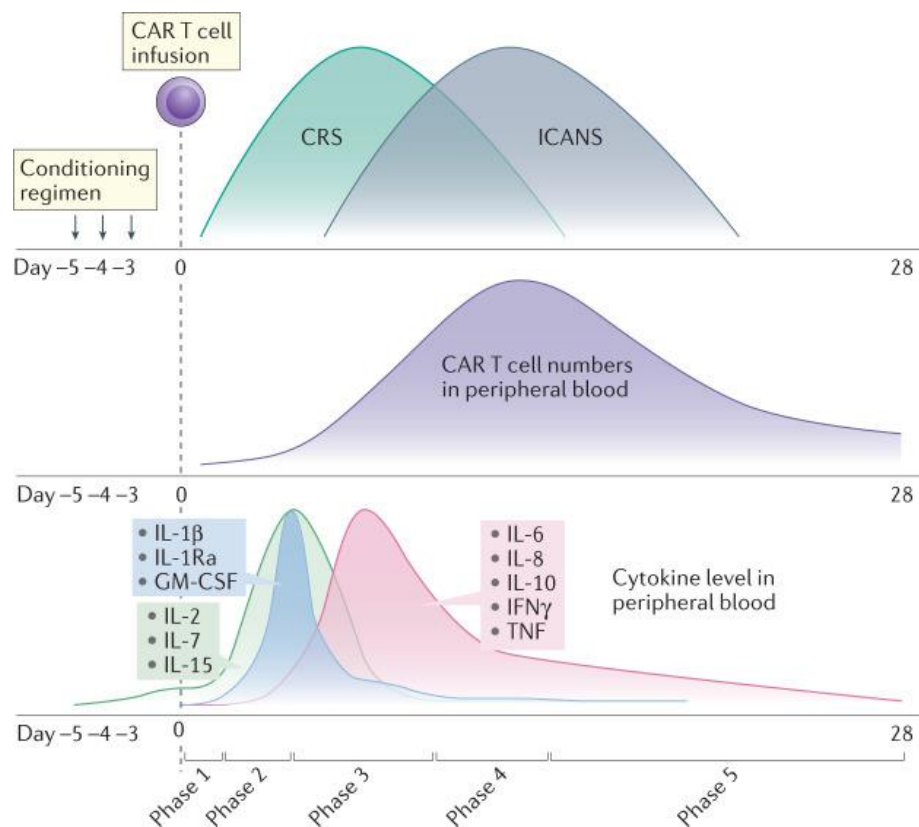


Figura 13: Fases temporales y solapamiento entre el SLC e ICANS. Citocinas proinflamatorias aumentadas debido a estas complicaciones tras la infusión del CAR-T.

Fuente: Morris, E.C. *et al.* Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 22, 85–96 (2022)⁸³.

En cuanto a la fisiopatología del ICANS, aunque la neurotoxicidad post-CAR-T no está del todo bien explicada en los diferentes estudios, se postula un daño directo del parénquima y células neuronales ocasionado por el CAR-T como consecuencia de una alteración en la barrera hematoencefálica (BHE)^{71,76}. Además, sabemos que el ICANS grave es más frecuente en pacientes que han tenido un SLC grave previo, lo cual se asocia a una mayor disfunción sistémica del endotelio vascular⁷⁸.

La BHE está formada por multitud de células endoteliales formando los capilares cerebrales que se encuentran rodeados por la matriz extracelular (lámina basal), los pericitos, la microglía y los astrocitos. El daño en la BHE asociado con el aumento de determinadas citocinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF-alfa) y con angiotensina 1 (ANG1) y angiotensina 2 (ANG2)⁸⁸⁻⁹¹. Estos factores, que también están relacionados con la aparición de SLC grave⁷⁵ y la disfunción endotelial tras el TPH^{41,45,55}, junto con otras moléculas que causan la activación y expansión de las células CAR-T, monocitos y macrófagos; y otras sustancias neurotóxicas como el glutamate el ácido quinolínico, se han relacionado con formas graves de ICANS⁷⁶.

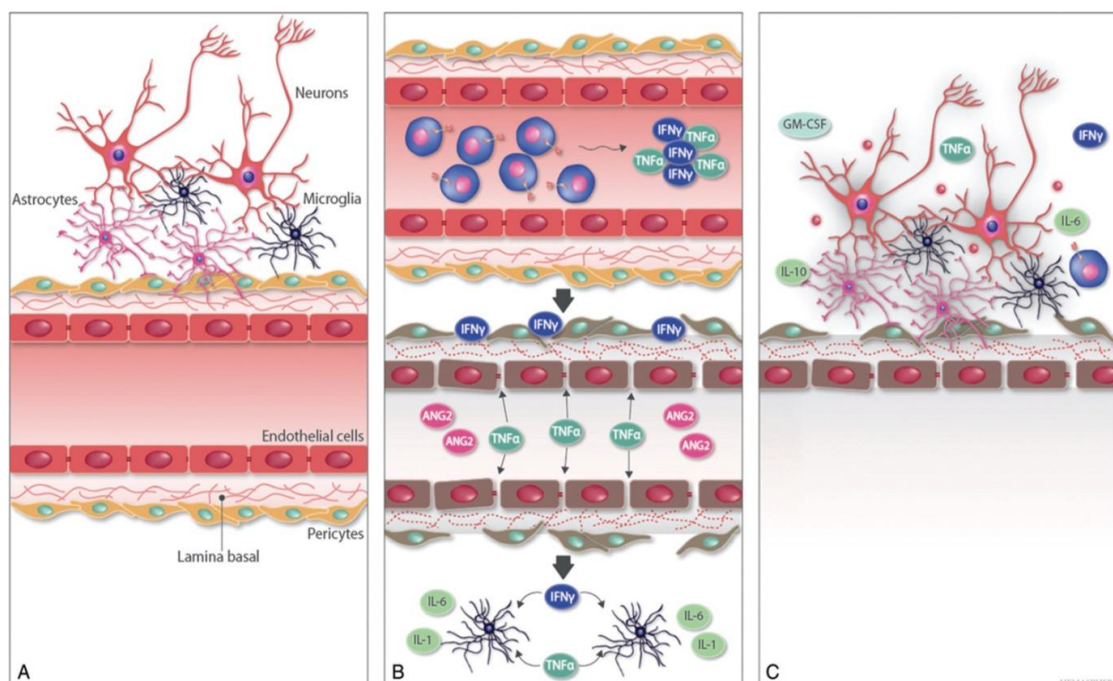


Figura 14: Mecanismo de daño endotelial en el ICANS: Modelo de neurotoxicidad secundaria al daño tras la infusión CAR-T propuesto por Gust et al⁹²

Fuente: Yáñez L, Sánchez-Escamilla M, Perales MA. CAR T Cell Toxicity: Current Management and Future Directions. HemaSphere, 2019⁸¹.

5. IMPACTO DE LA FÓRMULA EASIX EN EL TRASPLANTE Y LA TERAPIA CELULAR

5.1. FÓRMULA EASIX (*Endothelial Activation and Stress Index*)

5.1.1. Origen de la fórmula

El grupo de investigación del Dr. Thomas Luft⁵³, se propuso identificar a aquellos pacientes con alto riesgo de desarrollar EICR refractaria a corticoides con el objetivo de poder mejorar las estrategias de profilaxis de la EICR y los tratamientos de inmunosupresión post-trasplante. Su teoría postula que el daño del endotelio puede contribuir al desarrollo de EICR cortico-refractaria al perpetuar la inflamación y el daño orgánico, a pesar de tener un control efectivo sobre la actividad de los linfocitos T alo-reactivos.

Por otro lado, diferentes grupos de investigación, destacando el grupo de la Dra. Sophie Paczesny⁹³ (figura 15), han estudiado y validado el uso de biomarcadores en la predicción de diferentes complicaciones de origen endotelial postrasplante⁹⁴. No obstante, no existe por el momento ningún panel de uso estandarizado y de momento no son lo suficientemente coste-efectivos para poder implantarse en la práctica clínica habitual.

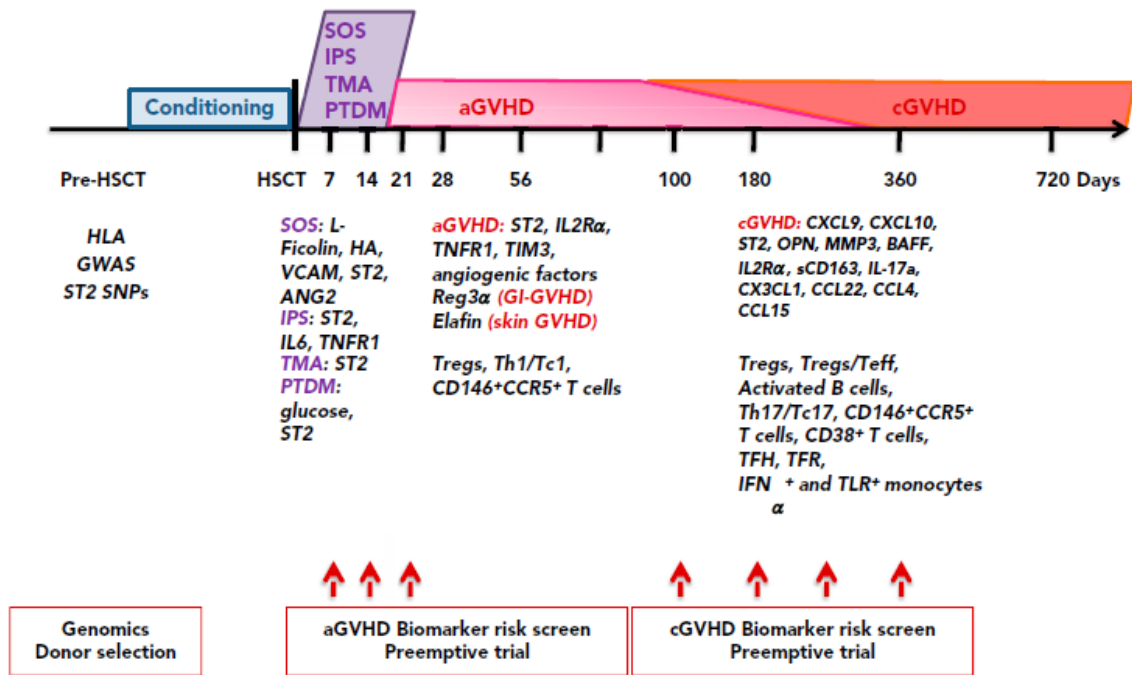


Figura 15: Biomarcadores validados en el post-trasplante

Fuente: S. Paczesny, *Blood* 2018⁹³

Por todo esto y con el objetivo de tener una herramienta fácil de utilizar, el grupo de T. Luft desarrolló la fórmula EASIX basada en 3 parámetros bioquímicos utilizados en el diagnóstico de la MAT y de uso frecuente en la práctica clínica habitual⁹⁵.

$$\text{EASIX} = \frac{\text{LDH (U/L)} \times \text{Creatinina (mg/dL)}}{\text{Cifra de plaquetas (10}^9 \text{ células por L)}}$$

5.1.2. Estudios que analizan EASIX en la predicción del daño endotelial

El primer estudio publicado por T. Luft et al⁹⁵, demuestra que la fórmula EASIX calculada en el momento de la aparición de EICR aguda (EASIX-GVHD) predice mortalidad no relacionada con recaída (NRM) en una cohorte de pacientes sometidos a trasplante de intensidad reducida (IR) que habían desarrollado EICR aguda de cualquier grado.

En el siguiente trabajo publicado, T. Luft et al.⁹⁶ evalúan la capacidad de EASIX calculado previo a la terapia de acondicionamiento del TPH (EASIX-PRE) de predecir MAT, NRM o SG. En el análisis univariante EASIX-PRE se asoció significativamente con mayor riesgo de desarrollar MAT (univariante: HR=1.24, p=0.03). Además, el incremento en EASIX-PRE, también se asoció de manera significativa con un aumento en la NRM (univariante: HR 1.22, p<0.001, multivariante: HR 1.22, p=0.001) tras el TPH alogénico.

Recientemente, un nuevo estudio publicado por el grupo de T. Luft⁹⁷, demuestra la asociación entre EASIX calculado en el día 0 del TPH alogénico (EASIX-d0) y el desarrollo de SOS post-trasplante. Se demostró a su vez que EASIX-d0 también mostraba asociación con un aumento en la NRM y un descenso en la SG post-trasplante.

5.2. EASIX EN LA PREDICCIÓN DE EICR Y DE LOS RESULTADOS POST-TRASPLANTE ALOGÉNICO

5.2.1. Justificación del manuscrito número 1

El primer trabajo que se presenta en esta tesis doctoral parte de la necesidad de responder a dos preguntas. Dado que la fórmula EASIX es una herramienta que se ha mostrado eficaz en la predicción de MRT y SG en el momento de la aparición del EICR agudo⁹⁵, ¿puede tener utilidad como indicador precoz de dichas complicaciones en diferentes momentos del TPH independientemente de la aparición o no de EICR aguda? Y, ¿puede el EASIX calculado al momento de aparición de EICR predecir la respuesta al tratamiento corticoide?

5.3. EASIX EN LA PREDICCIÓN DE SÍNDROME DE LIBERACIÓN DE CITOCINAS E ICANS

5.3.1. Justificación del manuscrito número 2

El segundo trabajo que presento se origina unos meses después del primero y busca conocer si el cálculo del EASIX puede ser útil a la hora de predecir los efectos secundarios más precoces de la terapia con células CAR-T, CRS e ICANS.

La finalidad última de ambos trabajos es encontrar una herramienta predictora que nos permita identificar precozmente a aquellos pacientes que van a desarrollar una mayor morbi-mortalidad con el fin de que, a futuro, podamos realizar cambios en las estrategias de seguimiento y prevención, disminuyendo la MRT y mejorando la SG de los pacientes que reciben un TPH o un CAR-T.

6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS DE LOS ESTUDIOS

6.1. MANUSCRITO 1: LA FÓRMULA EASIX PREDICE UNA MENOR SUPERVIVENCIA TRAS EL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

La hipótesis planteada en el primer artículo de la presente tesis doctoral se basa en la capacidad de la fórmula EASIX calculada en diferentes momentos pre y post-TPH de predecir la aparición de EICR aguda y los resultados globales del procedimiento (supervivencia global [SG], mortalidad no relacionada con la recaída [NRM] y recaída post-TPH).

Los objetivos específicos del trabajo fueron:

1. **Analizar EASIX en diferentes momentos pre- y post-trasplante alogénico y correlacionarlo con los resultados del trasplante en cuanto a supervivencia (SG) y mortalidad (NRM).**
 - a. EASIX previo al trasplante (EASIX-pre) y en el día 30 y 100 post-TPH (EASIX-d30 y EASIX d100).
 - b. EASIX en el momento de aparición de EICR aguda post-TPH (EASIX-GVHD).

Objetivos secundarios:

1. Evaluar la capacidad de EASIX-GVHD para predecir la respuesta de la EICR al tratamiento con corticoides.
2. Evaluar la aparición de microangiopatía trombótica (MAT) post-TPH y la capacidad de EASIX para predecirla.
3. Evaluar la recaída post-TPH y la capacidad de EASIX para predecirla.
4. Evaluar las causas de muerte post-TPH dividiendo a la población en cuartiles en función de EASIX-d30.

6.2. MANUSCRITO 2: EASIX MODIFICADO PREDICE EL SÍNDROME DE LIBERACIÓN DE CITOCINAS GRAVE Y LA NEUROTOXICIDAD TRAS EL TRATAMIENTO CON CÉLULAS CAR-T.

Nuestra hipótesis se basa en que la fórmula EASIX, como marcador de daño endotelial, puede ser predictor de la aparición de SLC grave y/o de ICANS en los pacientes que reciben terapia CAR-T. La elevación de creatinina, una de las variables de EASIX, tiene un papel limitado como biomarcador para la toxicidad relacionada con las células CAR-T elevándose en una minoría de pacientes que desarrollan síntomas de SLC grave⁹⁸. Por este motivo, analizamos 2 fórmulas EASIX con modificaciones: EASIX-simplificado (s-EASIX) que excluye la variable creatinina; y EASIX-modificado (m-EASIX) que cambia la creatinina por la proteína C reactiva (PCR) para una mejor estimación del riesgo de desarrollar SLC grave e ICANS tras la infusión de las células CAR-T. Por lo tanto, el cálculo de EASIX/s-EASIX/m-EASIX se realizó en diferentes momentos pre y post-infusión de las células CAR-T investigando su asociación con el desarrollo de SLC e ICANS.

El objetivo específico del trabajo fue:

- 1. Evaluar la capacidad de EASIX/s-EASIX/m-EASIX de predecir SLC o ICANS grave.**

Objetivos secundarios:

1. Explorar la correlación de EASIX/s-EASIX/m-EASIX con la obtención de remisión completa (RC) y la mejor respuesta observada (ORR) tras la infusión del CAR-T.
2. Seleccionar la fórmula con mejor poder de predicción para el objetivo primario (SLC o ICANS grave).
3. Evaluar la fórmula seleccionada con mejor poder predictivo en los subgrupos según la enfermedad (LAL-B y LBDCG).

7. RESULTADOS

Como resultado del trabajo de investigación llevado a cabo durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han publicado los siguientes artículos originales:

Artículo 1: **Sánchez-Escamilla, M.**, Flynn, J., Devlin, S.M., Maloy, M., Fatmi, S.A., Alarcón Tomas, A., Escribano-Serrat, S., Ponce, D., Sauter, C.S., Giralt, S.A., Scordo, M. and Perales, M.A. EASIX score predicts inferior survival after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, (2023), 1-8.

Artículo 2: *Pennisi, M., ***Sánchez-Escamilla, M.**, Flynn, J. R., Shouval, R., Alarcón Tomas, A., Silverberg, M.L., Batlevi, C., Brentjens, R.J., Dahi, P.B., Devlin, S.M., Diamonte, C., Giralt, S., Halton, E.F., Jain, T., Maloy, M., Mead, E., Palomba, M.L., Ruiz, J., Santomasso, B., Sauter, C.S., Scordo, M., Shah, G.L., Park, J.H., ¥Yanez San Segundo, L. and ¥Perales, M.A. Modified EASIX predicts severe cytokine release syndrome and neurotoxicity after chimeric antigen receptor T cells. *Blood advances*, (2021), 5(17), 3397-3406. *MP and MSE contributed equally to this study. ¥LYSS and MAP contributed equally to this study.

7.1. 7.1. LA FÓRMULA EASIX PREDICE UNA MENOR SUPERVIVENCIA TRAS EL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

7.1.1. Diseño del estudio:

Se incluyeron un total de 152 pacientes con enfermedades linfoides mayores de 18 años, que recibieron un primer Alo-TPH entre abril de 2008 y mayo de 2017 en el hospital Memorial Sloan Kettering.

Todos los pacientes recibieron regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida (IR) o no mieloablativos (NMA) según criterio médico, con los siguientes esquemas: ciclofosfamida (50mg/kg un día) y fludarabina (25mg/m² cinco días); ciclofosfamida (50mg/kg un día), fludarabina (25mg/m² cinco días) e irradiación

corporal total (ICT, 200 cGy); ciclofosfamida (50mg/kg un día), fludarabina (30mg/m² cinco días), tiotepa (5mg/kg dos días) e ICT (200cGy dos días); melfalán (70mg/m² dos días) y fludarabina (30mg/m² cinco días); rituximab (375mg/m²), ciclofosfamida (50mg/kg), fludarabina (25mg/m² cinco días) e ICT (200 cGy); fludarabina (30mg/m² cuatro días) y busulfan (0.8mg/kg dos días); fludarabina (30mg/m² cuatro días), busulfan (0.8mg/kg dos días) y rituximab (375mg/m²). Todos los pacientes recibieron de forma uniforme profilaxis con sirolimus y tacrólimus desde el día -3 y metotrexato a dosis bajas (5mg/m² los días +1, +3 y +6) como profilaxis de la EICR.

La EICR se diagnosticó clínicamente y fue confirmada histológicamente sólo cuando fue posible. La clasificación de EICR se realizó según los criterios IBMTR. Se desestimaron los pacientes que recayeron o recibieron infusión de linfocitos del donante (ILD) para el cálculo de la EICR. También se clasificó la EICR según los criterios redefinidos de Minnesota⁹⁹ en el momento de aparición de cualquier grado de EICR aguda y se evaluaron las respuestas a la primera línea de tratamiento (corticoides) al día 28 de su inicio. La MAT se evaluó según los criterios de Ruutu⁶⁷.

Se realizó el cálculo de la fórmula EASIX (**LDH [U/L] x Creatinina [mg/dL]/ plaquetas (10⁹ células/L)**) previo al trasplante (entre el día -30 y -10, previo al inicio de la terapia de acondicionamiento [EASIX-pre]) y posterior al trasplante (en el día 30 [EASIX-d30] y en el día 100 [EASIX-d100]). También se realizó el cálculo de EASIX al momento de aparición de EICR aguda (EASIX-GVHD).

7.1.2. Análisis estadístico

Para todas las evaluaciones temporales de EASIX post-TPH se realizó un análisis de puntos de referencia (*landmark*) para cada punto temporal correspondiente. Se aplicó una transformación logarítmica utilizando la base 2 (log2) a todas las variables de EASIX con el objetivo de reducir sesgos y también para poder comparar los resultados con el artículo original de Thomas Luft⁹⁵. Así pues, un aumento en una unidad en log2 de EASIX se asocia con una duplicación (aumento

de una vez) de EASIX en la escala original. Los resultados de EASIX se han representado por cuartiles debido a que aún no disponemos de un punto de corte establecido para esta fórmula.

Se utilizaron los análisis de *Kaplan-Meier* para evaluar la SG y los de incidencia acumulada (IA) para estimar la NRM, la recaída y la EICR aguda. Se utilizaron modelos de riesgos proporcionales de Cox para cada criterio de valoración con el fin de evaluar todas las covariables, utilizando cocientes de riesgo (*hazard ratio*) específicos para la NRM, la recaída y la EICR. La recaída sola o la recaída y la muerte se consideraron riesgos competitivos para los criterios de valoración de NRM y EICR, respectivamente. La muerte en ausencia de recaída se utilizó como evento competitivo para la valoración de recaída. Todos los análisis se realizaron con la **versión 3.5.1 de R**.

7.1.3. Resultados:

a) Características de la serie

La mediana de edad al trasplante fue de 55 años (rango, 24-79 años). Todos los pacientes tenían enfermedades hematológicas linfoides, en su mayoría (67%) linfomas no Hodgkin. Al trasplante, la mayoría de los pacientes presentaba una enfermedad quimiosensible: 78 pacientes (57%) estaban en remisión completa (RC) y 46 pacientes (34%) en remisión parcial (RP); los 12 pacientes restantes (9%) tenían una enfermedad estable o en progresión.

En cuanto a las comorbilidades específicas relacionadas con disfunción endotelial, 10 pacientes tenían comorbilidades cardíacas (cardiomiopatía en 5, enfermedad coronaria arterial en 5), y un paciente tenía enfermedad vascular periférica. Ningún paciente tenía disfunción renal moderada o severa previo al trasplante.

La mediana (rango) de EASIX-pre para cada cuartil fue de 0.57 (0.39-0.78) para el primer cuartil (Q1), 1.02 (0.81-1.19) para el segundo cuartil (Q2), 1.37 (1.21-1.72) para el tercer cuartil (Q3) y 3.00 (1.79-27.83) para el cuarto cuartil (Q4). Al

comparar las características basales de los pacientes de los 4 cuartiles no se encontraron diferencias.

b) Incidencia de EICR aguda

Ochenta y ocho pacientes desarrollaron EICR aguda tras el trasplante. La incidencia acumulada a 1 año de EICR aguda grado 1-4, 2-4 y 3-4, fue de un 56.6% (intervalo de confianza [IC] del 95%, 48.3-64.1), 44.1% (IC 95%, 36.0-51.8) y 10.5% (IC 95%, 6.3-16.0), respectivamente. Al agrupar a los pacientes según los criterios redefinidos de Minnesota, 65 pacientes (73.8%) fueron clasificados en el grupo de riesgo estándar y 23 (26.1%), en el grupo de alto riesgo, respectivamente. Las respuestas analizadas al día 28 tras el inicio del corticoide en ambos grupos fueron mayores en el grupo de riesgo estándar (72.6% vs. 47.8%).

c) Desarrollo de MAT

Trece pacientes (2.5%) desarrollaron una MAT post-trasplante. En los 9 de ellos (69%) que además habían desarrollado EICR aguda, no se obtuvo una remisión completa de la EICR tras el inicio del corticoide. Siete de los pacientes con MAT fallecieron, siendo la EICR la causa más frecuente de muerte (n=3), seguida de la recaída (n=2), y del fracaso orgánico (n=2).

d) Supervivencia global, recaída y mortalidad no relacionada con la recaída

Con una mediana de seguimiento de 5.4 años (rango, 0.8-10 años), la SG a 1 año y 3 años fue del 84.2% (IC 95%, 77.3-89.1) y del 67.9% (IC 95%, 59.6-74.8), respectivamente. La incidencia acumulada de recaídas a 1 y 3 años fue del 19.1% (IC 95%, 13.3-25.7) y del 27.4% (IC 95%, 20.5-34.8), respectivamente. Al último seguimiento, 62 pacientes habían fallecido. La NRM a 1 y 3 años fue del 7.9% (IC 95%, 4.3-12.9) y 16.4% (IC 95%, 10.9-22.8), respectivamente. Las principales causas de muerte fueron la recaída o progresión de la enfermedad en 28 pacientes (45.2%), EICR en 26 pacientes (41.9%), toxicidad orgánica en 5 pacientes (8.1%) y otras en 2 (3.2%), respectivamente.

e) El EASIX pre-TPH y posteriores se asoció con la mortalidad del TPH

Se observó la relación entre los resultados del TPH y el cálculo de EASIX en diferentes momentos del trasplante.

En el **análisis univariante**, EASIX-pre se asoció significativamente con mayor NRM (HR=1.60 [IC 95%, 1.15-2.23], p=0.008) y con EICR aguda grado 1-4 y 2-4 (HR=1.33 [IC 95%, 1.08-1.64], p=0.006; y HR=1.32 [IC 95%, 1.05-1.67], p=0.019, respectivamente), pero no se observó asociación con EICR aguda grado 3-4 o SG.

EASIX-d30 y EASIX-d100, se asociaron de forma significativa en el análisis univariante con mayor NRM (HR=1.76 [IC 95%, 1.38-2.25], p<0.001 y HR=1.61 [IC 95%, 1.27-2.03], p<0.001; respectivamente).

También se observó asociación significativa entre HCT-CI $\geq$ 3 y mayor NRM (HR=2.81 [IC 95%, 1.17-6.75], p=0.044). HCT-CI $\geq$ 3 también se asoció con menor SG (HR=3.35 [IC 95%, 1.71-6.58], p<0.001). El uso de ICT en el acondicionamiento se asoció significativamente con mayor SG (HR=0.52 [IC 95%, 0.30-0.91], p=0.027). En el **análisis multivariante**, EASIX-pre se asoció significativamente con mayor NRM (HR=1.64, p=0.009) y menor SG (HR=1.33, p=0.046). A su vez, EASIX-d30 y EASIX-d100 se asociaron con mayor NRM (HR=1.65, p<0.001; y HR=1.65, p<0.001) y menor SG (HR=1.27, p=0.018; y HR=1.49, p<0.001), independientemente del HCT-CI, la enfermedad o el régimen de acondicionamiento. Se evaluó la relación entre los cuartiles de EASIX-GVHD y la tasa de respuestas de la EICR aguda a los corticoides en el día 28 del tratamiento. Al día 28 la tasa de respuestas completas a los corticoides fue del 42% en los pacientes del primer cuartil (Q1) en comparación con el 5% en los pacientes del cuarto cuartil (Q4). También se evaluaron las causas de muerte en función de los cuartiles de EASIX-d30, observando que la mayoría de muertes ocurría en los pacientes del cuarto cuartil (Q4) principalmente por EICR (50%) o recaída (27%).

Los resultados de esta parte del trabajo de investigación fueron publicados en forma de artículo original en la revista “Bone Marrow Transplantation”.

A continuación, se aporta una copia del trabajo tal y como fue publicado.

ARTICLE



EASIX score predicts inferior survival after allogeneic hematopoietic cell transplantation

Miriam Sanchez-Escamilla^{1,2,3}✉, Jessica Flynn², Sean Devlin², Molly Maloy¹, Samira A. Fatmi¹, Ana Alarcon Tomas¹, Silvia Escribano-Serrat¹, Doris Ponce^{1,4}, Craig S. Sauter^{1,4}, Sergio A. Giralto^{1,4}, Michael Scordo^{1,4,5} and Miguel-Angel Perales^{1,4,5}✉

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2023

The Endothelial Activation and Stress Index (EASIX) is a prognostic tool that uses common clinical laboratory values and has been shown to predict non-relapse mortality (NRM) and overall survival (OS) at the onset of acute graft-versus-host disease (GVHD) after allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT). We hypothesized that EASIX calculated at different time points pre- and post-HCT may predict NRM and OS, and that EASIX calculated at onset of GVHD may predict response to steroids. We evaluated the EASIX score pre- and post-HCT in 152 patients with lymphoid malignancies undergoing unmodified reduced intensity conditioning (RIC) alloHCT with uniform GVHD prophylaxis. In multivariate analysis, EASIX calculated pre-HCT was significantly associated with higher NRM (HR = 1.64, $p = 0.009$) and lower OS (HR = 1.33, $p = 0.046$). Furthermore, EASIX calculated at day 30 and at day 100 was associated with increased NRM (HR = 1.65, $p < 0.001$; and HR = 1.65, $p < 0.001$) and decreased OS (HR = 1.27, $p = 0.018$; and HR = 1.49, $p < 0.001$), independent of HCT-CI, disease and conditioning regimen. Our study shows that high EASIX scores at various time points pre- and post-HCT are significantly associated with poorer overall outcomes. EASIX provides an independent and easily accessible tool to predict outcomes that can be complementary to other measures of risk stratification for patients undergoing HCT.

Bone Marrow Transplantation; <https://doi.org/10.1038/s41409-023-01922-8>

INTRODUCTION

Endothelial damage has been linked to numerous complications early after allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT) that lead to higher morbidity and non-relapse mortality (NRM) [1], such as sinusoidal obstruction syndrome (SOS) [2], thrombotic microangiopathy (TMA) [3], diffuse alveolar hemorrhage [4] and graft-versus-host disease (GVHD) [5–7]. Acute GVHD remains the main cause of non-relapse mortality (NRM) after HCT, particularly in patients with steroid-refractory acute GVHD who have a dismal prognosis [8]. Steroid-refractory GVHD has been linked to TMA, a microvascular disorder characterized by renal injury in combination with hemolytic anemia and microthrombosis with platelet consumption that is associated with high mortality rates [9–12]. In recent years, both clinical tools and circulating biomarkers have helped identify patients with a higher risk of steroid refractory GVHD [13–17], in order to more accurately predict or mitigate post-transplantation acute toxicities.

With the aim to develop an easy tool that could be used in clinical practice to predict endothelial dysfunction and TMA after HCT, Luft and colleagues developed the Endothelial Activation and Stress Index (EASIX) based on routine laboratory parameters (high creatinine, high lactate dehydrogenase [LDH] and low thrombocyte counts) that links endothelial damage, TMA, and steroid-refractory GVHD [18–20]. Endothelial dysfunction contributes to renal failure, glomerulonephritis, and transplantation-

related glomerulonephropathy, providing a link to creatinine levels [21]. Elevated serum LDH in the setting of endothelial injury is related to direct release from endothelial cells and circulating blood cells [22]. Furthermore, endothelial activation is also associated with clotting and low platelet counts [22–24]. EASIX calculated pre-HCT (EASIX-pre) has been significantly associated with a diagnosis of TMA, increased NRM, and poorer overall survival (OS) after HCT [18]. In addition, EASIX calculated at onset of any grade of acute GVHD (EASIX-GVHD) in patients who underwent reduced intensity conditioning (RIC) HCT, has been significantly associated with increased NRM and inferior OS [18]. Recently, EASIX-pre has been established as a predictor of individual risk of mortality after HCT independently from established clinical criteria in a large cohort of patients [19].

In the present study, we examined the EASIX score at different time points pre- and post-HCT in patients with lymphoid malignancies undergoing reduced intensity HCT with uniform GVHD prophylaxis in order to expand on prior studies by validating the ability of the score to predict HCT outcomes such as NRM and OS, as well as examining EASIX as a predictor of response in acute GVHD.

MATERIAL AND METHODS

This retrospective study includes consecutive patients with lymphoid malignancies aged over 18 years who underwent a first unmodified HCT at

¹Adult Bone Marrow Transplantation Service, Department of Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY 10065, USA. ²Department of Epidemiology and Biostatistics, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY 10065, USA. ³Department of Hematological Malignancies and Stem Cell Transplantation, Research Institute of Marques de Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain. ⁴Department of Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, NY 10065, USA. ⁵These authors contributed equally: Michael Scordo, Miguel-Angel Perales. ✉email: miriam.sancheze@scsalud.es; peralesm@mskcc.org

Received: 11 May 2022 Revised: 5 January 2023 Accepted: 13 January 2023
Published online: 31 January 2023

Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) between April 2008 and May 2017 using a uniform GVHD prophylaxis of sirolimus/tacrolimus and low-dose methotrexate [25]. HLA typing was done using high-resolution DNA sequence-specific oligonucleotide typing for the HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 loci. Written informed consent for treatment was obtained from all patients and donors. Approval for this retrospective review was obtained from the Institutional Review and Privacy Board.

All patients were treated with one of the following previously described RIC or non-myeloablative (NMA) conditioning regimens [26], at the discretion of the treating physician: cyclophosphamide (50 mg/kg once) and fludarabine (25 mg/m² daily for 5 days); cyclophosphamide (50 mg/kg once), fludarabine (25 mg/m² daily for 5 days) and total body irradiation (TBI, 200 cGy); cyclophosphamide (50 mg/kg once), fludarabine (30 mg/m² daily for 5 days), thiotepa (5 mg/kg daily for 2 days) and TBI (200 cGy daily for 2 days) TBI [27]; melphalan (70 mg/m² daily for 2 days) and fludarabine (30 mg/m² daily for 5 days); rituximab (375 mg/m² pre-conditioning), cyclophosphamide (50 mg/kg), fludarabine (25 mg/m² daily for 5 days) and TBI (200 cGy); fludarabine (30 mg/m² daily for 4 days) and busulfan (0.8 mg/kg daily for 2 days); fludarabine (30 mg/m² daily for 4 days), busulfan (0.8 mg/kg daily for 2 days), and rituximab (375 mg/m²). GVHD prophylaxis consisted of sirolimus and tacrolimus that were started on day -3, followed by MTX 5 mg/m² on days +1, +3 and +6 [25]. Doses were adjusted to maintain target serum trough levels of 3–12 and 5–10 ng/mL for sirolimus and tacrolimus, respectively. Tapering of sirolimus and tacrolimus on an alternating schedule typically began at day 60 in the absence of GVHD or relapse, with the goal of complete discontinuation by 6 months, or earlier in patients not in complete remission (CR) at the time of transplantation.

All patients received standard supportive care for prevention of sinusoidal obstruction syndrome and opportunistic antimicrobial prophylaxis according to standard institutional guidelines. Granulocyte colony-stimulating factor was initiated on day +7 and continued until absolute neutrophil count recovery. Comorbidities pre-HCT were assessed using the HCT-specific comorbidity index (HCT-CI) [28]. Cause of death was determined using a standard algorithm [29].

GVHD and TMA assessment

GVHD was diagnosed clinically, confirmed pathologically whenever possible, and classified according to standard criteria [30, 31].

Patients who engrafted were evaluable for acute GVHD. Patients who relapsed or received donor lymphocyte infusions were censored for GVHD at that time. We also assessed the refined Minnesota risk classification at onset of any grade of acute GVHD and responses to first line treatment of acute GVHD [17]. Responses to treatment were determined comparing the initial acute GVHD stage and grade in each organ to the best recorded stage and grade at day 28 (± 7 days) after treatment was started. Complete response (CR) was defined as the complete resolution of acute GVHD manifestation in all organs, without need for secondary GVHD therapy. Partial response (PR) was defined as improvement in GVHD stage in any initially affected organ, without resolution in all organs, worsening in any other organ or need for secondary GVHD therapy. No response (NR) was defined as the same severity of GVHD in any organ or death, or the addition of secondary GVHD therapy before day 28. A flare of acute GVHD before day 28 and requirement of secondary therapy were also considered to have NR. Progression was defined as worsening of GVHD in at least 1 organ. Assessment of TMA was made retrospectively based on published diagnostic criteria [20].

EASIX formula and time points

The EASIX formula ($\text{LDH [U/L]} \times \text{CREAT [mg/dL]} / \text{platelet [10}^9 \text{ cells/L]}$) was calculated at different time points pre and post-HCT. EASIX prior to HCT (EASIX-pre) was calculated from day -30 to day -10 before the start of the conditioning regimen. EASIX post-HCT was calculated on the closest day to day 30 and day 100 post-HCT (EASIX-d30 and EASIX-d100). We also calculated EASIX at onset of any grade of acute GVHD post-HCT (EASIX-GVHD).

Biostatistics

A log transformation using base 2 ($\log_2$) was applied to all EASIX variables to reduce skew and to ease interpretation so that a one-unit increase in $\log_2$ EASIX is associated with a doubling (one-fold increase) of EASIX on the original scale. Baseline clinical and demographic variables, as well as platelet transfusion values were compared across $\log_2$ EASIX quartiles using Kruskal Wallis rank sum tests and Fisher's exact tests. Kaplan-Meier

analysis was utilized to evaluate OS, and cumulative incidence (CI) analyses were used to estimate NRM, relapse and acute GVHD. For all EASIX assessments post-HCT, a landmark analysis was implemented at given time points: day 30 and day 100. Cox proportional hazards models were used for each endpoint to evaluate all covariates, using cause specific hazard ratios for NRM, relapse and acute GVHD. Relapse alone or relapse and death were considered competing risks for the endpoints of NRM and acute GVHD, respectively. Death in the absence of relapse was used as a competing event for the relapse endpoint. All analyses were conducted using R version 3.5.1.

RESULTS

Patients' characteristics and evolution of EASIX during time

Patients' characteristics for the whole population and based on EASIX-pre quartiles are shown in Table 1. The median age at transplantation was 55 years (range, 24–79 years). All patients were treated for lymphoid malignancies, with 67% non-Hodgkin lymphoma, 16% chronic lymphocytic leukemia, 15% Hodgkin lymphoma, and 3% acute lymphoblastic leukemia. At time of transplantation, most patients had chemosensitive disease: 78 patients (57%) were in CR and 46 patients (34%) were in PR; the other 12 patients (9%) had stable or progressive disease. All patients except two received peripheral blood stem cells as allograft source. Fifty-nine patients (43%) received a transplantation from an HLA-identical sibling donor, while the remaining 77 patients received an unrelated donor transplantation (HLA-matched in 66 [49%] patients, and HLA-mismatched in 11 [8%] patients). The HCT-CI was 0 in 44 patients (32%), 1–2 in 34 patients (25%) and ≥ 3 in 58 patients (43%). Regarding specific comorbidities that may be associated with endothelial dysfunction, 10 patients had cardiac dysfunction (cardiomyopathy: $N=5$; coronary artery disease: $N=5$), and one patient had peripheral vascular disease. No patients were noted to have moderate-severe renal dysfunction. Forty-four patients had received a prior autologous-stem cell transplantation. Other characteristics are shown in Table 1.

The median (range) of EASIX-pre score for each quartile was 0.57 (0.39–0.78) for quartile 1 (Q1), 1.02 (0.81–1.19) for quartile 2 (Q2), 1.37 (1.21–1.72) for quartile 3 (Q3) and 3.00 (1.79–27.83) for quartile 4 (Q4). When comparing baseline and treatment characteristics, there were no significant differences noted between patients in the four quartiles. In particular, the graft dose ranged from 0.78–15.2 CD34/kg and there was no significant difference in CD34 dose between the 4 quartiles. Furthermore, we did not find a significant correlation between CD34 dose and EASIX at day 30 ($p=0.09$).

Since the platelet count is part of the EASIX formula, we next examined the number of platelet transfusions patients received. One hundred and ten patients had a transfusion before day 100, and 108 patients had a transfusion before day 30. We found that the number of transfusions received by day 30 was associated with the EASIX score at day 30. The median EASIX score (IQR) was 1.6 (1.1, 2.5) in patients who received no transfusion ($n=44$), 2.1 (1.5, 4.9) in those receiving one ($n=24$), 2.3 (1.4, 3.8) in those receiving 2–4 ($n=50$) and 4.4 (2.0, 10.1) in those receiving >5 ($n=34$; $p<0.001$). Furthermore, when examining transfusions by EASIX quartiles, patients in the 4th quartile had significantly more transfusions (3.0; IQR 2.0, 4.0) than those in the other 3 quartiles (1.0 [0.0, 3.8], 1.0 [0.2, 4.0], and 1.0 [0.0, 3.8], for Q1, Q2 and Q3, respectively; $p=0.007$). These findings are consistent with a higher degree of thrombocytopenia in patients with higher EASIX scores despite receiving transfusions.

Acute graft-versus-host disease (GVHD)

Eighty-eight patients developed acute GVHD (Table 2). The 1-year cumulative incidences of grades 1–4, 2–4, and 3–4 acute GVHD were 56.6% (95% CI, 48.3–64.1), 44.1% (95% CI, 36.0–51.8) and

Table 1. Patients' characteristics for whole population and based on EASIX pre-transplantation.

Patient characteristics	Q1	Q2	Q3	Q4	Overall cohort n (%)
Sample size	34	35	33	34	152 ^a
Median age at transplantation, years (range)	53.5 (23–75)	54.1 (24–68)	58.6 (27–58)	55.6 (28–78)	54 (23–78)
Disease (%)					
NHL	19	25	22	25	104 (68)
CLL	3	5	7	6	24 (16)
HD	9	5	4	2	20 (13)
ALL	3	- -	- -	1	4 (3)
Status at transplantation (%)					
CR	24	21	16	17	84 (55)
PR	9	11	16	10	51 (34)
SD	- -	1	- -	2	4 (3)
PD	1	2	1	5	13 (9)
HCT-CI score (%)					
0	9	17	10	8	49 (32)
1–2	10	7	9	8	41 (27)
> = 3	15	11	14	18	62 (41)
Sex (%)					
Male	24	22	23	25	106 (70)
Female	10	13	10	9	46 (30)
Donor type (%)					
HLA-identical related	15	19	13	11	64 (42)
HLA-matched unrelated	18	14	14	21	74 (49)
HLA-mismatched unrelated	1	2	6	2	14 (9)
Conditioning Regimen (%)					
NMA	23	24	27	26	112 (74)
RIC	11	11	6	8	40 (26)
Conditioning Regimen ^a (%)					
Cy/Flu/TBI	8	11	7	8	38 (25)
Cy/Flu/TBI/Rituximab	15	13	20	17	72 (47)
Mel/Flu	10	6	4	3	27 (18)
Cy/Flu/Thio/TBI	1	4	- -	3	8 (5)
Other	- -	1	2	3	7 (5)
Rituximab (%)					
Yes	15	13	20	17	74 (49)
No	19	22	13	17	78 (51)
Stem Cell Source (%)					
PBSC	34	35	33	33	150 (99)
BM	- -	- -	- -	1	2 (1)
Prior autologous transplantation (%)	11	8	8	17	46 (30)
Median EASIX score (range)	0.57 (0.39–0.78)	1.02 (0.81–1.19)	1.37 (1.21–1.72)	3.00 (1.79–27.83)	

NHL non-Hodgkin lymphoma, CLL chronic lymphocytic leukemia, HD Hodgkin disease, ALL acute lymphoid leukemia, CR complete remission, PR partial remission, SD stable disease, PD progression of disease, NMA non-myeloablative, RIC reduced intensity, Cy cyclophosphamide, Flu fludarabine, TBI total-body-irradiation, Mel melphalan, Thio thiotepa, PBSC peripheral blood stem cell, BM bone marrow.

^a16 patients were n/a for pre HCT EASIX.

10.5% (95% CI, 6.3–16.0), respectively. When grouped according to the refined MN grading system, 65 patients (73.8%) were classified as standard-risk (SR-GVHD) and 23 (26.1%) as high-risk (HR-GVHD). The day 28 response rate (CR + PR) was 72.6% in SR-GVHD patients and 47.8% in HR-GVHD.

Thrombotic microangiopathy (TMA)

Thirteen patients (2.5%) developed TMA. In the nine patients (69%) who also developed acute GVHD, none achieved a CR after first line GVHD treatment (PR = 4, NR = 2 and progression = 3). Seven patients with TMA died, with GVHD the most common

Table 2. Acute GVHD stage and grade.

(a) GVHD Organ Stage in 88 Patients at Onset of Treatment				
GVHD organ Stage at onset of diagnosis	1	2	3	4
Skin	28 (18%)	17 (11%)	6 (4%)	0
Liver	4 (3%)	0	2 (1%)	0
Lower GI	17 (11%)	13 (85%)	2 (1%)	5 (3%)
Upper GI	28 (18%)	-	-	-
(b) GVHD Clinical Grade in 88 Patients at Onset of Treatment				
	A	B	C	D
I	20	12	0	0
II	0	28	6	0
III	0	12	5	0
IV	0	0	0	5

Some patients experienced more than 1 event.

Table 3. Univariate and multivariate analysis.

Variable	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	OS HR (95% CI) p-value	NRM HR (95% CI) p-value	Acute GVHD Grade HR (95% CI) p-value	OS HR (95% CI) p-value	NRM HR (95% CI) p-value	
Pre-EASIX	1.28 (0.98, 1.66) 0.074	1.60 (1.15, 2.23) 0.008	1–4 1.33 (1.08, 1.64) 0.006 2–4 1.32 (1.05–1.67) 0.019 3–4 1.14 (0.70–1.85) 0.588	1.33 (1.01, 1.74) 0.046	1.64 (1.14, 2.34) 0.009	
EASIX d30	1.39 (1.15, 1.68) 0.001	1.76 (1.38, 2.25) <0.001		1.27 (1.04, 1.54) 0.018	1.65 (1.29, 2.11) <0.001	
EASIX d100	1.39 (1.16, 1.67) <0.001	1.61 (1.27, 2.03) <0.001		1.49 (1.22, 1.81) <0.001	1.65 (1.28, 2.12) <0.001	
Other factors						
C. Regimen						
TBI	0.52 (0.30, 0.91) 0.027	0.60 (0.26, 1.35) 0.233		0.71 (0.34, 1.47) 0.363		
HLA						
Mismatched		3.75 (1.29, 9.87) 0.063			2.68 (0.91, 7.90) 0.175	
HCT-CI						
1-Feb	1.76 (0.80, 3.87)	1.52 (0.55, 4.19)		1.21 (0.49, 2.97)	1.04 (0.34, 3.17)	
≥3	3.35 (1.71, 6.58) <0.001	2.81 (1.17, 6.75) 0.044		3.36 (1.66, 6.79) <0.001	2.32 (0.94, 5.69) 0.094	

cause of death ($n = 3$), followed by relapse ($n = 2$), and organ failure/toxicity ($n = 2$).

Overall survival, relapse and non-relapse mortality

With a median follow-up in surviving patients of 5.4 years (range, 0.8–10), the 1 year and 3-year OS rates were 84.2% (95% CI, 77.3–89.1) and 67.9% (95% CI, 59.6–74.8), respectively. Cumulative incidence of relapse at 1 and 3 years was 19.1% (95% CI, 13.3–25.7) and 27.4% (95% CI, 20.5–34.8), respectively. At last follow up, 62 patients had died. The NRM rates at 1 and 3 years were 7.9% (95% CI, 4.3–12.9) and 16.4% (95% CI, 10.9–22.8), respectively. Three patients died before day 100 (treatment toxicity = 1, disease progression = 1; and acute GVHD = 1). The primary causes of death were relapse/progression of disease in 28 patients (45.2%), GVHD in 26 patients (41.9%), organ failure/toxicity from treatment in 5 patients (8.1%), and other in 2 (3.2%).

EASIX and outcomes

We looked at associations between HCT outcomes and EASIX determined at different time points. In univariate analysis, EASIX-pre was significantly associated with increased NRM (HR = 1.60 [95% CI, 1.15–2.23], $p = 0.008$) and grade 1–4 and 2–4 acute GVHD (HR = 1.33 [95% CI, 1.08–1.64], $p = 0.006$; and (HR = 1.32 [95% CI, 1.05–1.67], $p = 0.019$, respectively), but not with grade 3–4 acute GVHD (HR = 1.14 [95% CI, 0.70–1.85], $p = 0.588$) or OS (HR = 1.28 [95% CI, 0.98–1.66], $p = 0.074$) (Table 3). Furthermore, EASIX-pre was not associated with risk of TMA (HR = 1.43 [95% CI, 0.93–2.21], $p = 0.107$) or relapse (HR = 0.78 [95% CI, 0.54, 1.14], $p = 0.192$). EASIX-d30 and EASIX-d100, were also significantly associated in univariate analysis with higher NRM (HR = 1.76 [95% CI, 1.38–2.25], $p < 0.001$ and HR = 1.61 [95% CI, 1.27–2.03], $p < 0.001$; respectively) and lower OS (HR = 1.39 [95% CI, 1.15–1.68], $p = 0.001$ and HR = 1.39 [95% CI, 1.16–1.67], $p < 0.001$; respectively) (Fig. 1). The other risk factor significantly associated with higher NRM only on

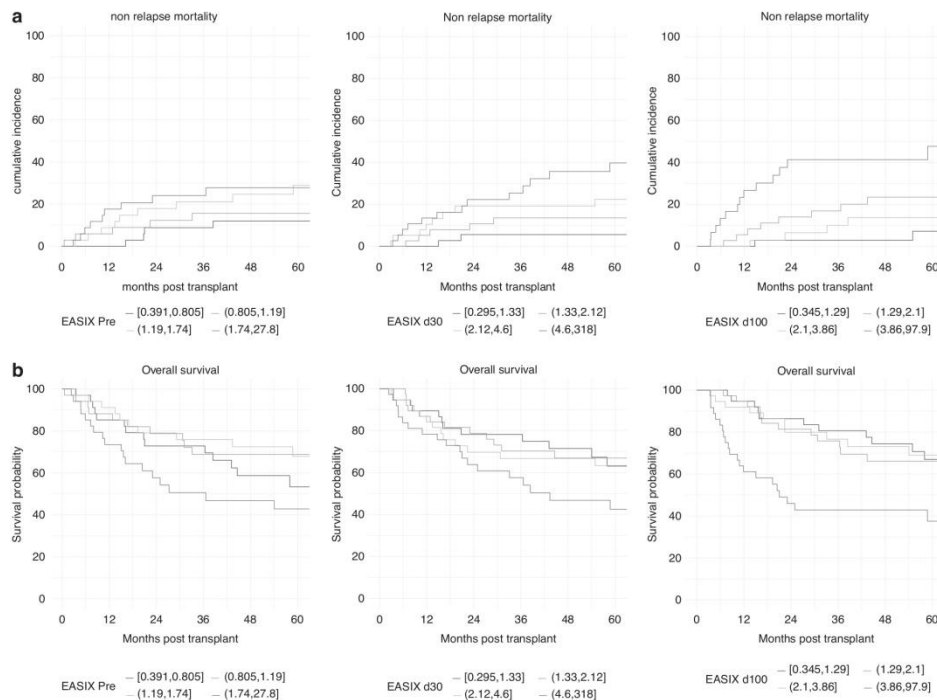


Fig. 1 Non-relapse mortality and overall survival analysis based on EASIX-pre. EASIX-pre, at day 30 and at day 100 predict higher NRM (a) and lower OS (b).

univariate analysis was HCT-Cl ≥ 3 (HR = 2.81 [95% CI, 1.17–6.75], $p = 0.044$). HCT-Cl ≥ 3 was also associated with lower OS (HR = 3.35 [95% CI, 1.71–6.58], $p < 0.001$). The use of TBI in the conditioning regimen was significantly associated with higher OS (HR = 0.52 [0.30–0.91], $p = 0.027$).

In multivariate analysis, EASIX calculated pre-HCT was significantly associated with higher NRM (HR = 1.64, $p = 0.009$) and lower OS (HR = 1.33, $p = 0.046$). Furthermore, EASIX calculated at day 30 and at day 100 was associated with increased NRM (HR = 1.65, $p < 0.001$; and HR = 1.65, $p < 0.001$) and decreased OS (HR = 1.27, $p = 0.018$; and HR = 1.49, $p < 0.001$), independent of HCT-Cl, disease and conditioning regimen.

We next analyzed the relationship between EASIX and day 28 GVHD responses to EASIX-GVHD quartiles (Fig. 2). The day 28 CR rate was 42% among 19 patients in EASIX-GVHD quartile 1 (Q1) in contrast to 5% among 21 patients on EASIX-GVHD quartile 4 (Q4).

We also assessed causes of death by EASIX-d30 quartiles (Fig. 3). Most deaths occurred in the EASIX-d30 Q4 group (22 of 38 patients died) and were primarily due to GVHD (50%) or relapse (27%).

DISCUSSION

In a single center cohort of patients with lymphoid malignancies treated with reduced intensity conditioning and a uniform GVHD prophylaxis, we examined the EASIX score at various time points pre and post HCT by dividing patients into 4 quartiles based on their score and showed that most patients in EASIX-pre quartile 1

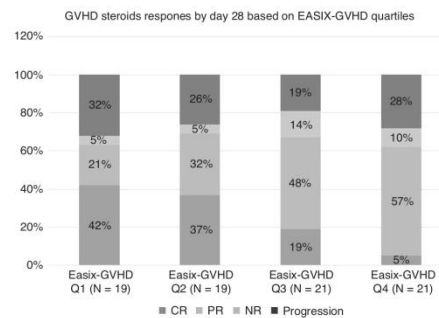


Fig. 2 GVHD steroid responses by day 28 based on EASIX-GVHD quartiles. EASIX was calculated at onset of acute GVHD and patients were divided in 4 quartiles. GVHD responses to treatment were assessed at day 28.

(Q1) or quartile 4 (Q4) remain in the same quartile over time (day 30 and day 100). In contrast, patients in EASIX-pre Q2 and Q3 tend to vary more between different quartiles during transplantation. Furthermore, we showed that higher values of EASIX-pre, EASIX-

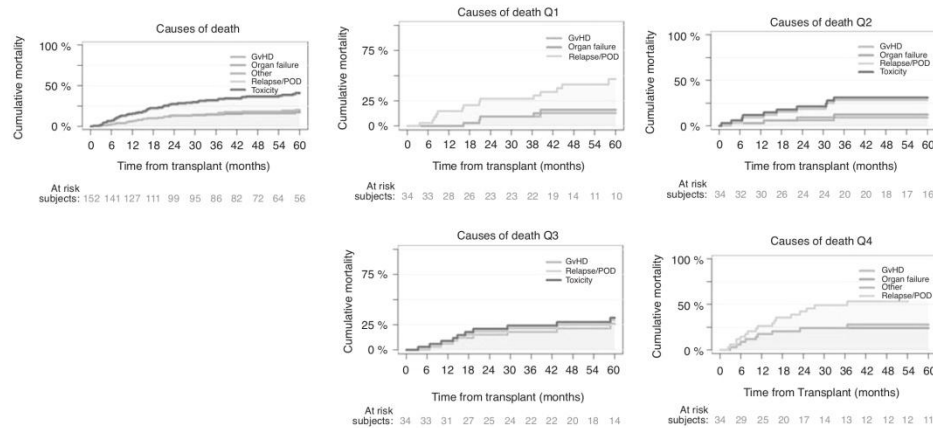


Fig. 3 Causes of death. Causes of death by EASIX-d30 quartiles.

d30 and EASIX-d100 were all independently associated with lower OS and higher NRM. Finally, we showed a difference in responses to 1st line therapy in patients with acute GVHD based on EASIX-GVHD.

Our data concur with previous analyses showing that EASIX is an independent predictor for NRM and inferior survival. In the original study by Luft et al. [18], EASIX evaluated at one timepoint, EASIX-GVHD, was a predictor of higher NRM and lower OS. EASIX-pre has also been validated as a predictor of lower OS after alloHCT [18], and associated both with high-grade fluid overload and OS [32]. This suggests that EASIX can be considered a dynamic variable that may have unique implications along the pre- and post-HCT time course. Furthermore, we and others have now expanded the application of the EASIX score to treatment with chimeric antigen receptor T cells and shown that it can predict severe cytokine release syndrome and neurotoxicity [33, 34].

Our study also showed that EASIX-pre was significantly associated with development of acute GVHD grade 1–4 and 2–4 in the univariate analysis. In the last few years, a number of potential biomarkers have been proposed for acute-GVHD and validated in a number of cohorts [13–16]. The biomarker that seems the most promising in the setting of acute GVHD is ST2 (suppression of tumorigenicity 2). ST2, calculated at day 7 and at day 14 post-AlloHCT, alone [35–37] or in combination with TIM3 (T-cell immunoglobulin mucin-3) [36–38], is a prognostic marker for acute GVHD and NRM. Reg3a (regenerating islet-derived 3-α) and TIM3 have also been validated as prognostic biomarkers of acute GVHD, measured at day 7 and 14 post-AlloHCT [39, 40]. In the setting of TMA, ST2 was shown to be a reliable early biomarker of TMA diagnosis independent of acute-GVHD in several cohorts [41, 42]. However, none of these biomarkers or panels of biomarkers have been validated for routine clinical practice. Furthermore, in the study by Luft et al., ST2 did not correlate with EASIX-pre [43]. However, correlations at other time points, and at onset of GVHD in particular were not studied. The EASIX formula represents an easily accessible tool that can be used outside of the clinical trial setting and could be used in the future to develop new risk-adapted GVHD diagnosis and treatment strategies in AlloHCT. The use of EASIX in this setting will require further validation in well-designed prospective clinical trials.

Our study did have some limitations, the main one being the retrospective nature of the study. While this is a single center

study, our results are consistent with and expand on the results from several other centers. We also chose to study a uniform population in terms of disease and GVHD prophylaxis to decrease potential variability in the study cohort. Finally, some outcomes in particular, such as TMA, had a low event rate in our series and the study was therefore underpowered to detect any association with EASIX. However, a recent study by Luft and colleagues reported an association between EASIX-pre and TMA [43].

Overall, our study confirms the main utility of the EASIX formula approach based on the use of routinely available standard clinical laboratory parameters. While these parameters are non-specific and there may be many confounding factors, such as transfusions, infections or cytotoxic therapies that may affect each individual parameter, the score has now been validated across multiple centers and datasets. In the current study, we further expand on this work and illustrate the dynamic aspects of EASIX over time during the HCT journey as well as showing that the score retains its predictive value over time.

DATA AVAILABILITY

All data underlying the results are available as part of the article and no additional source data are required.

REFERENCES

- Palomo M, Fernandez-Aviles F, Ghita G, Rovira M, Fernandez-Aviles F, Martine C, et al. "Endothelial Dysfunction after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Role of the Conditioning Regimen and the Type of Transplantation." *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:985–93.
- DeLeve LD, Ito Y, Bethea NW, McCuskey MK, Wang X, McCuskey RS. "Embolization by sinusoidal lining cells obstructs the microcirculation in rat sinusoidal obstruction syndrome." *Am J Physiol Liver Physiol* 2015;284:G1045–G1052.
- Postakcioglu M, Kim HT, Obut F, Yilmam OA, Yang J, Byun BC, et al. "Impact of Thrombotic Microangiopathy on Renal Outcomes and Survival after Hematopoietic Stem Cell Transplantation." *Biol Blood Marrow Transplant* 2018;24:2344–53.
- Afessa B, Tefferi A, Litzow MR, Krowka MJ, Wylam ME, Peters SG. "Diffuse Alveolar Hemorrhage In Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients." *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:641–5.
- Biedermann BC, Sahner S, Gregor M, Tsakiris DA, Jeanneret C, Pober JS, et al. "Endothelial injury mediated by cytotoxic T lymphocytes and loss of microvessels in chronic graft versus host disease." *Lancet*. 2002;359:2078–83.
- Biedermann BC. "Vascular endothelium and graft-versus-host disease." *Best Pract Res Clin Haematol* 2008;21:129–38.

7. Mir E, Palomo M, Rovira M, Pereira A, Escobar G, Penack O, et al. Endothelial damage is aggravated in acute GVHD and could predict its development. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52:1317–25.
8. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. "Graft-versus-host disease,". *Lancet*. 2009;373:1550–61.
9. Westin JR, Saliba RM, De Lima M, Alousi A, Hosing C, Qazilbash MH, et al. "Steroid-Refractory Acute GVHD: Predictors and Outcomes,". *Adv. Hematol*. 2011.
10. Luft T, Dietrich S, Falk C, Conzelmann M, Hess M, Benner A, et al. "Steroid-refractory GVHD: T-cell attack within a vulnerable endothelial system,". *Blood*. 2011;118:1685–93.
11. George JN, Li X, McMinn JR, Terrell DR, Vesely SK, Selby GB, et al. "Thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome following allogeneic HPC transplantation: a diagnostic dilemma. *Transfusion*. 2004;44:294–304.
12. Zeisbrich M, Becker N, Benner A, Radujkovic A, Schmitt K, Beimler J, et al. "Transplant-associated thrombotic microangiopathy is an endothelial complication associated with refractoriness of acute GVHD,". *Bone Marrow Transplant* 2017;52:1399–405.
13. Ali AM, DiPersio JF, Schroeder MA. "The Role of Biomarkers in the Diagnosis and Risk Stratification of Acute Graft-versus-Host Disease: A Systematic Review,". *Biol Blood Marrow Transplant* 2016;22:1552–64.
14. Levine JE, Braun TM, Harris AC, Holler E, Taylor A, Miller H, et al. "A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: A multicentre study,". *Lancet Haematol* 2015;2:e21e–29.
15. Paczesny S. "Acute Graft-Versus-Host Disease Prognosis: Are Biomarkers Ready for Preemptive Clinical Trials?,". *Clin Chem*. 2017;63:1561–3.
16. Paczesny S. "Biomarkers for posttransplantation outcomes,". *Blood*. 2019;131:2193–205.
17. MacMillan ML, Robin M, Harris AC, DeFor TE, Martin PJ, Alousi A, et al. "A refined risk score for acute graft-versus-host disease that predicts response to initial therapy, survival, and transplant-related mortality,". *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21:761–7.
18. Luft T, Benner A, Jodele S, Dandoy CE, Storb RF, Gooley TA, et al. "It Is Easix to Predict Non-Relapse Mortality (NRM) of Allogeneic Stem Cell Transplantation (alloSCT)," . *Blood*. 2016;128:519.
19. Luft T, Benner A, Jodele S, Dandoy CE, Storb R, Gooley T, et al. "EASIX in patients with acute graft-versus-host disease: a retrospective cohort analysis,". *Lancet Haematol* 2017;4:e414–e423.
20. Ruutu T, Barosi G, Benjamin RJ, Clark RE, George JN, Gratwohl A, et al. "Diagnostic criteria for hematopoietic stem cell transplant-associated microangiopathy: results of a consensus process by an International Working Group,". *Haematologica*. 2007;92:95–100.
21. Verma SK, Molitoris BA. "Renal Endothelial Injury and Microvascular Dysfunction in Acute Kidney Injury,". *Semin Nephrol* 2015;35:96–107.
22. Joist JH, Baker RK. "Loss of 111Indium as indicator of platelet injury,". *Blood*. 1981;58:350–3.
23. Coppo P, Schwarzwinger M, Buffet M, Wynckel A, Clabault K, Presne C, et al. "Predictive features of severe acquired ADAMTS13 deficiency in idiopathic thrombotic microangiopathies: The French TMA reference center experience,". *PLoS One*. 2010;5:e10208.
24. Moreau D, Timsit JF, Vesin A, Garrouste-Orgeas M, de Lassence A, Zahar JR, et al. Platelet Count Decline: An Early Prognostic Marker in Critically Ill Patients With Prolonged ICU Stays,". *Chest*. 2007;131:1735–41.
25. Ceberio I, Devlin SM, Sauter C, Barker JN, Castro-Malaspina H, Giral S, et al. "Sirolimus, tacrolimus and low-dose methotrexate based graft-versus-host disease prophylaxis after non-ablative or reduced intensity conditioning in related and unrelated donor allogeneic hematopoietic cell transplant,". *Leuk Lymphoma*. 2015;56:663–70.
26. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giral S, Lazarus H, Ho V, et al. "Defining the Intensity of Conditioning Regimens: Working Definitions,". *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:1628–33.
27. Hobbs GS, Kaur N, Hilden P, Ponce D, Cho C, Castro-Malaspina HR, et al. "A novel reduced intensity conditioning regimen for patients with high-risk hematological malignancies undergoing allogeneic stem cell transplantation,". *Bone Marrow Transplant* 2016;51:1010–2.
28. Sorror ML, Logan BR, Zhu X, Rizzo JD, Cooke KR, McCarthy PL, et al. "Prospective Validation of the Predictive Power of the Hematopoietic Cell Transplantation Comorbidity Index: A Center for International Blood and Marrow Transplant Research Study,". *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21:1479–87.
29. E, Casper JT, Carter SL, van Burik JA, Hurd D, Mendizabal AM, et al. "A Scheme for Defining Cause of Death and Its Application in the T Cell Depletion Trial,". *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:1469–76.
30. Rowlings PA, Przpiorka D, Klein JP, Gale RP, Passweg JR, Henslee-Downey PJ, et al. "IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: Retrospective comparison with Glucksberg grade,". *Br J Haematol* 1997;97:855–64.
31. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Wagner JE, DeFor TE, Burns LJ, Ramsay NK, et al. "Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: Comparison of grading systems,". *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:387–94.
32. Varma A, Rondon G, Srou SA, Chen J, Ledesma C, Champlin RE, et al. "Endothelial Activation and Stress Index (EASIX) Is Associated with Fluid Overload and Survival in Recipients of Allogeneic Stem Cell Transplantation,". *Biol Blood Marrow Transplant* 2019;25:32–33.
33. Pennisi M, Sanchez-Escamilla M, Flynn JR, Shouval R, Alarcon Tomas A, Silverberg ML, et al. "Modified EASIX predicts severe cytokine release syndrome and neurotoxicity after chimeric antigen receptor T cells,". *Blood Adv* 2021;5:3397–406.
34. Greenbaum U, Strati P, Saliba RM, Torres J, Rondon G, Nieto Y, et al. "CRP and ferritin in addition to the EASIX score predict CAR-T-related toxicity,". *Blood Adv* 2021;5:2799–806.
35. Kanakry CG, Bakoyannis G, Perkins SM, et al. "Plasma-derived proteomic biomarkers in human leukocyte antigen-haploidentical or human leukocyte antigen-matched bone marrow transplantation using post-transplantation cyclophosphamide,". *Haematologica*. 2017;102:932–40.
36. Kanakry CG, Bakoyannis G, Perkins SM, McCurdy SR, Vulliamis A, Warren EH, et al. "High day 28 ST2 levels predict for acute graft-versus-host disease and transplant-related mortality after cord blood transplantation,". *Blood*. 2019;125:199–206.
37. Vander Lugt MT, Braun TM, Hanash S, Ritz J, Ho VT, Antin JH, et al. "ST2 as a Marker for Risk of Therapy-Resistant Graft-versus-Host Disease and Death,". *N. Engl J Med* 2013;369:529–39.
38. Abu Zaid M, Wu J, Wu C, Logan BR, Yu J, Cutler C, et al. "Plasma biomarkers of risk for death in a multicenter phase 3 trial with uniform transplant characteristics post-allogeneic HCT,". *Blood*. 2017;129:162–71.
39. McDonald GB, Tabellini L, Storer BE, Lawler RL, Martin PJ, Hansen JA. "Plasma biomarkers of acute GVHD and nonrelapse mortality: predictive value of measurements before GVHD onset and treatment,". *Blood*. 2019;126:113–21.
40. Hartwell MJ, Özbek U, Holler E, Renteria AS, Major-Monfried H, Reddy P, et al. "An early-biomarker algorithm predicts lethal graft-versus-host disease and survival Find the latest version: An early-biomarker algorithm predicts lethal graft-versus-host disease and survival,". *JCI Insight*. 2018;2:0–9.
41. Rotz SJ, Luebering N, Dixon BP, Gavrilaki E, Brodsky RA, Dandoy CE, et al. "In vitro evidence of complement activation in transplantation-associated thrombotic microangiopathy,". *Blood Adv* 2019;1:1632–4.
42. Rotz SJ, Dandoy CE, Davies SM. "ST2 and Endothelial Injury as a Link between GVHD and Microangiopathy,". *N. Engl J Med* 2017;376:1189–90.
43. Luft T, Benner A, Terzer T, Jodele S, Dandoy CE, Storb R, et al. "EASIX and mortality after allogeneic stem cell transplantation,". *Bone Marrow Transplant* 2019;55:553–61.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported in part by National Institutes of Health award numbers P01 CA23766 and NIH/NCI Cancer Center Support Grant P30 CA008748. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health. Dr. Sanchez-Escamilla was supported by Research Institute of Marques de Valdecilla (IDIVAL) Lopez-Albo-Wenceslao Grant (WLA17/03).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors contributed substantially to the manuscript. M.S.E and M.A.P contributed to the study proposal and design. M.S.E, M.M and A.A contributed to data acquisition. P.H and D.S contributed to data analysis and interpretation. M.S.E, M.A.P and M.S drafted the Article and all authors critically revised and approved the manuscript.

COMPETING INTERESTS

MAP reports honoraria from Abbvie, Allovir, Astellas, Bristol-Myers Squibb, Celgene, Equilium, ExeVir, Incyte, Karyopharm, Kite/Gilead, Merck, Miltenyi Biotec, MorphoSys, Novartis, Nektar Therapeutics, Omeros, OrcaBio, Takeda, and VectivBio AG, Vor Biopharma. He serves on DSMBs for Cidara Therapeutics, Medigene, Sella Life Sciences, and Servier, and the scientific advisory board of NexImmune. He has ownership interests in NexImmune and Omeros. He has received institutional research support for clinical trials from Incyte, Kite/Gilead, Miltenyi Biotec, Nektar Therapeutics, and Novartis. MS served as a paid consultant for McKinsey & Company, Angiocrine Bioscience, Inc., and Omeros Corporation; received research funding from Angiocrine Bioscience, Inc., and Omeros Corporation; served on ad hoc advisory boards for Kite – A Gilead Company; and received honoraria from iHealth and Medscape for CME-related activity. The other authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Correspondence and requests for materials should be addressed to Miriam Sanchez-Escamilla or Miguel-Angel Perales.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

7.2. EASIX MODIFICADO PREDICE EL SÍNDROME DE LIBERACIÓN DE CITOCINAS GRAVE Y LA NEUROTOXICIDAD TRAS EL TRATAMIENTO CON CÉLULAS CAR-T.

7.2.1. Diseño del estudio

Este estudio retrospectivo incluye un total de 118 pacientes con LAL-B tratados en el MSKCC con el CAR-T 1928z dentro del ensayo clínico fase I (#NCT01044069) de 2010 a 2016, y con LBDCG tratados consecutivamente en el mismo centro con los CAR-T comerciales disponibles axicabtagene ciloleucel (axi-cel, Yescarta, Kite/Gilead) o tisagenlecleucel (tisa-cel, Kymriah, Novartis), desde su aprobación por la FDA en febrero de 2018 hasta agosto de 2019, descritos previamente por Wudhikarn et al¹⁰⁰.

Las características demográficas, clínicas y datos analíticos, fueron recogidos retrospectivamente de las historias clínicas. El SLC y el ICANS fueron graduados según los criterios ASTCT⁶⁹ y fueron considerados graves si el grado era superior o igual a 3. Dado que los pacientes con LAL-B fueron tratados previo a la publicación de los criterios ASTCT, se realizó una revisión retrospectiva para recodificar el grado de SLC e ICANS en esta cohorte⁸⁰. Para el cálculo de EASIX/s-EASIX/m-EASIX, se recogieron los datos disponibles de LDH, PCR, creatinina y plaquetas desde el día -14 al día +14 de la infusión del CAR-T para cada paciente. Se obtuvo aprobación para este estudio por parte de las entidades reguladoras del MSKCC.

7.2.2. Análisis estadístico

Tal y como está publicado en el artículo original de Thomas Luft⁹⁵, para todas las evaluaciones de EASIX/s-EASIX/m-EASIX se realizó un análisis de puntos de referencia (*landmark*) para cada punto temporal correspondiente. Se aplicó una transformación logarítmica utilizando la base 2 (log2) a todas las variables de EASIX con el objetivo de reducir sesgos y también para poder comparar los resultados con el artículo original de Thomas Luft. Así pues, un aumento en una unidad en log2 de EASIX se asocia con una duplicación (aumento de una vez) de EASIX en la escala original. Las fórmulas EASIX/s-EASIX/m-EASIX fueron calculadas en

diferentes momentos considerando la relevancia clínica de los mismos en la estimación y manejo de las posibles toxicidades asociadas a la terapia CAR-T: pre-infusión, al inicio de la linfodepleción, el día -1 pre-infusión (o el día de la infusión si no estaba disponible), y los días +1, +3 y al inicio del SLC post-infusión.

Los resultados de EASIX se han representado por cuartiles debido a que aún no disponemos de un punto de corte establecido para esta fórmula. Las respuestas globales fueron evaluadas entre el día +30 y el día +90 tras la infusión. Para los pacientes con LBDCG, la respuesta fue evaluada por PET-TAC o biopsia, en función de la indicación clínica y de acuerdo a los Criterios de Lugano¹⁰¹. Los pacientes con LAL-B que obtuvieron una RC morfológica con persistencia de enfermedad mínima residual (EMR) por citometría de flujo multiparamétrica, fueron incluidos en el grupo de RC. La definición de EMR negativa por citometría fue de menos de 0.01% de blastos en médula ósea.

La regresión logística univariante fue utilizada para evaluar la asociación entre los posibles factores predictores y la aparición de SLC e ICANS grave. Asimismo, la regresión logística multivariante fue utilizada en función del resultado del estudio univariante y de la relevancia clínica: enfermedad (LAL-B vs. LBDCG), edad como variable continua, carga tumoral (alta vs. baja). La regresión logística se utilizó también para el resultado de RC, para analizar qué fórmula EASIX se asoció mejor con la obtención de respuesta al CAR-T. Se utilizaron curvas ROC y áreas bajo la curva (AUC) para seleccionar la fórmula con mayor capacidad discriminatoria.

Todos los análisis se realizaron con la **versión 3.6.2 de R**.

7.2.3. Resultados

a) Características de los pacientes y frecuencia de aparición de SLC e ICANS

Se incluyeron un total de 118 pacientes: 53 con LAL-B, habiendo recibido el CAR-T 1928z (#NCT01044069)⁷⁷ y 65 con LBDCG, 44 (68%) habían recibido Axi-cel y 21 (32%) Tisa-cel, según la preferencia del médico responsable. Las características demográficas y clínicas de los pacientes se muestran en la **tabla 1**. La mediana de

edad a la infusión del CAR-T fue de 58 años (rango 20-86), 44 (rango 22-74) y 54 años (rango 20-86) en todos los pacientes, pacientes con LAL-B y pacientes con LBDCG, respectivamente. El ECOG previo a la infusión fue de 0-1 en el 93% de los pacientes de la cohorte global y en el 100% y 86% de los pacientes con LAL-B y linfoma, respectivamente. Más de la mitad de los pacientes (66%) tenían una alta carga tumoral previo a la infusión del CAR-T.

En el **suplemento del artículo original**, la **tabla 1** recoge las tasas de SLC e ICANS según los grados ASTCT, estratificando por tipo de enfermedad y producto CAR-T administrado. Ochenta y tres pacientes desarrollaron SLC de cualquier grado. El SLC grado ≥ 3 ocurrió en el 19% de los pacientes. Cuarenta y siete por ciento de la población global desarrolló algún grado de ICANS, siendo grado ≥ 3 en el 36% de los pacientes. La mediana de aparición de SLCL e ICANS fue de 2 días (RIC 1-4, rango 0-12) y 6 días (RIC 4-8, rango 1-21), respectivamente. La mediana de aparición de SLC grave fue de 4 días (RIC 2-7, rango 0-12). Los datos para calcular la mediana de aparición de ICANS grave sólo estaba disponible en un pequeño grupo de pacientes por lo cual no se incluyó este dato en el estudio.

b) Asociación de EASIX/s-EASIX/m-EASIX con el desarrollo y gravedad del SLC e ICANS

EASIX, s-EASIX, y m-EASIX fueron calculados para cada paciente en diferentes momentos pre y post-infusión del CAR-T. La mediana de las diferentes fórmulas EASIX en función de la aparición o no de SLC se muestra en la **tabla 2 del material suplementario**. Nuestro estudio observó que las 3 fórmulas de EASIX calculadas previo a la infusión (al inicio de la linfodepleción y el día -1) se asociaron con el desarrollo de SLC en cualquier grado (**suplemento Tabla 3**) y, mucho más importante, con el desarrollo de SLC grave (ver **Figura 1**). Sin embargo, ninguna de las fórmulas calculadas pre-infusión se asoció con el desarrollo de ICANS. Al observar los resultados de EASIX/s-EASIX/m-EASIX calculados precozmente post-infusión (día +1 y +3), se encontró una asociación significativa entre las 3 fórmulas y el desarrollo de SLC e ICANS en cualquiera de sus grados (**suplemento Tabla 3**).

Las 3 fórmulas se asociaron a su vez con el desarrollo de SLC e ICANS grave (ver **Figura1**).

c) El descenso de la cifra de plaquetas y el aumento de la PCR se asociaron con la aparición de SLC e ICANS

Para investigar la contribución de manera individual de cada variable incluida en las fórmulas EASIX, se exploró la asociación entre creatinina, LDH, cifra de plaquetas y PCR en el momento de aparición de SLC e ICANS (**Tabla 2**). El incremento en la cifra de PCR en cualquiera de los momentos analizado, sea asoció con el desarrollo de SLC e ICANS grave. Cifras más altas de plaquetas se asociaron a una menor toxicidad en cualquier momento. De lo contrario, no se observó asociación entre las cifras de LDH o creatinina y la aparición de SLC e ICANS grave.

d) Selección de la fórmula m-EASIX como la mejor predictora de complicaciones tras la infusión CAR-T

Se realizó un análisis de curvas ROC estimando las AUC para EASIX/s-EASIX/m-EASIX calculados en los diferentes momentos del análisis observando una asociación significativa en el análisis de regresión lineal con el desarrollo de SLC o ICANS grave (**Figura 2**). Las 3 fórmulas confirmaron ser buenas predictoras de SLC grave al inicio de la linfodepleción (AUC 77.3%, 82.1%, 80.4%, respectivamente), al día -1 (AUC 71.8%, 74.5%, 73%, respectivamente), al día +1 (AUC 72.4%, 76.4%, 75.4%, respectivamente), y al día +3 post-infusión (AUC 79.7%, 80.9%, 80.2%, respectivamente) (**Figura 2, a-b-c-d**). Los valores de m-EASIX al día +3 post-infusión, mostraron la mayor capacidad de discriminación para detectar ICANS grave (AUC 68%, 68.4%, 73% para EASIX, s-EASIX, m-EASIX, respectivamente) (**Figura 2, f**). Dado que en el análisis ROC ninguna de las fórmulas mostró superioridad y considerando que la cifra de plaquetas y la PCR mostraron las mayores asociaciones con la predicción de SLC e ICANS grave en el análisis individual, y teniendo en cuenta que m-EASIX en el día +3 mostró la mayor asociación con la predicción de ICANS grave en comparación con el resto de fórmulas, **seleccionamos la fórmula m-EASIX (que incluye PCR en lugar de**

creatinina) como el mejor predictor temprano de toxicidad grave en pacientes tratados con células CAR-T.

e) m-EASIX como biomarcador precoz de SLC e ICANS grave

A continuación, el estudio se centra en el análisis de la fórmula m-EASIX. La **Figura 3** muestra la distribución de m-EASIX analizada en todos los pacientes en los diferentes momentos pre y post-infusión, mostrando un incremento progresivo de los valores medios para los pacientes que presentaron: ningún síntoma, síntomas leves (SLC o ICANS grado 1-2) o síntomas graves (SLC o ICANS grado 3-5) de SLC e ICANS.

Además, se exploró la asociación entre m-EASIX y las características de los pacientes. En cualquiera de los momentos del análisis, valores más bajos de m-EASIX se asociaron con baja carga tumoral, mientras que la aparición de fiebre durante los 14 días previos a la infusión del CAR-T se asoció con valores más altos de m-EASIX. No se mostró asociación entre la edad, el diagnóstico (LAL-B vs. LBDCG) y el ECOG (0-1 vs. ≥ 2) y la fórmula m-EASIX (**Tabla 4 del suplemento**). En el análisis multivariante para la predicción de SLC grave, tras ajustar por otros factores de riesgo pre-infusión de desarrollo de SLC grave (tipo de enfermedad, carga tumoral, edad) m-EASIX pre-infusión persistió como predictor significativo de SLC grave (al inicio de la linfodeplección: OR 1.38, 95%IC 1.11-1.85, $p=0.01$; en el día -1: OR 1.21, 95%IC 1.00-1.48, $p=0.05$). La fórmula m-EASIX mostró la mayor área bajo la curva para asociación con SLC grave al inicio de la linfodeplección.

f) Subanálisis de m-EASIX y SLC e ICANS grave por tipo de enfermedad (LAL-B y LBDCG)

Finalmente, se analizó el impacto de m-EASIX en el desarrollo de SLC e ICANS grave según el tipo de enfermedad (**Tabla 5 del suplemento**). De los 53 pacientes con LAL-B, 15 pacientes (28%) desarrollaron SLC grave y 24 (45%), ICANS grave, respectivamente. m-EASIX permaneció como predictor significativo de SLC grave en cualquiera de los momentos analizados. De los 65 pacientes con LBDCG, los efectos adversos graves fueron menos frecuentes (7 pacientes desarrollaron SLC grave y 14 pacientes ICANS grave). Sólo se mantuvo la significación estadística con

m-EASIX calculado en el día +3 de la infusión para la predicción de SLC e ICANS grave.

g) Asociación de m-EASIX con la eficacia del CAR-T

Todos los pacientes fueron evaluados para la respuestas al tratamiento salvo uno que falleció por SLC grado 5 en el día +5. De los 117 pacientes analizados, 89 pacientes (76%) obtuvieron respuesta al tratamiento entre el día 30 y el día 90, 79 de ellos (67%) obtuvieron una RC como mejor respuesta. De los pacientes con LAL-B, 44 (83%) obtuvieron una RC, con EMR negativa en 35 pacientes (66%). Treinta y cinco pacientes (54%) con LBDCG obtuvieron una RC al día 90 de la infusión. Al explorar la asociación de las 3 fórmulas EASIX con la obtención de RC como mejor respuesta, encontramos que valores más altos de m-EASIX se asociaron con menores *odds* para la respuesta al CAR-T, sugiriendo que los pacientes con valores más altos de m-EASIX obtenían peores respuestas al tratamiento (**Tabla 3**).

Los resultados de esta parte del trabajo de investigación fueron publicados en forma de artículo original en la revista “Blood Advances”.

A continuación, se aporta una copia del trabajo y del material suplementario, tal y como fue publicado.

Modified EASIX predicts severe cytokine release syndrome and neurotoxicity after chimeric antigen receptor T cells

Martina Pennisi,^{1,3,*} Miriam Sanchez-Escamilla,^{1,4,*} Jessica R. Flynn,⁵ Roni Shouval,¹ Ana Alarcon Tomas,¹ Mari Lynn Silverberg,¹ Connie Batlevi,⁶ Renier J. Brentjens,⁷ Parastoo B. Dahi,^{1,8} Sean M. Devlin,⁵ Claudia Diamante,⁹ Sergio Giralto,^{1,8} Elizabeth F. Halton,⁹ Tania Jain,¹ Molly Maloy,¹ Elena Mead,¹⁰ Maria Lia Palomba,⁶ Josel Ruiz,¹ Bianca Santomasso,¹¹ Craig S. Sauter,^{1,8} Michael Scordo,^{1,8} Gunjan L. Shah,^{1,8} Jae H. Park,⁷ Lucrecia Yanez San Segundo,^{1,4,†} and Miguel-Angel Perales^{1,8,†}

¹Adult Bone Marrow Transplant Service, Department of Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY; ²Oncology and Onco-Hematology Department, University of Milan, Milan, Italy; ³Hematology Service, Oncology and Hematology Department, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy; ⁴Department of Hematology, University Hospital Marqués de Valdecilla – IDIVAL, Santander, Spain; ⁵Department of Epidemiology and Biostatistics, ⁶Lymphoma Service, Department of Medicine, and ⁷Leukemia Service, Department of Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY; ⁸Department of Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, NY, and ⁹Cellular Therapeutics Center, ¹⁰Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, and ¹¹Department of Neurology, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY

Key Points

- m-EASIX calculated before and early after CAR T-cell infusion can predict severe CRS and ICANS before the onset of severe symptoms.
- m-EASIX includes laboratory parameters routinely available in CAR T-cell clinical practice and can be easily calculated at bedside.

Patients who develop chimeric antigen receptor (CAR) T-cell–related severe cytokine release syndrome (CRS) and immune effector cell–associated neurotoxicity syndrome (ICANS) exhibit hemodynamic instability and endothelial activation. The EASIX (Endothelial Activation and Stress Index) score (lactate dehydrogenase [LDH; U/L] $\times$ creatinine [mg/dL]/platelets [PLTs; 10^9 cells/L]) is a marker of endothelial damage that correlates with outcomes in allogeneic hematopoietic cell transplantation. Elevated LDH and low PLTs have been associated with severe CRS and ICANS, as has C-reactive protein (CRP), while increased creatinine is seen only in a minority of advanced severe CRS cases. We hypothesized that EASIX and 2 new modified EASIX formulas (simplified EASIX, which excludes creatinine, and modified EASIX [m-EASIX], which replaces creatinine with CRP [mg/dL]), calculated peri-CAR T-cell infusion, would be associated with development of severe (grade ≥ 3) CRS and ICANS. We included 118 adults, 53 with B-acute lymphoblastic leukemia treated with 1928z CAR T cells (NCT01044069) and 65 with diffuse large B-cell lymphoma treated with axicabtagene ciloleucel or tisagenlecleucel. The 3 formulas showed similar predictive power for severe CRS and ICANS. However, low PLTs and high CRP values were the only variables individually correlated with these toxicities. Moreover, only m-EASIX was a significant predictor of disease response. m-EASIX could discriminate patients who subsequently developed severe CRS preceding the onset of severe symptoms (area under the curve [AUC] at lymphodepletion, 80.4%; at day -1 , 73.0%; and at day $+1$, 75.4%). At day $+3$, it also had high discriminatory ability for severe ICANS (AUC, 73%). We propose m-EASIX as a clinical tool to potentially guide individualized management of patients at higher risk for severe CAR T-cell–related toxicities.

Submitted 23 November 2020; accepted 6 April 2021; prepublished online on *Blood Advances* First Edition 26 August 2021; final version published online 7 September 2021. DOI 10.1182/bloodadvances.202003885.

*M.P. and M.S.-E. contributed equally to this study.

†L.Y.S.S. and M.-A.P. contributed equally to this study.

Deidentified individual participant data will be available by specific e-mail request to the corresponding author: peralesm@mskcc.org.

The full-text version of this article contains a data supplement.

© 2021 by The American Society of Hematology

Introduction

The Endothelial Activation and Stress Index (EASIX) score (lactic dehydrogenase [LDH; U/L] $\times$ creatinine [mg/dL]/platelets [PLTs; 10^9 cells/L]) has emerged as a marker of endothelial damage and predictor of survival in patients with acute graft-versus-host-disease after allogeneic hematopoietic cell transplant (allo-HCT).¹ EASIX assessed pre-HCT has also been shown to predict significant fluid overload after transplant and increased risk of acute graft-versus-host-disease and to be associated with non-relapse mortality and overall survival after allo-HCT.²⁻⁵

Patients who develop chimeric antigen receptor (CAR) T-cell-related severe cytokine release syndrome (CRS) and immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome (ICANS) exhibit hemodynamic instability and coagulopathy, with evidence of endothelial activation and increased blood-brain barrier permeability.⁶ Several inflammatory cytokines and markers of coagulopathy have been shown to correlate with the onset of severe CRS and/or ICANS, such as interferon- γ , interleukin-6 (IL-6), IL-1, IL-10, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and angiotensin-2 (Ang-2).⁶⁻⁹ Among routinely available laboratory tests, LDH, C-reactive protein (CRP), fibrinogen, PLTs, and ferritin have been associated with severe CRS and severe neurotoxicity.^{6,7,10-13}

We hypothesized that the EASIX score, as a marker for endothelial damage, would be able to predict the onset of severe CRS and/or ICANS in patients receiving CAR T cells. Creatinine, one of the components of EASIX, however, plays a limited role as a biomarker of CAR T-cell-related toxicities, with elevation in a minority of patients who have already developed severe symptoms of CRS.¹⁴ Therefore, we further hypothesized that 2 modified EASIX formulas, the simplified EASIX (s-EASIX), which excludes creatinine, and the modified EASIX (m-EASIX), which replaces creatinine with CRP (mg/dL), would better estimate the risk of developing severe CRS and ICANS after CAR T-cell infusion. Therefore, we calculated EASIX/s-EASIX/m-EASIX scores at different time points before and early after infusion in recipients of CAR T cells in order to investigate their association with CRS and ICANS.

Methods

Study population and data collection

This retrospective analysis included adult patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) enrolled at our center in a phase 1 trial of 1928z CAR T cells from 2010 through 2016 (#NCT01044069),¹² and consecutive patients with non-Hodgkin large B-cell lymphoma (LBCL) treated at our center with commercially available axicabtagene ciloleucel (Yescarta, Kite/Gilead) or tisagenlecleucel (Kymriah, Novartis), starting after US Food and Drug Administration approval from February 2018 through August 2019, as recently described by Wudhikarn et al.¹⁵ All patients received CAR T cells after lymphodepleting chemotherapy, according to the Food and Drug Administration's recommendations for LBCL, and protocol directed for B-ALL, as previously described.¹² Demographic, clinical, and laboratory data were retrospectively extracted from electronic medical records. CRS and ICANS were graded according to the American Society for Transplantation and Cellular Therapy (ASTCT) grading system¹⁶ and were considered severe if grade ≥ 3 . CRS and ICANS data

were collected prospectively for patients with LBCL. Since the B-ALL cohort was treated before the introduction of the ASTCT grading, a chart review was conducted to retrospectively grade CRS and ICANS, as previously described.¹⁷ For patients with lymphoma, disease burden was evaluated based on the last imaging before CAR T-cell infusion. This was performed after treatment in 43 of 44 patients who received bridging therapy. One patient with progressive stage 4 disease received a brief course of steroids and was considered as having high disease burden in the absence of reimaging. To calculate EASIX/s-EASIX/m-EASIX formulas, we collected all available LDH, CRP, creatinine and PLTs values starting from day -14 to day $+14$ after CAR T-cell infusion for each patient. Written informed consent for treatment was obtained from all patients. Approval for this retrospective review was obtained from Memorial Sloan-Kettering Cancer Center's Institutional Review and Privacy Board. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Aims of the study

The study's primary objective was to investigate if the EASIX/s-EASIX/m-EASIX formulas would predict severe CRS or ICANS. The secondary objectives included (1) exploration of the correlation of EASIX/s-EASIX/m-EASIX scores with the rates of complete response (CR) and best overall response rate (ORR) to CAR T-cell therapy, (2) selection of the formula with the best predictive power for the primary outcome, and (3) assessment of the selected formula to predict severe CRS and ICANS in disease subgroups (B-ALL and LBCL).

Statistical analysis

As published in the original report, a log transformation using base 2 (log2) was applied to all the EASIX/s-EASIX/m-EASIX scores to reduce skewness. A 1-unit increase in log2 EASIX was associated with a doubling (onefold increase) of EASIX on the original scale. EASIX/s-EASIX/m-EASIX scores were calculated at specific time points considered clinically relevant for estimating and managing the risk of toxicities: preinfusion, at start of lymphodepletion, and day -1 (or day 0, if not available); and postinfusion, days $+1$ and $+3$, and onset of CRS symptoms. Best overall response was assessed between day $+30$ and day $+90$ after infusion. For patients with LBCL, response was assessed by positron emission tomography/computed tomography or biopsy, based on clinical indication, and reported according to the Lugano criteria.¹⁸ Patients with B-ALL who achieved morphologic CR with persistence of minimal residual disease (MRD), as assessed by multiparameter flow cytometry, were included in the CR group. The threshold for MRD negativity was defined as $<0.01\%$ of bone marrow (BM) blasts.¹²

Univariate logistic regression was performed to investigate the association between predictors of interest and the outcomes of severe CRS and ICANS. Multivariate logistic regression was performed based on univariate significance and clinical judgment: disease subtype (B-ALL vs LBCL), age as a continuous variable, and burden of disease (high vs low). Logistic regression was also used for the endpoint of CR to evaluate which EASIX formula was associated with response. Receiver operating characteristic (ROC) curves were built and areas under the curve (AUCs) were evaluated to select the formula with the highest discriminatory ability. Comparison of AUCs at specific time points was performed with ROC tests. All analyses and graphics were produced using R version 3.6.2.

Results

Patient characteristics and CRS-ICANS rates

A total of 118 patients were included (53 with B-ALL, who received 1928z CAR T cells [NCT01044069],¹² and 65 with LBCL); 44 patients (68%) were treated with axicabtagene ciloleucel and 21 patients (32%) were treated with tisagenlecleucel based on physician's preference. Demographic and clinical characteristics of the patients at time of CAR T-cell infusion are outlined in Table 1. Median age was 58 (range, 20-86), 44 (range, 22-74), and 64 (range, 20-86) years in all patients, patients with B-ALL, and patients with LBCL, respectively. The preinfusion ECOG score was 0 to 1 in 93% of patients in the overall cohort and in 100% and 86% of patients with B-ALL and lymphoma, respectively. More than half of the population (66%) had a high disease burden before CAR T-cell infusion, defined as BM blasts percentage >5% for B-ALL (62% of cases) and stage 3 to 4 and/or bulky disease for patients with LBCL (69% of cases).

Supplemental Table 1 summarizes the rates of CRS and ICANS by ASTCT grading, stratified by disease subtype and CAR T-cell product received. Eighty-three percent of patients had CRS of any grade. Grade ≥ 3 CRS occurred in 19% of patients. Forty-seven

percent of the overall population developed ICANS of any grade, with 36% of patients developing grade ≥ 3 ICANS. Median onset of CRS and ICANS symptoms was 2 days (interquartile range [IQR], 1-4; range, 0-12) and 6 days (IQR, 4-8; range, 1-21), respectively. Median onset of severe CRS symptoms was 4 days (IQR, 2-7; range, 0-12). Data to calculate time of median onset of severe symptoms of ICANS was available only in a minority of patients and was thus not reported.

EASIX/s-EASIX/m-EASIX are associated with onset and severity of CRS and ICANS

EASIX, s-EASIX, and m-EASIX were calculated for each patient at (1) preinfusion time points (start of lymphodepletion and day -1), (2) early post-infusion time points (day +1 and +3), and (3) day of onset of CRS. As primary outcome, we investigated the association between the different EASIX scores calculated at various time points and the onset of CRS and ICANS and severe CRS and ICANS. Median scores at different time points stratified by occurrence or nonoccurrence of CRS are shown in supplemental Table 2.

We found that all 3 formulas, when calculated preinfusion (start of lymphodepletion and day -1), were associated with the occurrence of any grade of CRS (supplemental Table 3) and, more importantly, with severe CRS (Figure 1; eg, at day -1, per log2 increase: EASIX: OR, 1.51; 95% CI, 1.12-2.09; $P = .008$; s-EASIX: OR, 1.6; 95% CI, 1.19-2.23; $P = .003$; m-EASIX: OR, 1.26; 95% CI, 1.07-1.50; $P = .009$). Conversely, EASIX/s-EASIX/m-EASIX scores at preinfusion time points were not associated with the onset of ICANS (supplemental Table 3). When we looked at early time points postinfusion (day +1 and +3), a significant association was found between all 3 EASIX scores and CRS of any grade and ICANS of any grade (supplemental Table 3). Moreover, all 3 formulas were associated with the onset of both severe CRS (eg, at day +1, per log2 increase: EASIX: OR, 1.56; 95% CI, 1.15-2.18; $P = .006$; s-EASIX: OR, 1.65; 95% CI, 1.22-2.34; $P = .002$; m-EASIX: OR, 1.31; 95% CI, 1.10-1.60; $P = .004$) and severe ICANS (eg, at day +3, per log2 increase: EASIX: OR, 1.5; 95% CI, 1.17-1.96; $P = .002$; s-EASIX: OR, 1.55; 95% CI, 1.20-2.04; $P = .001$; m-EASIX: OR, 1.36; 95% CI, 1.15-1.65; $P < .001$) (Figure 1).

Lower PLT counts and higher CRP are associated with onset of severe CRS and ICANS

To investigate the contribution of the individual variables included in the formulas, we explored the association of creatinine, LDH, PLTs, and CRP with the onset of severe CRS and ICANS (Table 2). Increased CRP levels at all time points were associated with the onset of severe CRS (eg, per log increase, at start of lymphodepletion: OR, 1.87; 95% CI, 1.21-3.18; $P = .01$) and severe ICANS (eg, per log increase, at day +3: OR, 2.19; 95% CI, 1.44-3.63; $P < .001$). Higher PLT counts were associated with reduced toxicity; at all time points, higher PLTs values were associated with a lower odds of severe CRS (eg, per 10-U increase, at start of lymphodepletion OR, 0.87; 95% CI, 0.80-0.94, $P < .001$), and of severe ICANS (eg, per 10-U increase, at day +3: OR, 0.85; 95% CI, 0.78-0.92; $P < .001$). In contrast, no association was found between LDH or creatinine levels and severe CRS and ICANS.

Table 1. Patient characteristics

Patients	Overall (118)	B-ALL (53)	LBCL (65)
Age (y), median (range)	58 (20-86)	44 (22-74)	64 (20-86)
Sex (male), n (%)	84 (71)	39 (74)	45 (69)
ECOG preinfusion, n (%)			
0-1	109 (93)	53 (100)	56 (86)
2-4	7 (6)	0	7 (11)
Not available	2 (1)	0	2 (3)
Disease burden preinfusion, n (%)			
High	78 (66)	33 (62) [†]	45 (69) [†]
Low	37 (31)	20 (38) [‡]	17 (26) [§]
N/A [¶]	3 (3)	0	3 (5)
IPI preinfusion, n (%)			
Low/intermediate low (0-2)	—	—	39 (60)
High/intermediate high (3-5)	—	—	22 (35)
Not available	—	—	3 (5)
Fever before/during lymphodepletion, n (%)	23 (19)	10 (19)	13 (20)
Lymphodepleting chemotherapy, n (%)			
Fludarabine/cyclophosphamide	72 (61)	10 (19)	62 (95)
High-dose cyclophosphamide	43 (36)	43 (81)	—
Bendamustine	3 (3)	—	3 (5)
CAR T-cell product, n (%)			
CD1928z	53 (45)	53 (100)	0 (0)
Axicabtagene ciloleucel	44 (37)	0 (0)	44 (68)
Tisagenlecleucel	21 (18)	0 (0)	21 (32)

CR, complete response; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; IPI, International Prognostic Index; N/A, not applicable.

[†] BM blasts > 5%.

[‡] Stage 3 to 4 and/or bulky >6 cm.

[§] BM blasts < 5%.

[¶] Stage 1 or 2.

[¶] Patients in CR at infusion

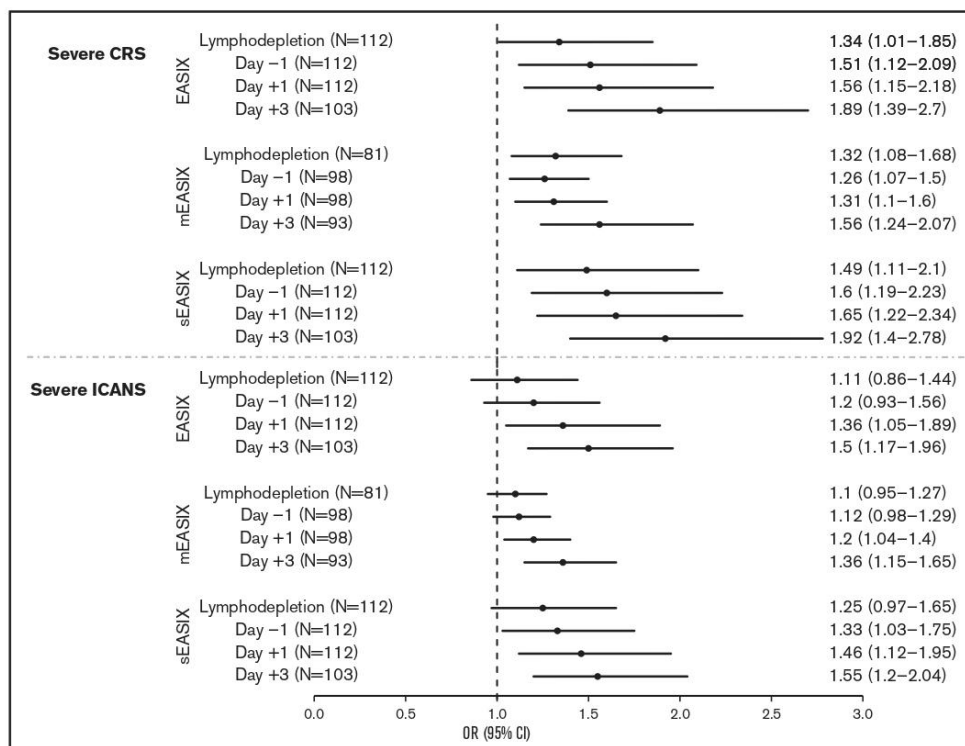


Figure 1. Association of EASIX/s-EASIX/m-EASIX with severe CRS and severe ICANS. This figure shows a Forest plot for odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for prediction of severe CRS (top) and ICANS (bottom) by EASIX/s-EASIX/m-EASIX calculated at preinfusion (lymphodepletion and day -1) and postinfusion (days +1 and +3) time points.

ROC curve analysis and selection of the m-EASIX formula as the best predictor of CAR T-cell outcomes

To evaluate the model's performance, a ROC curve analysis was conducted with an estimation of the AUCs for EASIX/s-EASIX/m-EASIX scores calculated at all the time points that showed a significant association with severe CRS or ICANS in the logistic regression analysis (Figure 2). The EASIX/s-EASIX/m-EASIX scores were confirmed to be good predictors for severe CRS at start of lymphodepletion (AUCs 77.3%/82.1%/80.4%), at day -1 (AUCs 71.8%/74.5%/73%), day +1 (AUCs 72.4%/76.4%/75.4%), and day +3 (AUCs 79.7%/80.9%/80.2%) (Figure 2A-D). m-EASIX values at day +3 showed the highest discriminatory ability for severe ICANS (AUCs 68%/68.4%/73% for EASIX/s-EASIX/m-EASIX, respectively) (Figure 2F). No clear superiority of one formula over the others emerged when comparing AUCs at all time points (Figure 2A-F).

Since the ROC curve analysis did not identify a superior formula, and considering that PLTs and CRP levels were shown to have the

most relevant individual role in the prediction of both severe CRS and severe ICANS in the single variable analysis and that m-EASIX on day +3 had the strongest association with severe ICANS compared with the other formulas, we selected the m-EASIX score (which includes CRP) as the most comprehensive formula for the early prediction of severe CRS and ICANS in patients treated with CAR T cells.

m-EASIX as an early biomarker of severe CRS and ICANS

For the remainder of the analysis, we focused on the m-EASIX formula. Figure 3 displays the distribution of m-EASIX values at different time points across all patients, showing a progressive increase in median values for patients presenting with no symptoms or mild (CRS or ICANS grade 1-2) or severe (CRS or ICANS grade 3-5) symptoms of CRS and ICANS.

To better characterize the selected formula, we explored the association between m-EASIX and baseline patient characteristics. At all

Table 2. Association of individual variables included in EASIX scores and severe CRS/ICANS

Variable	Median (range)	N	OR	95% CI	P value
Severe CRS					
At start of lymphodepletion					
LDH [†] (U/L)	227 (110, 8255)	112	1.17	0.55, 2.24	.7
Creatinine (mg/dL)	0.80 (0.30, 2.00)	118	0.05	0.00, 0.49	.018
PLTs [‡] (k/μL)	14 (1, 49)	118	0.87	0.80, 0.94	<.001
CRP [‡] (mg/L)	1.3 (0.0, 28.5)	84	1.87	1.21, 3.18	.01
At day -1					
LDH [†] (U/L)	232 (106, 4110)	112	1.66	0.81, 3.30	.15
Creatinine (mg/dL)	0.70 (0.30, 1.60)	118	0.22	0.02, 1.68	.2
PLTs [‡] (k/μL)	12 (1, 44)	118	0.87	0.80, 0.94	.001
CRP [‡] (mg/L)	2.0 (0.0, 28.1)	103	1.64	1.13, 2.51	.014
At day +1					
LDH [†] (U/L)	207 (95, 2645)	112	1.63	0.75, 3.42	.2
Creatinine (mg/dL)	0.70 (0.30, 1.60)	118	0.29	0.03, 2.35	.3
PLTs [‡] (k/μL)	11 (1, 38)	118	0.84	0.76, 0.92	<.001
CRP [‡] (mg/L)	2.2 (0.1, 27.0)	104	1.83	1.20, 2.98	.009
Severe ICANS					
At day +1					
LDH [†] (U/L)	207 (95, 2645)	112	1.39	0.71, 2.70	.3
Creatinine (mg/dL)	0.70 (0.30, 1.60)	118	0.3	0.04, 1.70	.2
PLTs [‡] (k/μL)	11 (1, 38)	118	0.91	0.85, 0.97	.004
CRP [‡] (mg/L)	2.2 (0.1, 27.0)	104	1.54	1.11, 2.21	.013
At day +3					
LDH [†] (U/L)	202 (96, 1810)	103	1.17	0.54, 2.46	.7
Creatinine (mg/dL)	0.70 (0.30, 1.80)	118	0.91	0.21, 3.52	.9
PLTs [‡] (k/μL)	8 (1, 34)	118	0.85	0.78, 0.92	<.001
CRP [‡] (mg/L)	7 (0, 33)	105	2.19	1.44, 3.63	<.001

[†]Log transformation of raw LDH and CRP values was applied to calculate the ORs.
[‡]PLT values were scaled by 10 units to calculate the ORs. Bold indicates statistically significant values.

time points, lower m-EASIX levels were correlated with low disease burden (eg, at start of lymphodepletion: β -coefficient, -3.4 ; 95% CI, $-4.9, -1.9$; $P < .001$), while occurrence of fever during the 14 days preceding CAR T-cell infusion was associated with higher m-EASIX levels (eg, at day -1 : β -coefficient, 3.5 ; 95% CI; $2.1, 5.0$; $P < .001$). No consistent association was found with age, diagnosis of B-ALL vs LBCL, and ECOG 0-1 vs ≥ 2 (supplemental Table 4). In a multivariate analysis for prediction of severe CRS, after adjusting for other preinfusion risk factors for severe CRS (disease type, disease burden, and age) m-EASIX calculated at preinfusion time points remained a significant predictor of severe CRS (at day of lymphodepletion: OR, 1.38; 95% CI, 1.11-1.85; $P = .01$; at day -1 : OR, 1.21; 95% CI, 1.00-1.48; $P = .05$). m-EASIX achieved the highest AUC for the association with severe CRS at the start of lymphodepletion. At that time point, an m-EASIX cutpoint of 6.2, where specificity was 76% and sensitivity 80%, showed a negative predictive value of 96.43% for prediction of CRS grade 3 or above.

We further compared m-EASIX with clinical variables, including CRP and fever. m-EASIX on day -1 preinfusion was superior to

CRP alone in predicting severe CRS (ROC comparison for m-EASIX vs CRP 0.025). No difference with CRP, however, was seen at the start of lymphodepletion (ROC comparison, 0.059). When comparing with fever, m-EASIX on days $+1$ and $+3$ postinfusion was not superior to fever in predicting severe CRS or ICANS (ROC comparison for severe CRS: m-EASIX vs fever days $+1$ and $+3$, 0.284 and 0.367, respectively; ROC comparison for severe ICANS: m-EASIX vs fever days $+1$ and $+3$, 0.237 and 0.492, respectively). However, in 42 patients who developed fever on day $+1$, only 12 developed severe CRS and 23 severe ICANS. Therefore, day $+1$ fever did not necessarily translate into severe symptoms.

Subanalysis for m-EASIX and severe CRS and ICANS by disease type (B-ALL and LBCL)

Lastly, we explored the impact of m-EASIX scores on severe CRS and ICANS risk by disease type (supplemental Table 5). Among the 53 patients with B-ALL, 15 (28%) had severe CRS and 24 (45%) had severe ICANS. m-EASIX remained a significant predictor of severe CRS at all time points (eg, per log2 increase, at start of lymphodepletion: OR, 5.33; 95% CI, 1.77-62.1; $P = .043$; at day -1 : OR, 1.45; 95% CI, 1.08-2.12; $P = .027$) and of severe ICANS at day $+3$ (per log2 increase, at day $+3$: OR, 1.5; 95% CI, 1.10-2.21; $P = .02$). In the 65 patients with LBCL, severe events were less frequent (7 cases of severe CRS and 14 of severe ICANS). Only m-EASIX calculated at day $+3$ retained statistical significance for predicting severe CRS and severe ICANS (per log2 increase, OR, 1.34; 95% CI, 1.03-1.86; $P = .045$ and OR, 1.25; 95% CI, 1.03-1.58; $P = .038$).

m-EASIX, but not EASIX or s-EASIX, is associated with CAR T-cell efficacy

All patients were evaluable for disease response assessment, except for 1 patient who died with grade 5 CRS on day $+5$. Out of 117 patients, 89 patients (76%) responded to treatment between days 30 and 90, with 79 (67%) achieving a CR as the best response. Among patients with B-ALL, 44 (83%) achieved a CR, which was MRD negative in 35 patients (66%). Thirty-five patients (54%) with non-Hodgkin lymphoma achieved a CR by day 90 after infusion.

When we explored the association of the 3 scores with achieving a CR as best overall response, we found that higher m-EASIX levels were associated with a reduced odds of response to CAR T cells (per log2 increase, at day -1 : OR, 0.81; 95% CI, 0.69-0.93; $P = .004$; at day $+1$: OR, 0.82; 95% CI, 0.70-0.94; $P = .007$; at day $+3$: OR, 0.84; 95% CI, 0.72-0.98; $P = .031$; at the first day of CRS: OR, 0.67; 95% CI, 0.52-0.84; $P = .001$), suggesting that patients with higher m-EASIX scores were less likely to achieve a CR (Table 3). Based on the AUCs, m-EASIX scores in our population were shown to have a moderate discriminatory power for achieving a CR (AUCs of 62.2%, 68.1%, 66.8%, and 66.8% at the start of lymphodepletion, day -1 , $+1$, and $+3$, respectively). No clear association with disease response was found for EASIX and s-EASIX scores.

Discussion

In this study, we explored the role of the EASIX formula (LDH $\times$ creatinine/PLT), a biomarker for endothelial damage in allo-HCT

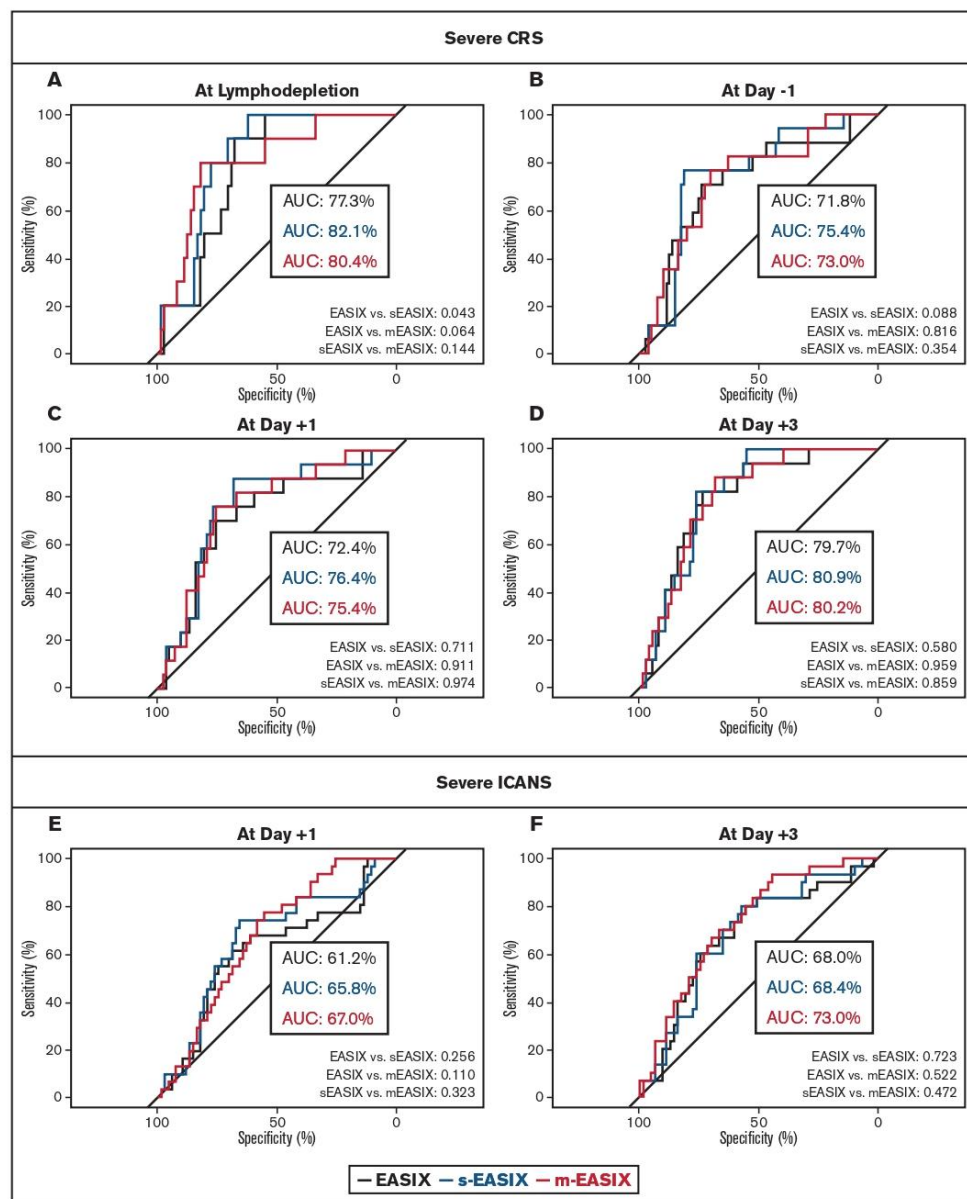


Figure 2. Prediction of severe CRS and ICANS by EASIX/s-EASIX/m-EASIX. ROC curves are shown at all pre- and postinfusion time points for severe CRS (A-D) and ICANS (E-F). AUCs are calculated for all curves and compared in pairs with ROC tests at all time points.

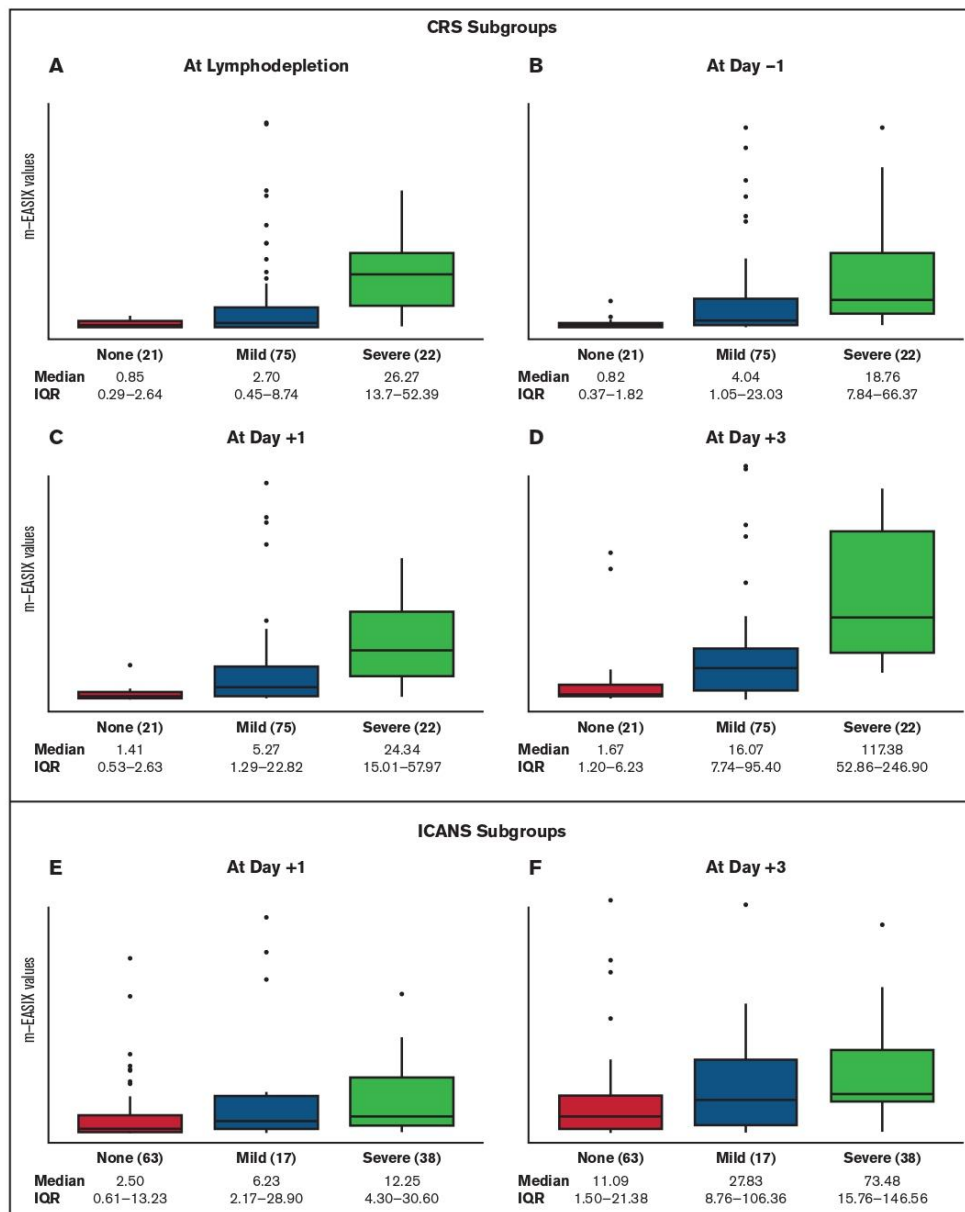


Figure 3.

recipients,¹ in predicting severe CRS and ICANS in patients with LBCL and B-ALL treated with CAR T cells. In addition to EASIX, we tested 2 new revised formulas: s-EASIX, which excludes creatinine, and m-EASIX, which replaces creatinine with CRP (mg/dL). We found that all 3 formulas were associated with severe CRS prior to CAR T-cell infusion (at day of lymphodepletion and day -1) and early postinfusion (days +1 and +3), preceding the onset of severe symptoms. Early postinfusion, the 3 formulas also had a moderate discriminatory ability for severe ICANS. When we assessed the individual role of each variable included in the formulas, low PLTs and high CRP levels at all pre- and postinfusion time points emerged as the variables most correlated with the development of severe CRS and ICANS.

Thrombocytopenia is a result of endothelial damage and complement activation in many diseases. In patients treated with CAR T cells, low PLTs can be multifactorial, related to higher disease burden, heavy pretreatment including autologous or allogeneic transplant, and systemic inflammatory syndrome.^{15,19} In patients with both B-ALL and aggressive lymphomas treated with various CAR T-cell products, a lower PLT nadir has been shown to be independently correlated with higher grades of CRS.¹⁰ In other reports, PLT counts at time of CAR T-cell infusion were shown to be significantly lower in patients who then developed severe neurotoxicity compared with those who had mild symptoms.¹¹⁻¹³ At CAR T-cell peak expansion, endothelial activation represented by high Ang-2 levels and Ang-2/Ang-1 ratio has been associated with severe CRS.¹⁰ Similarly, high Ang-2 levels and Ang-2/Ang-1 ratio have been reported 1 week after CAR T-cell infusion and also before the start of lymphodepletion in patients who subsequently developed high-grade neurotoxicity, suggesting that a proendothelial damage state can precede CAR T-cell infusion.⁶ As PLTs are one of the few sources of the endothelial stabilizing cytokine Ang-1, patients with severe thrombocytopenia before and early after CAR T-cell infusion might be more prone to CRS- and ICANS-related endothelial activation and damage.²⁰

High CRP levels have previously been reported in patients with severe CRS and ICANS. Early elevation of CRP after CAR T-cell infusion was associated with grade 4 to 5 CRS in patients with B-ALL and other lymphoid neoplasms; however, its utility as an early biomarker of severe CRS has not been proven.^{7,10} While in one report, peak CRP levels were shown to be higher in patients who experienced high-grade neurotoxicity, in another, CRP levels peaked in all patients before the development of neurologic symptoms but failed to discriminate between patients with mild vs severe symptoms.^{6,13} In our population, CRP levels at all time points were significantly associated with the development of both severe CRS and severe ICANS.

Conversely, unlike Karschnia et al, who reported elevated (≥ 400 U/L) LDH levels at baseline in 69% of patients with severe neurotoxicity, we did not find a correlation between LDH levels and severe CRS or ICANS.¹³ Endothelial activation leads to release of LDH from endothelial cells as well as to a higher turnover of circulating cells, such as PLTs and leukocytes, resulting in elevated LDH serum levels.²¹ LDH is also a marker for neoplastic cells proliferation and high disease burden, which have been implicated in the development of severe CRS

and ICANS.^{10,12} High LDH has also been correlated with decreased survival after CAR T-cell infusion.^{13,22,23} The absence of an association between LDH and CAR T-cell-related toxicities in our sample might be a result of the small sizes of the 2 populations involved.

Based on our findings, we chose the m-EASIX as the most clinically relevant formula for the prediction of severe toxicities. At present, several laboratory parameters, cytokines, and clinical characteristics have been associated with the development of CRS and ICANS. However, no specific biomarker has been identified for use in clinical practice as an effective predictor. The use of currently known biomarkers has been limited by the fact that the majority of studies involve non-routinely available cytokines. A clear strength of the m-EASIX is that it includes laboratory parameters that are ubiquitously available and often routinely assessed in clinical practice for patients treated with CAR T cells. Besides, the formula can be easily calculated at the bedside. Moreover, the m-EASIX proved to effectively correlate with severe CRS and ICANS at clinically actionable time points, before and early after CAR T-cell infusion. Increasing m-EASIX scores calculated preinfusion (at lymphodepletion and day -1) were predictive of CRS grade 3 or above, with an m-EASIX cutpoint of 6.2 at start of lymphodepletion showing a 96.43% negative predictive value for severe CRS. In the clinical setting, patients with m-EASIX values <6.2 at the start of lymphodepletion might be considered for outpatient treatment as their risk of developing severe symptoms is predicted to be low. Conversely, a higher preinfusion m-EASIX score might help in selecting patients requiring inpatient admission on the day of infusion for careful monitoring or patients who might be candidates for clinical trials of prophylactic or preemptive treatment of toxicities. In our population, CRS median onset was day +2, with severe symptoms occurring at a median of day +4, in line with previous reports.^{24,25} Early after infusion (days +1 and +3), higher m-EASIX values were associated with both severe CRS and severe ICANS, and this could be used for similar interventions. The fact that only postinfusion m-EASIX levels are associated with severe ICANS might be because most patients develop neurologic symptoms only after having experienced some degree of CRS. However, it is not clear if higher grades of CRS are more predictive of ICANS; thus, the m-EASIX might help to identify those patients at higher risk.

The selection of the m-EASIX as the best score was also guided by the fact that it was the only formula that included CRP and was also associated with CR. Recently, CRP levels on day 0 have been shown to correlate with response to axicabtagene ciloleucel.²⁶ Interestingly, higher m-EASIX levels were associated with severe CRS and ICANS and conversely with lower chances of achieving a CR. This highlights the potential role of CRP as a marker of disease burden besides systemic inflammation. Higher disease burden and presence of fever before CAR T-cell infusion were in fact associated with higher m-EASIX levels at all time points. In general, disease burden is known to be a risk factor for CRS, and patients with higher disease burden are also at higher risk of not responding. Furthermore, patients who develop mild or no CRS have been shown to effectively respond to CAR T cells. Therefore, experiencing CRS might not necessarily be a requirement for a good response to CAR

Figure 3. Distribution of m-EASIX levels across CRS and ICANS subgroups. The boxplots summarize median and IQR of m-EASIX levels at day of lymphodepletion (A), day -1 (B), day +1 (C), and day +3 (D) for patients presenting with no symptoms (red) or mild (blue) or severe (green) CRS and at day +1 (E) and day +3 (F) for patients with no symptoms (red) or mild (blue) or severe (green) ICANS. CRS and ICANS were defined mild if grade 1 or 2 and severe if grade 3 to 5.

Table 3. Correlation of m-EASIX and achievement of CR

Formula	N	OR	95% CI	P value
At lymphodepletion				
EASIX	111	0.87	0.67, 1.12	.3
s-EASIX	111	0.87	0.67, 1.12	.3
m-EASIX	81	0.9	0.78, 1.03	.13
At day -1				
EASIX	111	0.77	0.59, 1.00	.053
s-EASIX	111	0.79	0.61, 1.02	.078
m-EASIX	97	0.81	0.69, 0.93	.004
At day +1				
EASIX	111	0.79	0.61, 1.02	.078
s-EASIX	111	0.81	0.62, 1.04	.1
m-EASIX	97	0.82	0.70, 0.94	.007
At day +3				
EASIX	102	0.84	0.65, 1.07	.2
s-EASIX	102	0.83	0.65, 1.06	.14
m-EASIX	92	0.84	0.72, 0.98	.031
At day of CRS				
EASIX	88	0.81	0.60, 1.08	.2
s-EASIX	88	0.82	0.61, 1.09	.2
m-EASIX	78	0.67	0.52, 0.84	.001

Patients achieving CR = 79. CR, complete response for B-ALL, including patients with positive MRD as assessed by flow cytometry.

T cells. The association between m-EASIX and response suggests that the combination of disease/patient/pretreatment factors, such as LDH and PLTs, and markers of inflammation due to disease, such as CRP, provides a better prediction of ultimate disease response than the factors in isolation.

Our study has some limitations. The sample size is in line with recent single-center retrospective reports on patients treated with CAR T cells. However, it is limited by combining patients affected by 2 different diseases and treated with different products, which might represent confounding factors. As such, while the results from the whole population were confirmed in the B-ALL subgroup analysis, we were not able to prove the same for the LBCL patients, likely related to the paucity of CRS/ICANS events in this subgroup. Finally, further validation in external cohorts is warranted. To conclude, we propose that the m-EASIX score should be further investigated as an early biomarker of severe CRS and ICANS in larger datasets. The m-EASIX could provide a clinical tool for discriminating patients at higher risk for severe toxicities at clinically actionable time points (before or early after infusion) to guide differential individualized management.

Acknowledgments

This work was supported by National Institutes of Health, National Cancer Institute Cancer Center support grant P30CA008748. M.P. was supported by an American-Italian Cancer Foundation postdoctoral research fellowship and Associazione Italiana contro le leucemie-linfomi e mieloma Milano e Provincia ONLUS. M.S.-E. was supported by a Research Institute of Marques de Valdecilla Wenceslao-Lopez-Albo grant (WLA17/03). A.A.T. was supported

by a grant of the Alfonso Martin Escudero Foundation. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

Authorship

Contribution: M.P., M.S.-E., L.Y.S.S., and M.-A.P. designed the study and wrote the manuscript; M.P. and M.S.-E. collected the data and conducted the analysis; M.L.S., A.A.T., T.J., J.R., and M.M. participated in data collection; J.R.F. and S.M.D. conducted the statistical analysis; R.S. participated into the data analysis; C.B., R.J.B., P.B.D., C.D., E.F.H., E.M., B.S., S.G., M.L.P., C.S.S., M.S., G.S., and J.H.P. took care of the patients; and all authors reviewed and approved the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: B.S. has consulted for Juno Therapeutics, Celgene/BMS, and Novartis and has served on advisory boards for Kite/Gilead and Janssen Pharmaceuticals. C.B. has consulted for and served on advisory boards for Juno Therapeutics; R.B. has consulted for Celgene and has consulted for, has patents and royalties with, and received research funding from Juno Therapeutics. P.B.D. has served on advisory boards for Kite/Gilead. S.G. has consulted for and received research funding from Amgen, Actinium, Celgene, Johnson & Johnson, and Takeda; has consulted for Jazz Pharmaceuticals, Novartis, Kite, and Spectrum Pharmaceuticals; and has received research funding from Miltenyi. T.J. has consulted for Targeted Oncology and served on advisory board for Bristol-Myers Squibb and CareDx. M.L.P. has consulted for Noble Insights and Merck & Co Inc; has served on advisory boards for STRAXIMM, Kite Pharmaceuticals, Pharmacyclics and Seres Therapeutics; has served on the Speakers Bureau for Hemedicus; has equity ownership for Seres Therapeutics and Evelo; and has patents and royalties with MSKCC (IP for Juno and Seres Therapeutics). C.S.S. has served as a paid consultant on advisory boards for Juno Therapeutics, Sanofi-Genzyme, Spectrum Pharmaceuticals, Novartis, Genmab, Precision Biosciences, Kite/Gilead, Celgene/BMS, Gamida Cell, Karyopharm Therapeutics, and GSK; he has received research funds for clinical trials from Juno Therapeutics, Celgene/BMS, Bristol-Myers Squibb, Precision Biosciences, and Sanofi-Genzyme. M.S. reports research support/funding from Angiocrine Bioscience; consultancy for Angiocrine Bioscience, Omeros Corporation, and McKinsey & Company; ad hoc advisory board membership with Kite/Gilead; and a one-time speaking commitment with i3Health (CME). GS has received research funding from Amgen and Janssen Pharmaceuticals. J.H.P. has consulted for Allogene, Amgen, AstraZeneca, Autolus, GSK, Incyte, Kite Pharma, Novartis, and Takeda. L.Y.S.S. has received honoraria and served on advisory boards for AbbVie, Astra Zeneca, Janssen, Roche, Gilead, Merck, and Pfizer. M.-A.P. served on advisory boards for MolMed, NexImmune, Medigene, and Servier; has received honoraria and served on advisory boards for AbbVie, Bellicum, Bristol-Meyers Squibb, Miltenyi Biotec, Nektar Therapeutics, Novartis, Omeros, and Takeda; has consulted and received honoraria from Merck; and has received research funding from Kite/Gilead, Incyte, and Miltenyi Biotec. The remaining authors declare no competing financial interests.

The current affiliation for T.J. is Division of Hematological Malignancies and Bone Marrow Transplantation, Department of Oncology, John Hopkins University, Baltimore, MD.

ORCID profiles: J.R.F., 0000-0001-8310-6684; A.A.T., 0000-0002-6290-1061; C.B., 0000-0002-9036-9463; P.B.D., 0000-

0002-0794-3226; S.G., 0000-0003-1944-5053; T.J., 0000-0001-6854-773X; G.L.S., 0000-0002-9977-0456; L.Y.S.S., 0000-0001-9925-3048; M.-A.P., 0000-0002-5910-4571;

Correspondence: Miguel-Angel Perales, Adult Bone Marrow Transplantation Service, Department of Medicine, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 1275 York Avenue, Box 298, New York, NY 10065; e-mail: peralesm@mskcc.org.

References

1. Luft T, Benner A, Jodele S, et al. EASIX in patients with acute graft-versus-host disease: a retrospective cohort analysis. *Lancet Haematol*. 2017;4(9):e414-e423.
2. Varma A, Rondon G, Srour SA, et al. Endothelial Activation and Stress Index (EASIX) at admission predicts fluid overload in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020;26(5):1013-1020.
3. Luft T, Benner A, Terzer T, et al. EASIX and mortality after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2020;55(3):553-561.
4. Shouval R, Fein JA, Shouval A, et al. External validation and comparison of multiple prognostic scores in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Adv*. 2019;3(12):1881-1890.
5. Sanchez-Escamilla M, Hilden P, Maloy M, et al. The prognostic calculator Easix predicts acute Gvhd, non-relapse mortality and overall survival in adult patients undergoing reduced intensity conditioning allogeneic HCT. *Blood*. 2018;132(suppl 1):2069.
6. Gust J, Hay KA, Hanafi L-A, et al. Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. *Cancer Discov*. 2017;7(12):1404-1419.
7. Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, et al. Identification of predictive biomarkers for cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Discov*. 2016;6(6):664-679.
8. Norelli M, Camisa B, Barbiera G, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nat Med*. 2018;24(6):739-748.
9. Giavridis T, van der Stegen SJC, Eyquem J, Hamieh M, Piersigilli A, Sadelain M. CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade. *Nat Med*. 2018;24(6):731-738.
10. Hay KA, Hanafi L-A, Li D, et al. Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy. *Blood*. 2017;130(21):2295-2306.
11. Santomaso BD, Park JH, Salloum D, et al. Clinical and biological correlates of neurotoxicity associated with CAR T-cell therapy in patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Discov*. 2018;8(8):958-971.
12. Park JH, Riviere I, Gonen M, et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):449-459.
13. Karschnia P, Jordan JT, Forst DA, et al. Clinical presentation, management, and biomarkers of neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CAR T cells. *Blood*. 2019;133(20):2212-2221.
14. Gutgarts V, Jain T, Zheng J, et al. Acute kidney injury after CAR-T cell therapy: low incidence and rapid recovery. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020;26(6):1071-1076.
15. Wudhikarn K, Pennisi M, Garcia-Recio M, et al. DLBCL patients treated with CD19 CAR T cells experience a high burden of organ toxicities but low nonrelapse mortality. *Blood Adv*. 2020;4(13):3024-3033.
16. Lee DW, Santomaso BD, Locke FL, et al. ASTCT consensus grading for cytokine release syndrome and neurologic toxicity associated with immune effector cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(4):625-638.
17. Pennisi M, Jain T, Santomaso BD, et al. Comparing CAR T-cell toxicity grading systems: application of the ASTCT grading system and implications for management. *Blood Adv*. 2020;4(4):676-686.
18. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al. United Kingdom National Cancer Research Institute. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3059-3068.
19. Jain T, Knezevic A, Pennisi M, et al. Hematopoietic recovery in patients receiving chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematologic malignancies. *Blood Adv*. 2020;4(15):3776-3787.
20. Page AV, Liles WC. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence*. 2013;4(6):507-516.
21. Chopra J, Joist JH, Webster RO. Loss of 51chromium, lactate dehydrogenase, and 111indium as indicators of endothelial cell injury. *Lab Invest*. 1987;57(5):578-584.
22. Westin JR, Tam CS, Borchmann P, et al. Correlative analyses of patient and clinical characteristics associated with efficacy in tisagenlecleucel-treated relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma patients in the Juliet Trial. *Blood*. 2019;134(suppl 1):4103.
23. Nastoupil LJ, Jain MD, Feng L, et al. Standard-of-care axicabtagene ciloleucel for relapsed or refractory large B-cell lymphoma: results from the US Lymphoma CAR T Consortium. *J Clin Oncol*. 2020;38(27):3119-3128.
24. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2531-2544.
25. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. JULIET Investigators. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2019;380(1):45-56.
26. Jacobson CA, Hunter BD, Redd R, et al. Axicabtagene ciloleucel in the non-trial setting: outcomes and correlates of response, resistance, and toxicity. *J Clin Oncol*. 2020;38(27):3095-3106.

Supplemental materials for:

Title: Modified-EASIX predicts severe cytokine release syndrome and neurotoxicity after Chimeric Antigen Receptor (CAR) T cells

Running Title: m-EASIX predicts CRS and ICANS after CAR T cells

Authors

Martina Pennisi^{1,2,3}, Miriam Sanchez-Escamilla^{1,4}, Jessica R Flynn⁵, Roni Shouval¹, Ana Alarcon Tomas¹, Mari Lynn Silverberg¹, Connie Batlevi⁶, Renier J. Brentjens⁷, Parastoo B. Dahi^{1,8}, Sean M. Devlin⁵, Claudia Diamante⁹, Sergio Giralto^{1,8}, Elizabeth F. Halton⁹, Tania Jain^{1*}, Molly Maloy¹, Elena Mead¹⁰, Maria Lia Palomba⁶, Josel Ruiz¹, Bianca Santomaso¹¹, Craig S. Sauter^{1,8}, Michael Scordo^{1,8}, Gunjan L. Shah^{1,8}, Jae H. Park⁷, Lucrecia Yanez San Segundo^{1,4}, Miguel-Angel Perales^{1,8}

¹Adult Bone Marrow Transplant Service, Department of Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY

²Oncology and Onco-Hematology Department, University of Milan, Milan, Italy

³Hematology Service, Oncology and Hematology Department, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy

⁴Department of Hematology, University Hospital Marqués de Valdecilla – IDIVAL, Santander, Spain

⁵Department of Epidemiology and Biostatistics, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY

⁶Lymphoma Service, Department of Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY

⁷Leukemia Service, Department of Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY

⁸Department of Medicine, Weill Cornell Medical College; New York, NY

⁹Cellular Therapeutics Center, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY

¹⁰Intensive Care Service, Department of Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY

¹¹Neurology Service, Department of Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY

*Current address: Division of Hematological Malignancies and Bone Marrow Transplantation, Department of Oncology, John Hopkins University, Baltimore, MD

MP and MSE contributed equally to this study. LYSS and MAP contributed equally to this study.

Corresponding Author:

Miguel-Angel Perales, M.D.

Adult Bone Marrow Transplantation Service, Department of Medicine
Memorial Sloan Kettering Cancer Center

1275 York Avenue, Box 298, New York, NY 10065 USA

E-mail: peralesm@mskcc.org, Fax: 929-321-8170, Phone: 646-608-4044

This document includes:

- Supplemental Table 1. CRS and ICANS rates overall and by disease and product
- Supplemental Table 2. Median EASIX/s-EASIX/m-EASIX scores at all timepoints
- Supplemental Table 3. Association of EASIX/s-EASIX/m-EASIX pre- and post-infusion and onset of CRS and ICANS
- Supplemental Table 4. Correlation between m-EASIX and baseline patients' characteristics
- Supplemental Table 5. Association of m-EASIX and severe CRS and ICANS in disease subtypes (B-ALL and LBCL)

Supplemental Table 1. CRS and ICANS rates overall and by disease and product

	CRS				ICANS		
	Global n (%)	Severe n (%)	Onset median (range)	Severe onset median (range)	Global n (%)	Severe n (%)	Onset median (range)
Overall (118)	97 (83)	22 (19)	2 (0-12)	4 (0-12)	55 (47)	42 (36)	6 (1-21)
B-ALL (53)	46 (87)	15 (28)	2 (0-12)	6 (1-12)	29 (55)	24 (45)	6 (1-11)
LBCL (65)	51 (79)	7 (11)	2 (0-11)	4 (0-11)	26 (40)	14 (22)	5 (1-21)
Axi-cel (44)	38 (86)	5 (11)	2 (0-11)	4 (0-11)	21 (47)	12 (27)	5 (1-14)
Tisa-cel (21)	13 (62)	2 (10)	2 (0-11)	4 (0-11)	5 (24)	2 (10)	4 (1-21)

B-ALL, B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia; LBCL, Large Cell B-cell Lymphoma; Axi-cel, Axicabtagene Ciloleucel; Tisa-cel, Tisagenlecleucel; CRS, Cytokine Release Syndrome; ICANS, Immune-Effector-Cell-Associated-Neurotoxicity-Syndrome; IQR, Interquartile range
Severe CRS and ICANS were defined as CRS and ICANS grades ≥ 3 by ASTCT grading.

Supplemental Table 2. Median EASIX/s-EASIX/m-EASIX scores at all timepoints

	Formula	No CRS, N = 21 median (IQR)*	CRS, N = 97 median (IQR)*	
At lymphodepletion	EASIX	1.06 (0.88, 1.77)	1.88 (0.94, 3.86)	
	Missing values		0	6
	s-EASIX	1.5 (1.0, 2.0)	2.1 (1.2, 5.2)	
	Missing values		0	6
	m-EASIX	1 (0, 3)	3 (1, 23)	
	Missing values		5	32
at day -1	EASIX	1.1 (0.9, 1.6)	1.7 (1.0, 4.1)	
	Missing values		0	6
	s-EASIX	1.4 (1.0, 2.2)	2.0 (1.3, 5.5)	
	Missing values		0	6
	m-EASIX	1 (0, 2)	6 (1, 31)	
	Missing values		2	18
at day +1	EASIX	1.1 (0.6, 1.4)	2.0 (1.0, 3.8)	
	Missing values		2	4
	s-EASIX	1.6 (1.1, 1.8)	2.3 (1.4, 5.7)	
	Missing values		2	4
	m-EASIX	1 (1, 3)	7 (2, 28)	
	Missing values		4	16
at day +3	EASIX	1 (1, 2)	3 (1, 8)	
	Missing values		3	12
	s-EASIX	2 (1, 3)	4 (2, 12)	
	Missing values		3	12
	m-EASIX	2 (1, 6)	21 (11, 126)	
	Missing values		5	20
at day of CRS	EASIX	1.5 (1.5, 1.5)	2.1 (1.1, 4.7)	
	Missing values		20	9
	s-EASIX	3 (3, 3)	3 (2, 7)	
	Missing values		20	9
	m-EASIX	5 (5, 5)	11 (5, 45)	
	Missing values		20	19

*scores are reported as raw values (before log2 transformation)

Supplemental Table 3. Association of EASIX/s-EASIX/m-EASIX pre- / post-infusion and onset of CRS and ICANS

Patients		118	Any CRS n=97			Any ICANS n=55		
Formula	n	OR	95% CI	p.	OR	95% CI	p.	
At lymphodepletion								
EASIX	112	1.82	1.18, 3.06	0.013	1.12	0.88, 1.45	0.4	
s-EASIX	112	1.74	1.14, 2.90	0.021	1.19	0.94, 1.56	0.2	
m-EASIX	81	1.28	1.06, 1.60	0.02	1.05	0.92, 1.20	0.5	
At day -1								
EASIX	112	1.75	1.18, 2.79	0.011	1.24	0.97, 1.62	0.09	
s-EASIX	112	1.95	1.27, 3.30	0.006	1.32	1.03, 1.74	0.035	
m-EASIX	98	1.49	1.20, 1.93	0.001	1.11	0.98, 1.27	0.11	
At day +1								
EASIX	112	2.19	1.37, 3.85	0.003	1.43	1.10, 1.92	0.01	
s-EASIX	112	2.26	1.39, 4.15	0.003	1.48	1.13, 1.99	0.006	
m-EASIX	98	1.43	1.16, 1.84	0.002	1.19	1.04, 1.38	0.014	
At day + 3								
EASIX	103	1.97	1.32, 3.24	0.003	1.54	1.20, 2.03	0.001	
s-EASIX	103	1.97	1.30, 3.34	0.004	1.52	1.19, 2.01	0.002	
m-EASIX	93	1.53	1.24, 1.96	<0.001	1.32	1.14, 1.57	<0.001	
At day of CRS								
EASIX	89	1.51	0.43, 12.4	0.6	1.26	0.96, 1.71	0.11	
s-EASIX	89	1.27	0.40, 8.70	0.8	1.32	1.00, 1.80	0.06	
m-EASIX	79	1.17	0.55, 2.72	0.7	1.13	0.96, 1.36	0.2	

OR = Odds Ratio, CI = Confidence Interval, p.= p-value

CRS, cytokine release syndrome; ICANS, immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome

Supplemental Table 4. Correlation between m-EASIX and baseline patients' characteristics

Variable	At lymphodepletion				At day - 1				At day + 1				At day + 3			
	N	Beta	95% CI	p.	N	Beta	95% CI	p.	N	Beta	95% CI	p.	N	Beta	95% CI	p.
Age	81	-0.04	-0.09, 0.01	0.082	98	0.01	-0.03, 0.05	0.5	98	0.01	-0.02, 0.05	0.5	93	-0.01	-0.05, 0.03	0.7
Disease LBCL vs. B-ALL	81	-0.51	-2.3, 1.2	0.6	98	0.18	-1.2, 1.5	0.8	98	-0.52	-1.8, 0.78	0.4	93	-1.8	-3.1, -0.59	0.004
Disease burden Low vs. High	78	-3.4	-4.9, -1.9	<0.001	95	-2.8	-4.2, -1.5	<0.001	95	-2.6	-3.9, -1.3	<0.001	90	-2.7	-4.0, -1.3	<0.001
ECOG 2-3 vs. 0-1	80	1.1	-1.8, 4.0	0.5	96	2.2	-0.17, 4.6	0.068	96	2.3	0.00, 4.6	0.05	91	1.3	-1.1, 3.7	0.3
Fever days -14 to 0 Yes vs. No	81	5.2	3.6, 6.9	<0.001	98	3.5	2.1, 5.0	<0.001	98	3.2	1.8, 4.6	<0.001	93	2	0.47, 3.5	0.011

Beta = Beta Coefficient; CI = Confidence Interval; p. = p-value
LBCL, large B-cell lymphoma; B-ALL, B-cell acute lymphoblastic leukemia

Supplemental Table 5. Association of m-EASIX and severe CRS and ICANS in disease subtypes

B-ALL					LBCL				
Onset of Severe CRS (n events =15)					Onset of Severe CRS (n events =7)				
m-EASIX	N	OR	95% CI	p-value	m-EASIX	N	OR	95% CI	p-value
At start of lymphodepletion	21	5.33	1.77, 62.1	0.043	At start of lymphodepletion	60	1.18	0.94, 1.51	0.15
At day -1	37	1.45	1.08, 2.12	0.027	At day -1	61	1.21	0.97, 1.54	0.092
At day +1	36	1.67	1.14, 2.85	0.023	At day +1	62	1.23	0.98, 1.57	0.074
At day +3	37	2.07	1.33, 3.92	0.007	At day +3	56	1.34	1.03, 1.86	0.045
Onset of Severe ICANS (n=24)					Onset of Severe ICANS (n=14)				
m-EASIX	N	OR	95% CI	p-value	m-EASIX	N	OR	95% CI	p-value
At day +1	36	1.21	0.94, 1.64	0.2	At day +1	62	1.19	1.00, 1.45	0.056
At day +3	37	1.5	1.10, 2.21	0.02	At day +3	56	1.25	1.03, 1.58	0.038

OR = Odds Ratio, CI = Confidence Interval

B-ALL, B-cell acute lymphoblastic leukemia, LBCL, large B-cell lymphoma; CRS, cytokine release syndrome; ICANS, immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome

8. DISCUSIÓN

En el contexto del Alo-TPH se han producido mejoras importantes durante los últimos años, sobretudo en relación a la selección del paciente en función de sus comorbilidades, a la elección del mejor donante compatible y la adaptación de la intensidad de la terapia de acondicionamiento en función de cada caso concreto. No obstante, la mortalidad del procedimiento sigue siendo un problema importante a pesar de haber mejorado durante las últimas décadas.

Las complicaciones de origen endotelial constituyen un grupo variado de síndromes clínicos bien conocidos y estudiados tras el trasplante alogénico que conllevan un aumento de la morbi-mortalidad asociada al procedimiento. Por tanto, disponer de estrategias de detección precoz de los pacientes más vulnerables a padecer estas complicaciones o a poder detectar aquellos casos con mayor probabilidad de muerte tras el trasplante es crucial para anticiparnos y poder continuar mejorando los resultados de este procedimiento.

En los últimos años, hemos incorporado el uso de células CAR-T en nuestra práctica clínica habitual para aquellos pacientes que no consiguen alcanzar una respuesta a los tratamientos convencionales de quimio y radioterapia. Esta terapia no está exenta de complicaciones y conlleva una importante organización logística y un trabajo multidisciplinar para el manejo de las mismas. Recientemente hemos conocido mejor la fisiopatología del SLC y el ICANS, principales complicaciones precoces de la terapia CAR-T y con un más que probable origen en la disfunción de las células endoteliales.

Por tanto, nuestro estudio de la fórmula EASIX como predictor de mortalidad tras el trasplante y complicaciones de origen endotelial tras la terapia CAR-T supone una importante mejora en el conocimiento de ambos procedimientos y nos ayudará a

poder mejorar las estrategias de anticipación y tratamiento de las complicaciones asociadas a los mismos.

8.1. SOBRE EL PRIMER MANUSCRITO DE LA TESIS

En el primero de los trabajos de esta Tesis Doctoral se evalúa el impacto de la fórmula EASIX como marcador de daño endotelial, en los resultados tras un trasplante alogénico en una cohorte de pacientes con enfermedades linfoides tratadas con acondicionamientos de intensidad reducida y profilaxis de EICR uniforme.

Hemos analizado la fórmula EASIX en varios momentos del pre y post TPH dividiendo en 4 cuartiles a los pacientes en función de los resultados obtenidos y hemos observado que la mayoría de pacientes pertenecientes al cuartil 1 de EASIX-pre o al cuartil 4 de EASIX-pre, permanecían en el mismo cuartil a lo largo del trasplante (EASIX-d30 y EASIX-d100). Por otro lado, pacientes de los cuartiles 2 y 3 para EASIX-pre, parecen variar más durante el trasplante.

Observamos que EASIX-pre, EASIX-d30 y EASIX-d100 elevados, se asocian independientemente con descenso de la SG y mayor NRM post TPH. También observamos diferencias en las respuestas obtenidas a los corticoides en pacientes con EICR en función de EASIX-GVHD (pacientes con EASIX-GVHD más altos [cuartil 4] obtienen menores respuestas completas a los corticoides). Nuestros resultados validan los estudios previos del grupo de T.Luft, mostrando EASIX como predictor independiente de mayor NRM y menor supervivencia al analizarlo en los diferentes momentos pre y post TPH. EASIX-pre ha sido validado en estudios previos como predictor de menor SG tras el Alo-TPH¹⁰² y con mayor sobrecarga de fluidos y menor mortalidad¹⁰³.

Nuestro estudio muestra además la asociación significativa entre EASIX-pre y la aparición de EICR grado 1-4 y grado 2-4 en el análisis multivariante. En los últimos años, un importante número de biomarcadores han sido propuestos para el diagnóstico y estratificación de la EICR y se han validado en diferentes cohortes de pacientes^{99,104-106}. El biomarcador que parece más prometedor en el contexto de EICR aguda es ST2 (supresor de tumorigénesis 2), calculado en el día 7 y en el día 14 del trasplante, sólo^{107,108} o en combinación con otros biomarcadores^{108,109}. Sin embargo, ninguno de estos biomarcadores se ha podido validar en la práctica clínica habitual y en el estudio de T.Luft, ST2 no se correlacionó con EASIX-pre⁹⁶. Nuestro estudio tiene limitaciones, la mayor es su naturaleza retrospectiva. Es un estudio unicéntrico por lo que consideramos importante validar nuestros resultados en otros centros.

Se confirma que la fórmula EASIX es una herramienta que puede utilizarse rutinariamente en la predicción de los resultados post-TPH. La fórmula EASIX además es accesible y fácilmente utilizable en la práctica clínica habitual fuera de ensayos clínicos y podría utilizarse en un futuro para poder definir mejor el riesgo de EICR refractario al tratamiento de primera línea. Se precisan de más estudios de validación de EASIX en estudios prospectivos y dentro de ensayos clínicos.

8.2. SOBRE EL SEGUNDO MANUSCRITO DE LA TESIS

En el segundo de los trabajos de esta Tesis Doctoral, evaluamos el impacto de la fórmula EASIX como predictor de SLC e ICANS en pacientes con LNH-B y LAL-B tratados con células CAR-T. Además de la fórmula EASIX original, se han evaluado dos nuevas fórmulas, EASIX simplificada (s-EASIX), que excluye el valor de creatinina; e EASIX modificado (m-EASIX), que recambia creatinina por PCR (mg/dL).

Encontramos que las 3 fórmulas se asociaron de manera significativa con SLC grave, calculadas previo a la infusión, (en el día de inicio de la linfodepleción y en el día -1), y precozmente post-infusión (día +1 y día +3), prediciendo la aparición de síntomas graves. Precozmente post-infusión, las 3 fórmulas tuvieron también impacto discriminatorio para predecir ICANS grave. Al analizar el papel individual de cada

variable incluida en cada una de las fórmulas, la cifra baja de plaquetas y las cifras elevadas de PCR en todos los momentos analizados pre y post-infusión, se correlacionaron con el desarrollo de SLC e ICANS grave.

La **trombocitopenia** aparece en muchas enfermedades como resultado del daño endotelial y la activación del complemento. En los pacientes que reciben células CAR-T, la aparición de trombopenia tiene un origen multifactorial, en relación con la carga tumoral alta, los tratamientos previos (incluyendo trasplante autólogo o alogénico), y el síndrome de inflamación sistémica^{69,80,101,110,111}. En los pacientes con LAL-B y linfomas agresivos tratados con diferentes productos CAR-T, un bajo nadir de plaquetas se ha relacionado con mayor grado de SLC⁷⁵. En otros estudios, la cifra de plaquetas al momento de infundir el CAR-T se mostró significativamente más baja en pacientes que desarrollaron neurotoxocidad grave en comparación con los que tuvieron síntomas más leves⁷⁶⁻⁷⁸. Por tanto, los pacientes con trombocitopenia grave previo al CAR-T y tras la infusión del CAR-T podrían ser más propensos a desarrollar SLC e ICANS en relación a mayor daño y activación del endotelio¹¹².

Los niveles elevados de **PCR** también han sido relacionados previamente con el desarrollo de SLC e ICANS grave. Elevación precoz de PCR tras la infusión del CAR-T se asoció con SLC grados 4-5 en pacientes con LAL-B y otras neoplasias linfoides; sin embargo, su uso como biomarcador precoz de SLC grave aún no se había testado^{72,75}. En un estudio, el pico de PCR se mostró más elevado en pacientes que experimentaron grados más altos de neurotoxicidad, y en otro estudio, los pacientes que experimentaron grados más graves de neurotoxicidad mostraron picos elevados de PCR, no obstante, sin discriminar entre pacientes con síntomas leves vs. graves^{78,92}. En nuestra población, los niveles de PCR elevados en cualquier momento analizado, se asociaron significativamente con el desarrollo de SLC e ICANS grave.

Al contrario que en otros estudios (Karschnia et al⁷⁸) nosotros no encontramos una correlación entre los niveles de **LDH** y la aparición de SLC o ICANS grave. La activación del endotelio provoca un aumento de la LDH circulante procedente de las propias células endoteliales así como de otras células circulantes del torrente sanguíneo como

las plaquetas o los leucocitos⁴⁹. La LDH además es un marcador de células neoplásicas relacionado con cargas tumorales altas, lo cual ha sido también relacionado con el desarrollo de SLC e ICANS grave^{75,77}. La ausencia de asociación entre LDH y toxicidad tras la terapia CAR-T en nuestro estudio se puede deber al escaso tamaño muestral de las poblaciones analizadas.

Basándonos en nuestros resultados, elegimos m-EASIX como la fórmula más relevante en la predicción de toxicidades graves tras la terapia CAR-T. Hasta el momento, múltiples parámetros analíticos, citocinas, y características clínicas se han asociado con el desarrollo de SLC e ICANS. Sin embargo, ningún biomarcador específico ha sido utilizado en la práctica clínica habitual como un predictor efectivo de toxicidad. El uso actual de los biomarcadores tiene bastantes limitaciones en relación al hecho de que la mayoría de estudios no están disponibles de forma rutinaria en los laboratorios. **Uno de los puntos fuertes de m-EASIX es que incluye parámetros de laboratorio que están disponibles en la gran mayoría de centros y que se utilizan de manera habitual en la práctica clínica. Además, la fórmula se puede calcular de manera sencilla a pie de cama del propio paciente. A su vez, m-EASIX se ha correlacionado de manera significativa con el desarrollo de SLC e ICANS grave en diferentes momentos clínicamente relevantes pre y post-infusión de las células CAR-T.**

8.3. ESTUDIOS DE VALIDACIÓN DE EASIX Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

Durante los últimos años hemos observado como diferentes grupos han validado la fórmula EASIX en pacientes que habían recibido un trasplante^{96,113-118} o habían sido tratados con un CAR-T¹¹⁹⁻¹²¹. **A continuación comentaremos los estudios de EASIX más relevantes en relación a este trabajo de tesis doctoral.**

En primer lugar, nuestro grupo también analizó la fórmula EASIX de manera continua previo al trasplante y durante el primer año post-trasplante en dos cohortes de pacientes (pacientes con un TPH de intensidad reducida o no mieloablativos y pacientes con un TPH mieloablativo con selección positiva de células CD34)¹¹⁵. En total se analizaron 509 pacientes adultos observando una evolución de EASIX tras el TPH

con un pico marcado en el día +8 para posteriormente descender hasta el día +33 del trasplante. Además, la discriminación de EASIX para predecir aumento de NRM fue más alta en el día +180 en ambas cohortes analizadas. En comparación con EASIX calculado pre-trasplante, este estudio concluye que EASIX post-trasplante puede correlacionarse mejor con el riesgo de NRM debido a daño endotelial secundario a la toxicidad del procedimiento.

El grupo de T.Luft ha continuado analizando el uso de EASIX en diferentes momentos del trasplante, correlacionando la fórmula con aumento de mortalidad tras el trasplante⁹⁶, ya comentado previamente en esta tesis, y también han correlacionado EASIX calculada al día 0 (EASIX-d0) con la aparición de SOS¹¹⁴ o EASIX-pre con el riesgo de sepsis¹¹³. En cuanto a las diferentes modalidades de trasplantes, la fórmula EASIX ha sido analizada en pacientes con TPH haploidénticos¹¹⁶, TPH de cordón umbilical¹¹⁷ o en pacientes pediátricos con talasemia sometidos a un Alo-TPH¹¹⁸. En todos los casos, EASIX se relacionó con aumento de mortalidad asociada al procedimiento.

Por otro lado, varios estudios han demostrado también la utilidad de EASIX o variantes de la fórmula en la predicción de complicaciones graves tras la terapia CAR-T. En concreto, se ha analizado EASIX combinando la fórmula original con la PCR y la ferritina (EASIX-FC) o sólo con la ferritina (EASIX-F) observando la relación entre valores altos de EASIX-FC y aparición de ICANS grados 2-4 y valores altos de EASIX-F con la aparición de SLC grados 2-4¹¹⁹. El grupo de T.Luft también analizó EASIX-pre en una cohorte de pacientes que habían recibido terapia CAR-T y validó la fórmula para la predicción de SLC e ICANS graves¹²⁰.

Fuera del trasplante o la terapia CAR-T, la fórmula se ha analizado también en población con MM¹²², síndromes mielodisplásicos¹²³ o LBDCG¹²⁴, correlacionándose con peores supervivencias globales o supervivencias libres de progresión.

Diferentes estudios han extrapolado el uso de EASIX fuera del ámbito hematológico analizando la fórmula en pacientes con infección por COVID-19¹²⁵⁻¹²⁷, fallo hepático grave¹²⁸ o cáncer de pulmón¹²⁹.

La fórmula EASIX se ha consolidado en los últimos años, tal y como demuestran los estudios comentados, como una herramienta útil en la predicción de complicaciones de origen endotelial, toxicidad y mortalidad relacionada con diferentes procedimientos o enfermedades, suponiendo una ayuda para el clínico en la discriminación de la gravedad y el pronóstico de los pacientes.

9. CONCLUSIONES

9.1. MANUSCRITO NÚMERO 1

- Valores elevados de EASIX, calculados pre y post trasplante (al día 30 y al día 100), se asocian de forma significativa con menor supervivencia global y mayor mortalidad no relacionada con la recaída.
- EASIX, calculado previo al trasplante, se asocia significativamente con aparición de EICR aguda grados 1-4 y 2-4 en el análisis univariante.
- Nuestro trabajo valida los resultados originales del grupo de T. Luft.
- La fórmula EASIX es una herramienta fácil, accesible y se puede calcular de manera rutinaria en la práctica clínica habitual.
- Los datos derivados de nuestro trabajo plantean la opción de expandir EASIX a pacientes que reciben terapia CAR-T evaluando la predicción de síndrome de liberación de citocinas y neurotoxicidad.

9.2. MANUSCRITO NÚMERO 2

- Las fórmulas (EASIX, m-EASIX, s-EASIX), calculadas previas a la infusión y precozmente post-infusión (día +1 y día +3) de la terapia CAR-T, predicen la aparición de síndrome de liberación de citocinas grave.
- Las fórmulas (EASIX, m-EASIX, s-EASIX), calculadas en el día +1 y +3 tras la infusión del CAR-T, predicen el desarrollo de neurotoxicidad grave.
- La cifra baja de plaquetas y las cifras elevadas de proteína C reactiva en los momentos analizados pre y post-infusión del CAR-T, se correlacionan con el desarrollo de síndrome de liberación de citocinas y neurotoxicidad grave. Al contrario que en otros estudios, no encontramos una correlación entre los niveles de LDH y la gravedad de estas complicaciones.
- Basándonos en nuestros resultados, elegimos m-EASIX como la fórmula más relevante en la predicción de toxicidades graves tras la terapia CAR-T.
- La fórmula m-EASIX calculado pre y precozmente tras la infusión de las células CAR-T se correlaciona de manera significativa con el desarrollo de síndrome de liberación de citocinas y neurotoxicidad graves.

10.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Thomas ED, Lochte HL, LU WC, Ferrebee JW. Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. *N Engl J Med.* 1957;257(11):491-496. doi:10.1056/NEJM195709122571102
2. Thorsby E. A short history of HLA. *Tissue Antigens.* 2009;74(2):101-116. doi:10.1111/j.1399-0039.2009.01291.x
3. Ceppellini R, Mattiuz PL, Scudeller G, Visetti M. Experimental allotransplantation in man. I. The role of the HL-A system in different genetic combinations. *Transplant Proc.* 1969;1(1):385-389.
4. SNELL GD. Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genet.* 1948;49(2):87-108. doi:10.1007/BF02986826
5. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1980. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2023. Mon. 19 Jun 2023. <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1980/summary/>>.
6. Blume KG, Weissman IL. E. Donnall Thomas (1920-2012). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(51):20777-20778. doi:10.1073/pnas.1218913109
7. Congdon CC. Bone marrow transplantation. *Science.* 1971;171(3976):1116-1124. doi:10.1126/science.171.3976.1116
8. Simpson E, Dazzi F, Szydlo RM, et al. Bone marrow transplantation 1957-2019. *Front Immunol.* 2019;10(1):1-6. doi:10.3389/fimmu.2019.01246
9. Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, et al. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2010;363(22):2091-2101. doi:10.1056/NEJMoa1004383
10. Carreras E, Rovira M, Valcárcel D. *Manual de Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular.*; 7ª Edición 2022. ISBN: 978-84-09-38822-6
11. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med.* 2012;367(16):1487-1496. doi:10.1056/NEJMoa1203517
12. Shouval R, Fein JA, Labopin M, et al. Outcomes of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation from HLA-matched and alternative donors: a European Society for Blood and Marrow Transplantation registry retrospective analysis. *Lancet Haematol.* 2019;6(11):e573-e584. doi:10.1016/S2352-3026(19)30158-9
13. Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N. The EBMT Handbook. Springer, ed. *Hematop stem cell Transplant Cell Ther.* 2019:1-688. doi: 10.1007/978-3-030-02278-5
14. Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C, et al. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy survey of the EBMT: monitoring of activities and trends over 30 years. *Bone Marrow Transplant.* 2021;56(7):1651-1664. doi:10.1038/s41409-021-01227-8
15. Bolon YT, Atshan R, Allbee-Johnson M, Estrada-Merly N, Lee SJ. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR summary slides 2022. US CIBMTR report 2022.
16. Phelan R, Chen M, Bupp C, et al. Updated Trends in Hematopoietic Cell Transplantation in the United States with an Additional Focus on Adolescent and Young Adult Transplantation Activity and Outcomes. *Transplant Cell Ther.* 2022;28(7):409.e1-409.e10. doi:10.1016/j.jtct.2022.04.012

17. Copelan E, Casper JT, Carter SL, et al. A Scheme for Defining Cause of Death and Its Application in the T Cell Depletion Trial. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13(12):1469-1476. doi:10.1016/j.bbmt.2007.08.047
18. Auletta JJ, Kou J, Chen M, et al. Real-World Data Showing Trends and Outcomes by Race and Ethnicity in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: A Report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Transplant Cell Ther*. 2023;29(6):346.e1-346.e10. doi:10.1016/j.jtct.2023.03.007
19. Luznik L, Pasquini MC, Logan B, et al. Randomized Phase III BMT CTN Trial of Calcineurin Inhibitor-Free Chronic Graft-Versus-Host Disease Interventions in Myeloablative Hematopoietic Cell Transplantation for Hematologic Malignancies. *J Clin Oncol*. 2022;40(4):356-368. doi:10.1200/JCO.21.02293
20. Sánchez-Escamilla M, Yáñez San Segundo L, Urbano-Ispizua Á, Perales M-Á. CAR T cells: The future is already present. *Med Clin (Barc)*. 2019;152(7):281-286. doi:10.1016/j.medcli.2018.08.015
21. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):439-448. doi:10.1056/NEJMoa1709866
22. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2019;380(1):45-56. doi:10.1056/NEJMoa1804980
23. Locke FL, Neelapu SS, Bartlett NL, et al. Phase 1 Results of ZUMA-1: A Multicenter Study of KTE-C19 Anti-CD19 CAR T Cell Therapy in Refractory Aggressive Lymphoma. *Mol Ther*. 2017;25(1):285-295. doi:10.1016/j.ymthe.2016.10.020
24. Munshi NC, Anderson LDJ, Shah N, et al. Idecabtagene vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2021;384(8):705-716. doi:10.1056/NEJMoa2024850
25. Berdeja JG, Madduri D, Usmani SZ, et al. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. *Lancet*. 2021;398(10297):314-324. doi:10.1016/S0140-6736(21)00933-8
26. Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, et al. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(1):31-42. doi:10.1016/S1470-2045(18)30864-7
27. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2531-2544. doi:10.1056/NEJMoa1707447
28. Jacobson CA, Chavez JC, Sehgal AR, et al. Axicabtagene ciloleucel in relapsed or refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (ZUMA-5): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2022;23(1):91-103. doi:10.1016/S1470-2045(21)00591-X
29. Locke FL, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel as Second-Line Therapy for Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2022;386(7):640-654. doi:10.1056/NEJMoa2116133
30. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet*. 2020;396(10254):839-852. doi:10.1016/S0140-6736(20)31366-0

31. Kamdar M, Solomon SR, Arnason J, et al. Lisocabtagene maraleucel versus standard of care with salvage chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation as second-line treatment in patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma (TRANSFORM): results from an interim analys. *Lancet*. 2022;399(10343):2294-2308. doi:10.1016/S0140-6736(22)00662-6
32. Wang M, Munoz J, Goy A, et al. KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2020;382(14):1331-1342. doi:10.1056/NEJMoa1914347
33. Shah BD, Ghobadi A, Oluwale OO, et al. KTE-X19 for relapsed or refractory adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: phase 2 results of the single-arm, open-label, multicentre ZUMA-3 study. *Lancet*. 2021;398(10299):491-502. doi:10.1016/S0140-6736(21)01222-8
34. Fowler NH, Dickinson M, Dreyling M, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory follicular lymphoma: the phase 2 ELARA trial. *Nat Med*. 2022;28(2):325-332. doi:10.1038/s41591-021-01622-0
35. Moskop, A, Jacobs B, Pasquini MC. Current uses of CAR T cell Therapies in the US: CIDR summary slides 2021. US CT report 2021.
36. Park JH, Rivière I, Gonen M, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):449-459. doi:10.1056/NEJMoa1709919
37. Huang R, Li X, He Y, et al. Recent advances in CAR-T cell engineering. *J Hematol Oncol*. 2020;13(1):86. doi:10.1186/s13045-020-00910-5
38. Hong M, Clubb JD, Chen YY. Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy. *Cancer Cell*. 2020;38(4):473-488. doi:10.1016/j.ccell.2020.07.005
39. Cai C, Tang D, Han Y, et al. A comprehensive analysis of the fatal toxic effects associated with CD19 CAR-T cell therapy. *Aging*. 2020;12(18):18741-18753. doi:10.18632/aging.104058
40. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*. 2007;100(2):158-173. doi:10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a
41. Palomo M, Diaz-Ricart M, Carreras E. Endothelial Dysfunction in Hematopoietic Cell Transplantation. *Clin Hematol Int*. 2019;1(1):45. doi:10.2991/chi.d.190317.001
42. Hanzu FA, Palomo M, Kalko SG, et al. Translational evidence of endothelial damage in obese individuals: inflammatory and prothrombotic responses. *J Thromb Haemost*. 2011;9(6):1236-1245. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04285.x
43. Caballo C, Palomo M, Cases A, et al. NFκB in the development of endothelial activation and damage in uremia: an in vitro approach. *PLoS One*. 2012;7(8):e43374. doi:10.1371/journal.pone.0043374
44. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003;101(10):3765-3777. doi:10.1182/blood-2002-06-1887
45. Palomo M, Fernandez-Aviles F, Ghita G, et al. Endothelial Dysfunction after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Role of the Conditioning Regimen and the Type of Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(7):985-993. doi:10.1016/j.bbmt.2010.02.008
46. Shono Y, van den Brink MRM. Gut microbiota injury in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(5):283-295. doi:10.1038/nrc.2018.10
47. Carreras E, Diaz-Ricart M. The role of the endothelium in the short-term complications of hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46(February):1495-1502. doi:10.1038/bmt.2011.65

48. Hamilos M, Petousis S, Parthenakis F. Interaction between platelets and endothelium: from pathophysiology to new therapeutic options. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2018;8(5):568-580. doi:10.21037/cdt.2018.07.01
49. Chopra J, Joist JH, Webster RO. Loss of 51chromium, lactate dehydrogenase, and 111indium as indicators of endothelial cell injury. *Lab Invest.* 1987;57(5):578-584.
50. Verma SK, Molitoris BA. Renal Endothelial Injury and Microvascular Dysfunction in Acute Kidney Injury. *Semin Nephrol.* 2015;35(1):96-107. doi:10.1016/j.semnephrol.2015.01.010
51. Eissner G, Lindner H, Behrends U, et al. Influence of bacterial endotoxin on radiation-induced activation of human endothelial cells in vitro and in vivo: protective role of IL-10. *Transplantation.* 1996;62(6):819-827. doi:10.1097/00007890-199609270-00020
52. Holler E, Ertl B, Hintermeier-Knabe R, et al. Inflammatory reactions induced by pretransplant conditioning--an alternative target for modulation of acute GvHD and complications following allogeneic bone marrow transplantation? *Leuk Lymphoma.* 1997;25(3-4):217-224. doi:10.3109/10428199709114161
53. Luft T, Dietrich S, Falk C, et al. Steroid-refractory GVHD : T-cell attack within a vulnerable endothelial system. *Blood.* 2011;118(6):1685-1693. doi:10.1182/blood-2011-02-334821.An
54. Mir E, Palomo M, Rovira M, et al. Endothelial damage is aggravated in acute GvHD and could predict its development. *Bone Marrow Transplant.* 2017;(May):1-9. doi:10.1038/bmt.2017.121
55. Penack O, Holtan S. Chapter 21 - The Endothelium During Allogeneic Stem Cell Transplantation. In: Socié G, Zeiser R, Blazar BR, eds. *Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (Second Edition)*. Second Edi. Academic Press; 2019:401-414. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812630-1.00021-9
56. Yan Z, Zeng L, Jia L, Xu S, Ding S. Increased numbers of circulating ECs are associated with systemic GVHD. *Int J Lab Hematol.* 2011;33(5):507-515. doi:10.1111/j.1751-553X.2011.01322.x
57. Ertault-Daneshpouy M, Leboeuf C, Lemann M, et al. Pericapillary hemorrhage as criterion of severe human digestive graft-versus-host disease. *Blood.* 2004;103(12):4681-4684. doi:10.1182/blood-2003-05-1548
58. Carreras E. How I manage sinusoidal obstruction syndrome after haematopoietic cell transplantation. 2015;(November 2014):481-491. doi:10.1111/bjh.13215
59. Mohty M, Malard F, Abecassis M, et al. Sinusoidal obstruction syndrome / veno-occlusive disease : current situation and perspectives — a position statement from the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.* 2015;(December 2014):781-789. doi:10.1038/bmt.2015.52
60. Lucchini G, Willasch AM, Daniel J, et al. Epidemiology, risk factors, and prognosis of capillary leak syndrome in pediatric recipients of stem cell transplants: a retrospective single-center cohort study. *Pediatr Transplant.* 2016;20(8):1132-1136. doi:10.1111/petr.12831
61. Nürnberger W, Willers R, Burdach S, Göbel U. Risk factors for capillary leakage syndrome after bone marrow transplantation. *Ann Hematol.* 1997;74(5):221-224. doi:10.1007/s002770050288
62. Druey KM, Greipp PR. Narrative review: The systemic capillary leak syndrome. *Ann Intern Med.* 2010;153(2):90-98. doi:10.7326/0003-4819-153-2-201007200-00005
63. Maiolino A, Biasoli I, Lima J, Portugal AC, Pulcheri W, Nucci M. Engraftment syndrome following autologous hematopoietic stem cell transplantation: Definition of diagnostic criteria. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31(5):393-397. doi:10.1038/sj.bmt.1703855

64. Spitzer TR. Engraftment syndrome: Double-edged sword of hematopoietic cell transplants. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50(4):469-475. doi:10.1038/bmt.2014.296
65. Afessa B, Tefferi A, Litzow MR, Krowka MJ, Wylam ME, Peters SG. Diffuse Alveolar Hemorrhage in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(5):641-645. doi:10.1164/rccm.200112-141CC
66. Scully M, Cataland S, Coppo P, Rubia JDELA, Friedman KD. Consensus on the standardization of terminology in thrombotic thrombocytopenic purpura and related thrombotic microangiopathies. 2016;(May):312-322. doi:10.1111/jth.13571
67. Ruutu T, Barosi G, Benjamin RJ, et al. Diagnostic criteria for hematopoietic stem cell transplant-associated microangiopathy: results of a consensus process by an International Working Group. *Haematologica*. 2007;92(01):95-100. doi:10.3324/haematol.10699
68. Sayer HG. Clinical Management of Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation : A Case Series and Review of the Literature. *Acta Haematol*. 2016:1-10. doi:10.1159/000430489
69. Lee DW, Santomaso BD, Locke FL, et al. ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(4):625-638. doi:10.1016/j.bbmt.2018.12.758
70. Borrega JG, Gödel P, Rüger MA, et al. In the Eye of the Storm : Immune-mediated Toxicities Associated With CAR-T Cell Therapy. *HemaSphere*. 2019;(Immunotherapy):1-11.
71. Gust J, Taraseviciute A, Turtle CJ. Neurotoxicity Associated with CD19-Targeted CAR-T Cell Therapies. *CNS Drugs*. 2018;32(12):1091-1101. doi:10.1007/s40263-018-0582-9
72. Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, et al. Identification of Predictive Biomarkers for Cytokine Release Syndrome after Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Discov*. 2016;6(6):664-679. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0040
73. Norelli M, Camisa B, Barbiera G, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nat Med*. 2018;24(6):739-748. doi:10.1038/s41591-018-0036-4
74. Giavridis T, van der Stegen SJC, Eyquem J, Hamieh M, Piersigilli A, Sadelain M. CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade. *Nat Med*. 2018;24(6):731-738. doi:10.1038/s41591-018-0041-7
75. Hay KA, Hanafi L-A, Li D, et al. Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy. *Blood*. 2017;130(21):2295-2306. doi:10.1182/blood-2017-06-793141
76. Santomaso BD, Park JH, Salloum D, et al. Clinical and Biological Correlates of Neurotoxicity Associated with CAR T-cell Therapy in Patients with B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Discov*. 2018;8(8):958-971. doi:10.1158/2159-8290.CD-17-1319
77. Park JH, Rivière I, Gonen M, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):449-459. doi:10.1056/NEJMoa1709919
78. Karschnia P, Jordan JT, Forst DA, et al. Clinical presentation, management, and biomarkers of neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CAR T cells. *Blood*. 2019;133(20):2212-2221. doi:10.1182/blood-2018-12-893396
79. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2545-2554. doi:10.1056/NEJMoa1708566

80. Pennisi M, Jain T, Santomaso BD, et al. Comparing CAR T-cell toxicity grading systems: Application of the ASTCT grading system and implications for management. *Blood Adv.* 2020;4(4):676-686. doi:10.1182/bloodadvances.2019000952
81. Yáñez L, Sánchez-Escamilla M, Perales MA. CAR T cell toxicity: Current management and future directions. *HemaSphere.* 2019;3(2). doi:10.1097/HS9.000000000000186
82. Santomaso BD, Nastoupil LJ, Adkins S, et al. Management of Immune-Related Adverse Events in Patients Treated with Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: ASCO Guideline. *J Clin Oncol.* 2021;39(35):3978-3992. doi:10.1200/JCO.21.01992
83. Morris EC, Neelapu SS, Giavridis T, Sadelain M. Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2022;22(2):85-96. doi:10.1038/s41577-021-00547-6
84. Hayden PJ, Roddie C, Bader P, et al. Management of adults and children receiving CAR T-cell therapy: 2021 best practice recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT (JACIE) and the European Haematol. *Ann Oncol.* 2022;33(3):259-275. doi:10.1016/j.annonc.2021.12.003
85. Morris EC, Neelapu SS, Giavridis T, Sadelain M. Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2022;22(2):85-96. doi:10.1038/s41577-021-00547-6
86. Gust J, Taraseviciute A, Turtle CJ. Neurotoxicity Associated with CD19-Targeted CAR-T Cell Therapies. *CNS Drugs.* 2018;32(12):1091-1101. doi:10.1007/s40263-018-0582-9
87. Santomaso BD, Gust J, Perna F. How I treat unique and difficult-to-manage cases of CAR T-cell therapy-associated neurotoxicity. *Blood.* 2023;141(20):2443-2451. doi:10.1182/blood.2022017604
88. Abbott NJ, Rönnebeck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(1):41-53. doi:10.1038/nrn1824
89. de Vries HE, Blom-Roosemalen MC, van Oosten M, et al. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol.* 1996;64(1):37-43. doi:10.1016/0165-5728(95)00148-4
90. Zhang ZG, Zhang L, Croll SD, Chopp M. Angiopoietin-1 reduces cerebral blood vessel leakage and ischemic lesion volume after focal cerebral embolic ischemia in mice. *Neuroscience.* 2002;113(3):683-687. doi:10.1016/s0306-4522(02)00175-6
91. Nag S, Papneja T, Venugopalan R, Stewart DJ. Increased angiopoietin2 expression is associated with endothelial apoptosis and blood-brain barrier breakdown. *Lab Invest.* 2005;85(10):1189-1198. doi:10.1038/labinvest.3700325
92. Gust J, Hay KA, Hanafi L-A, et al. Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. *Cancer Discov.* 2017;7(12):1404-1419. doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0698
93. Paczesny S. Biomarkers for posttransplantation outcomes. *Blood.* 2018;131(20):2193-2204. doi:https://doi.org/10.1182/blood-2018-02-791509
94. Rowan CM, Paczesny S. Biomarkers for Early Complications After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin Lab Med.* 2019;39(1):61-72. doi:10.1016/j.cl.2018.10.005

95. Luft T, Benner A, Jodele S, et al. EASIX in patients with acute graft-versus-host disease: a retrospective cohort analysis. *Lancet Haematol*. 2017;4(9):e414-e423. doi:10.1016/S2352-3026(17)30108-4
96. Luft T, Benner A, Terzer T, et al. EASIX and mortality after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2019;55:553-561. doi:10.1038/s41409-019-0703-1
97. Jiang S, Penack O, Terzer T, et al. Predicting sinusoidal obstruction syndrome after allogeneic stem cell transplantation with the EASIX biomarker panel. *HemaSphere*. 2020. doi:10.3324/haematol.2019.238790
98. Gutgarts V, Jain T, Zheng J, et al. Acute Kidney Injury after CAR-T Cell Therapy: Low Incidence and Rapid Recovery. *Biol blood marrow Transplant*. 2020;26(6):1071-1076. doi:10.1016/j.bbmt.2020.02.012
99. MacMillan ML, Robin M, Harris AC, et al. A refined risk score for acute graft-versus-host disease that predicts response to initial therapy, survival, and transplant-related mortality. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(4):761-767. doi:10.1016/j.bbmt.2015.01.001
100. Wudhikarn K, Palomba ML, Pennisi M, et al. Infection during the first year in patients treated with CD19 CAR T cells for diffuse large B cell lymphoma. *Blood Cancer J*. 2020;10(8):79. doi:10.1038/s41408-020-00346-7
101. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3059-3068. doi:10.1200/JCO.2013.54.8800
102. Luft T, Benner A, Jodele S, et al. It Is Easix to Predict Non-Relapse Mortality (NRM) of Allogeneic Stem Cell Transplantation (alloSCT). *Blood*. 2016;128(22):519.
103. Saliba RM, Rondon G, Chen J, Ledesma C, Champlin RE, Ciurea SO. Endothelial Activation and Stress Index (EASIX) Is Associated with Fluid Overload and Survival in Recipients of Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(3):32-33. doi:10.1016/j.bbmt.2018.12.105
104. Ali AM, Dipersio JF, Schroeder MA. The Role of Biomarkers in the Diagnosis and Risk Stratification of Acute Graft-versus-Host Disease : A Systematic Review. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(9):1552-1564. doi:10.1016/j.bbmt.2016.04.022
105. Levine JE, Braun TM, Harris AC, et al. A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: A multicentre study. *Lancet Haematol*. 2015;2(1):e21e-29. doi:10.1016/S2352-3026(14)00035-0
106. Paczesny S. Acute Graft-Versus-Host Disease Prognosis: Are Biomarkers Ready for Preemptive Clinical Trials? *Clin Chem*. 2017;63(10):1561-1563. doi:10.1373/clinchem.2017.272872
107. Kanakry CG, Bakoyannis G, Perkins SM, et al. Plasma-derived proteomic biomarkers in human leukocyte antigen-haploidentical or human leukocyte antigen-matched bone marrow transplantation using post-transplantation cyclophosphamide. *Haematologica*. 2017;102(5):932-940. doi:10.3324/haematol.2016.152322
108. Vander Lugt M, Braun T, Hanash S, et al. ST2 as a Marker for Risk of Therapy-Resistant Graft-versus-Host Disease and Death. *N Engl J Med*. 2013;369(6):529-539. doi:10.1056/NEJMoa1213299
109. Zaid MA, Wu J, Wu C, et al. Plasma biomarkers of risk for death in a multicenter phase 3 trial with uniform transplant characteristics post-allogeneic HCT. *Blood*. 2017;129(2):162-171. doi:10.1182/blood-2016-08-735324.

110. Wudhikarn K, Pennisi M, Garcia-Recio M, et al. DLBCL patients treated with CD19 CAR T cells experience a high burden of organ toxicities but low nonrelapse mortality. *Blood Adv.* 2020;4(13):3024-3033. doi:10.1182/bloodadvances.2020001972
111. Jain T, Knezevic A, Pennisi M, et al. Hematopoietic recovery in patients receiving chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematologic malignancies. *Blood Adv.* 2020;4(15):3776-3787. doi:10.1182/bloodadvances.2020002509
112. Page A V, Liles WC. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence.* 2013;4(6):507-516. doi:10.4161/viru.24530
113. Korell F, Schreck N, Müller-Tidow C, Dreger P, Luft T. Pre-transplant EASIX and sepsis after allogeneic stem cell transplantation. *Intensive Care Med.* 2022;48(6):753-755. doi:10.1007/s00134-022-06676-3
114. Jiang S, Penack O, Terzer T, et al. Predicting sinusoidal obstruction syndrome after allogeneic stem cell transplantation with the EASIX biomarker panel. *Haematologica.* 2020;105(5):446-453. doi:10.3324/HAEMATOL.2019.238790
115. Nawas MT, Sanchez-Escamilla M, Devlin SM, et al. Dynamic EASIX scores closely predict nonrelapse mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood Adv.* 2022;6(22):5898-5907. doi:10.1182/bloodadvances.2022007381
116. Mariotti J, Magri F, Giordano L, et al. EASIX predicts non-relapse mortality after haploidentical transplantation with post-transplant cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant.* 2023;58(3):247-256. doi:10.1038/s41409-022-01874-5
117. Fujita S, Monna-Oiwa M, Kato S, et al. Pretransplant EASIX score predicts non-relapse and overall mortality of adult patients undergoing single-unit unrelated cord blood transplantation. *Transplant Cell Ther.* July 2023. doi:10.1016/j.jtct.2023.06.021
118. Kulkarni UP, Pai AA, Kavitha ML, et al. Endothelial Activation and Stress Index-Measured Pretransplantation Predicts Transplantation-Related Mortality in Patients with Thalassemia Major Undergoing Transplantation with Thiotepa, Treosulfan, and Fludarabine Conditioning. *Transplant Cell Ther.* 2022;28(7):356.e1-356.e6. doi:10.1016/j.jtct.2022.05.001
119. Greenbaum U, Strati P, Saliba RM, et al. CRP and ferritin in addition to the EASIX score predict CAR-T-related toxicity. *Blood Adv.* 2021;5(14):2799-2806. doi:10.1182/bloodadvances.2021004575
120. Korell F, Penack O, Mattie M, et al. EASIX and Severe Endothelial Complications After CD19-Directed CAR-T Cell Therapy-A Cohort Study. *Front Immunol.* 2022;13:877477. doi:10.3389/fimmu.2022.877477
121. Acosta-Medina AA, Johnson IM, Bansal R, et al. Pre-lymphodepletion & infusion endothelial activation and stress index as predictors of clinical outcomes in CAR-T therapy for B-cell lymphoma. *Blood Cancer J.* 2023;13(1):7. doi:10.1038/s41408-022-00777-4
122. Song G-Y, Jung S-H, Kim K, et al. Endothelial activation and stress index (EASIX) is a reliable predictor for overall survival in patients with multiple myeloma. *BMC Cancer.* 2020;20(1):803. doi:10.1186/s12885-020-07317-y
123. Merz A, Germing U, Kobbe G, et al. EASIX for prediction of survival in lower-risk myelodysplastic syndromes. *Blood Cancer J.* 2019;9(11):85. doi:10.1038/s41408-019-0247-z
124. Park S, Go S-I, Lee G-W. The Endothelial Activation and Stress Index (EASIX) score is an independent prognostic factor in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *BMC Cancer.* 2022;22(1):816. doi:10.1186/s12885-022-09915-4

125. Kalicińska E, Biernat M, Rybka J, et al. Endothelial Activation and Stress Index (EASIX) as an Early Predictor for Mortality and Overall Survival in Hematological and Non-Hematological Patients with COVID-19: Multicenter Cohort Study. *J Clin Med*. 2021;10(19). doi:10.3390/jcm10194373
126. Zińczuk A, Rorat M, Simon K, Jurek T. EASIX, Modified EASIX and Simplified EASIX as an Early Predictor for Intensive Care Unit Admission and Mortality in Severe COVID-19 Patients. *J Pers Med*. 2022;12(7). doi:10.3390/jpm12071022
127. Luft T, Wendtner C-M, Kosely F, et al. EASIX for Prediction of Outcome in Hospitalized SARS-CoV-2 Infected Patients. *Front Immunol*. 2021;12:634416. doi:10.3389/fimmu.2021.634416
128. Schult D, Rasch S, Schmid RM, Lahmer T, Mayr U. EASIX Is an Accurate and Easily Available Prognostic Score in Critically Ill Patients with Advanced Liver Disease. *J Clin Med*. 2023;12(7). doi:10.3390/jcm12072553
129. Go S-I, Park S, Kang MH, et al. Endothelial activation and stress index (EASIX) as a predictive biomarker in small cell lung cancer. *Cancer Biomark*. 2022;35(2):217-225. doi:10.3233/CBM-220032

11.FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1: Probabilidad de supervivencia tras un trasplante alogénico.

Figura 2: Probabilidad de muerte no relacionada con la recaída (NRM) al día 200 del trasplante alogénico.

Figura 3: Datos de TPH del registro EBMT desde 1999 hasta 2019. Número de pacientes que reciben un trasplante autólogo o alogénico.

Figura 4: Datos anuales en TPH del CIBMTR.

Figura 5. Retos del TPH.

Figura 6. Número de infusiones CAR-T de 2016 a 2021 en EEUU.

Figura 7. Indicación por tipo de enfermedad de la terapia CAR-T.

Figura 8: Factores que provocan daño del endotelio durante el trasplante alogénico.

Figura 9. Descripción de los biomarcadores que influyen en el daño endotelial.

Figura 10: Factores que ocasionan daño del endotelio durante el trasplante y principales complicaciones de origen endotelial.

Figura 11: Síndromes de origen endotelial post-TPH.

Figura 12: Diferentes fases del síndrome de liberación de citocinas.

Figura 13: Fases temporales y solapamiento entre el SLC e ICANS. Citocinas proinflamatorias aumentadas debido a estas complicaciones tras la infusión del CAR-T.

Figura 14: Mecanismo de daño endotelial en el ICANS: Modelo de neurotoxicidad secundaria al daño tras la infusión CAR-T propuesto por Gust et al.

Figura 15: Biomarcadores validados en el post-trasplante.

TABLAS

Tabla 1: Tipos de CAR-T comerciales aprobados por AEMPS/EMA/EMA en el tratamiento de diferentes enfermedades hematológicas.

“Me pinto a mí misma porque soy a quien mejor conozco”

Frida Kahlo

“Todo el mundo necesita un sí, tres minutos de complicidad”

“Y en mitad del relámpago llegó el mal de altura”

Vetusta Morla

