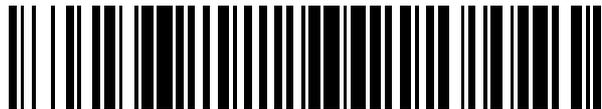


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 996**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2009 E 09012276 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 2302380**

54 Título: **Procedimiento para pruebas preclínicas de fármacos inmunomoduladores**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2013

73 Titular/es:

**THERAMAB GMBH (100.0%)
Friedrich-Bergius-Ring 15
97076 Würzburg, DE**

72 Inventor/es:

HÜNIG, THOMAS

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 401 996 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para pruebas preclínicas de fármacos inmunomoduladores

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un procedimiento en el que se prueba un fármaco inmunomodulador conocido o en estudio, que comprende la etapa de poner en contacto un cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con el fármaco inmunomodulador y observar el cultivo de PBMC para determinar la liberación de al menos una citocina de las PBMC o para determinar la proliferación celular después de ponerse en contacto con el fármaco inmunomodulador. La invención se refiere además a un procedimiento de prueba de fármacos de atenuación de la tormenta de citocinas *in vitro*. Finalmente, la invención se refiere a un procedimiento.

10 Estado de la técnica y antecedentes de la invención

Los fármacos inmunoterápicos que modulan la actividad de los linfocitos se evalúan preclínicamente en dos sistemas: Modelos animales, normalmente roedores, y, si es posible, en primates; y cultivos de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).

15 Las PBMC se usan de forma rutinaria porque, en primer lugar, contienen todos los subconjuntos de linfocitos así como de monocitos, y en segundo lugar, están fácilmente disponibles de la extracción de sangre venosa de donantes sanos o de pacientes. La estimulación *in vitro* de estas PBMC se considera un indicador útil de las actividades que se esperan de un fármaco inmunomodulador *in vivo*.

20 Determinados agentes de activación de linfocitos T, en particular anticuerpos monoclonales (mAb) que dirigen el receptor de antígeno de linfocitos T (TCR) tal como OKT3, el primer mAb usado en medicina para la inmunosupresión, inducen la liberación sistémica de citocinas proinflamatorias (Abramowicz *et al.*, 1989). Los más peligrosos de éstos son TNF, interferón-gamma (IFN-gamma) e IL-2. En pacientes que reciben tratamientos de mAb, se logra de forma rutinaria el control de un síndrome de liberación de citocinas de este tipo o "tormenta de citocinas" por tratamiento corticoesteroideo de dosis alta.

25 El TGN1412 es un anticuerpo monoclonal humanizado (mAb) de la subclase de IgG4 específico para la molécula coestimuladora CD28 expresada por linfocitos T humanos. Se denomina "superagonista de CD28" (CD28SA) porque a diferencia del mAb específico de CD28, puede activar linfocitos T sin un acoplamiento simultáneo del receptor de antígeno de linfocitos T (TCR) (Hunig, 2007). El TGN1412 se desarrolló por el ya desaparecido TeGenero AG, Würzburg.

30 Durante un primer ensayo clínico en el ser humano llevado a cabo por la unidad de ensayos clínicos independiente Parexel en el Northwick Park Hospital, Londres, el 13 de marzo de 2006, la aplicación intravenosa de 100 µ/kg de peso corporal de TGN1412 a voluntarios humanos sanos da lugar a un síndrome de liberación de citocinas potencialmente mortal que sólo se controló después del traslado de los voluntarios a la unidad de cuidados intensivos del hospital (Suntharalingam *et al.*, 2006).

35 El trabajo preclínico presentado por el patrocinador, TeGenero AG, no mostró pruebas de una "tormenta de citocinas" de este tipo en un modelo de ratón análogo usando un superagonista específico de CD28 de rata, ni en macacos de Java que recibieron el propio TGN1412 a dosis hasta 50 veces mayores que las de los voluntarios humanos (Duff, 2006). Además, la adición de TGN1412 a cultivos de PBMC humanas tampoco dio como resultado la liberación de citocinas. Se repitieron todos los experimentos con monos clave y cultivos de PBMC por el British National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) actuando en nombre del Expert Scientific Group on Phase One Clinical Trials del gobierno, y confirmaron el comportamiento inocuo de TGN1412 en estos sistemas (Duff, 2006). Tres años después del ensayo fallido de TNG1412, aún no se ha aclarado por qué este ensayo *in vitro* no previno contra la tormenta de citocinas experimentada por los voluntarios humanos.

40 La ineficacia de los roedores y macacos de Java en la liberación de citocinas sistémicas tóxicas después de la inyección de CD28SA obviamente es debido a diferencias entre especies en la reactividad del sistema inmunitario intacto de dichos agentes, y se han realizado sugerencias específicas para dichas diferencias. (Gogishvili *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2006; Schraven y Kalinke, 2008).

Estos hallazgos indican que debido a patrones de reacción específicos de especies, incluso los modelos animales de primates no siempre son predictores seguros de la reactividad humana de fármacos novedosos.

50 Cabe destacar que un ser humano tiene aproximadamente 10¹² linfocitos T, y que menos de un uno por ciento de estos están circulando en la sangre en cualquier momento dado. Por lo tanto, la ineficacia de las PBMC cultivadas en la respuesta a TGN1412 se debe a un defecto funcional en estas células en comparación con las que residen en los tejidos linfoides (que obviamente respondieron con la liberación de citocinas en los voluntarios), o bien al requisito de un tipo celular presente en órganos linfoides pero no en la sangre para la activación mediada por TGN1412 de los linfocitos T.

Por lo tanto, la reproducción de la tormenta de citocinas observada en los voluntarios humanos del ensayo de TGN1412 en Londres en el cultivo celular se necesita con urgencia para entender su mecanismo y para probar su sensibilidad a la inhibición farmacológica.

5 Desde un punto de vista más amplio, la ineficacia de los cultivos conocidos de PBMC humanas en la respuesta a TGN1412 soluble con una liberación de citocinas indica que este sistema no responde a todos los agentes de activación de linfocitos de la misma forma en que lo hace el sistema inmunitario humano intacto dentro del cuerpo. La corrección de este defecto no sólo puede permitir un análisis detallado de los efectos de superagonistas (SA) de CD28 humanos tales como TGN1412, sino que también revela la reactividad de otros fármacos aparentemente inocuos durante el desarrollo preclínico.

10 **Problema técnico de la invención**

El problema técnico de la invención es, en consecuencia, proporcionar medios mejorados para pruebas *in vitro* de fármacos inmunomoduladores, en particular CD28SA, con respecto a posibles tormentas de citocinas. Otro objetivo de la invención es proporcionar medios para probar fármacos adecuados para atenuar tormentas de citocinas.

Principios de la invención y realizaciones preferidas

15 Para resolver el problema técnico mencionado en primer lugar, la invención enseña un procedimiento para probar un fármaco inmunomodulador en estudio o conocido para la activación de linfocitos T, que comprende la etapa de poner en contacto *in vitro* un cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con una cantidad predeterminada del fármaco inmunomodulador en estudio o conocido y observar el cultivo de PBMC para determinar la liberación de al menos una citocina de las PBMC después de ponerse en contacto con el fármaco
20 inmunomodulador en estudio o conocido, en el que se ajusta la densidad celular de un precultivo de PBMC de modo que se permite el contacto célula-célula de las PBMC y en el que se cultiva el precultivo durante al menos 12 h. El término "precultivo" quiere decir que el cultivo de PBMC se cultiva en ausencia de fármacos inmunomoduladores y antes de ponerse en contacto con dichos fármacos que se van a probar. El término "observar" comprende la medida cualitativa, semicuantitativa y cuantitativa de concentraciones de la al menos una citocina o de la proliferación con
25 procedimientos conocidos en la técnica.

La invención se basa en el hallazgo sorprendente de que un cultivo de PBMC, que se prepara por procedimientos convencionales, pero que se precultiva adicionalmente durante un periodo de tiempo predeterminado antes de ponerse en contacto con el fármaco inmunomodulador, muestra de repente sensibilidad con respecto a la liberación de citocinas desencadenada por el contacto con fármacos inmunomoduladores, que no desencadenan la liberación de citocinas en ausencia del procedimiento de precultivo. La invención se basa además en el hallazgo de que este efecto de precultivo está promovido por contactos célula-célula de las PBMC durante un periodo de tiempo predeterminado. Dicho de otro modo, el cultivo de PBMC no debe estar recién preparado cuando se añade el fármaco inmunomodulador.

35 Por lo tanto, la invención es útil para predecir la reactividad de individuos a fármacos inmunomoduladores, como TGN1412, y, como se explicará después con más detalle, la capacidad de fármacos inmunodepresores tales como corticosteroides para controlar reacciones no deseadas. También es útil entender además el modo de acción de CD28SA. Además, la invención es útil en la detección de fármacos inmunomoduladores en estudio por su potencial de activación de linfocitos T, incluyendo la liberación de citocinas. Puesto que las PBMC recuperadas después del precultivo de alta densidad reflejan muy probablemente el estado de reactividad de los linfocitos T hallados en los
40 órganos linfoides, también se pueden emplear, en combinación con un agente de activación, para probar fármacos inmunodepresores ya que los linfocitos T en circulación se pueden inhibir más fácilmente debido a su estado "inactivo, lo que da como resultado resultados engañosos sobre la eficacia de dichos fármacos.

En una realización de la invención, la etapa de precultivo se lleva a cabo almacenando el cultivo de PBMC durante al menos 24 h, preferentemente al menos 36 h, más preferentemente al menos 45 h, a de 35 °C a 40 °C,
45 preferentemente a de 36 °C a 38 °C, en ausencia de fármacos inmunomoduladores y antes de ponerse en contacto con el fármaco inmunomodulador que se va a probar.

En la invención, la densidad celular del cultivo de PBMC durante y/o después de la etapa de precultivo es de al menos 2×10^6 /ml, preferentemente de al menos 5×10^6 /ml, más preferentemente de al menos 10^7 /ml. En cuanto a la densidad celular en la superficie del recipiente de cultivo tisular, debe ser de al menos 4×10^5 /cm²,
50 preferentemente de al menos 10^6 /cm², lo más preferentemente de al menos 2×10^6 /cm². Los valores proporcionados se aplican directamente a los recipientes que consisten en pocillos planos. En pocillos redondos o pocillos cónicos, la densidad global diferirá porque la densidad celular en alta en el fondo del pocillo y baja en las partes superiores del pocillo. En consecuencia, las densidades celulares dadas anteriormente por unidad de volumen se referirán a volúmenes parciales en recipientes de cualquier tipo, es decir, las densidades dadas se
55 proporcionarán en un volumen parcial de, por ejemplo, al menos 10 µl del volumen de precultivo total presente. Además, cualquier otro procedimiento para lograr densidades celulares de células viables, como se reivindica, estará englobado en la invención. Preferentemente, el número mínimo de células que están en contacto célula-célula es de al menos 50.000.

En una realización preferida, el fármaco inmunomodulador es un fármaco inmunoestimulante, como un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo monoclonal. Específicamente, el anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo monoclonal superagonista específico de CD28 humano.

5 En otra realización de la invención, la citocina observada se selecciona del grupo que consiste en TNF, IFN-gamma, IL-1-beta, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL12p70, IL-13, IL-14, IL-15, IL- 16, IL-17, IL-21, IL-35, LT, y combinaciones de las mismas. De forma alternativa, se puede observar la proliferación de la célula, donde la proliferación está presente si el número de células se incrementa dentro de una unidad de tiempo por una cantidad predeterminada. Esta cantidad se puede elegir por el experto por consideración habitual.

10 En otra realización de relevancia particular con respecto al objetivo mencionado en segundo lugar, el cultivo de PBMC precultivadas se pone en contacto adicionalmente con un fármaco en estudio para atenuar la liberación de al menos una citocina (fármaco inmunodepresor), mientras se pone en contacto al mismo tiempo el cultivo de PBMC con el fármaco inmunomodulador, en particular estimulante, conocido o posteriormente después de un periodo de tiempo predeterminado, o un periodo de tiempo predeterminado antes, en el que se observa adicionalmente liberación de citocinas. El periodo de tiempo predeterminado puede estar en el intervalo de 10 s a 12 h, preferentemente en el intervalo de 10 s a 1 h.

15 El fármaco en estudio para atenuar la liberación de citocinas se selecciona preferentemente (pero no exclusivamente) del grupo que consiste en corticoesteroides, incluyendo, pero sin limitarse a, dexametasona o metilprednisolona.

20 En esta realización, se hace posible probar *in vitro*, si un fármaco particular destinado a la atenuación de una tormenta de citocinas (fármaco inmunodepresor) es adecuado, dicha tormenta de citocinas debería tener lugar en experimentos *in vivo* a pesar de la administración del fármaco inmunomodulador a una concentración a la que no se esperaría una tormenta de citocinas. En particular, esta variante de la invención permite crear un par combinado de fármaco inmunomodulador y fármaco de atenuación y proporciona medios seguros para controlar tormentas de citocinas inesperadas en experimentos *in vivo*, en particular en ensayos clínicos con seres humanos.

25 A continuación, se explica la invención en detalle con ejemplos y figuras. Las figuras muestran:

Figura 1: Inducción de liberación de citocinas por mAb específico de CD3 OKT3 y el superagonista de CD28 TGN1412 de PBMC humanas.

Figura 2: Conversión constante de un estado no reactivo con TGN1412 a un estado reactivo con TGN1412 por precultivo de 2 días.

30 Figura 3: La adquisición de reactividad por TGN1412 requiere una densidad celular alta durante el precultivo.

Figura 4: La adquisición de reactividad por TGN1412 en precultivos de alta densidad requiere dos días de incubación.

Figura 5: La adquisición de reactividad por TGN1412 en cultivos de alta densidad requiere contacto célula-célula.

Figura 6: Las PBMC precultivadas pero no recién preparadas responden a TGN1412 con proliferación.

35 Figura 7: Los linfocitos T CD4 CD45RO (memoria) son la fuente principal de citocinas proinflamatorias liberadas tanto por OKT3 como por TGN1412.

Figura 8: Cinética comparable de la liberación de TNF de PBMC precultivadas con alta densidad inducida por OKT3 y TGN1412.

Figura 9: La adquisición de la reactividad por TGN1412 está bloqueada por mAb para antígenos HLA.

40 Figura 10: Sensibilidad comparable de la liberación de citocinas inducida por OKT3 y TGN1412 con la inhibición mediada por corticoesteroides.

Ejemplo 1: Ejemplo comparativo

Para la inducción de la liberación de citocinas, la presente invención así como este ejemplo comparativo usan el sistema estándar de estimulación de PBMC tal como se emplea por los investigadores en todo el mundo para el estudio de la respuesta de PBMC humanas a agentes inmunomoduladores. Este sistema emplea PBMC recién preparadas, aisladas de sangre venosa heparinizada por centrifugación sobre un gradiente de densidad (medio de separación de linfocitos LSM 1077, PAA Laboratories, Pasching, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. De forma alternativa, se usa un concentrado de leucocitos recién preparado, obtenido de cámaras de sistemas de reducción de leucocitos (Caridian, Gambro BCT, Lakewood, CO, EE. UU.) como producto secundario en la preparación de concentrados de plaquetas (Dietz *et al.*, 2006), como material de partida para una purificación con Ficoll, con idénticos resultados. Se cultivan PBMC en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania), en las que se estimulan 2×10^5 células en 0,2 ml de medio de cultivo RPMI 1640

enriquecido (GIBCO/Invitrogen, Long Island, NY, EE. UU.) complementado con suero autólogo al 10 % o suero AB combinado disponible comercialmente (PAA Laboratories), con idénticos resultados.

5 En este sistema de cultivo tisular, se estimularon PBMC recién aisladas con TGN1412 soluble proporcionado por TheraMab GmbH, Würzburg. Era del mismo lote de calidad de GMP usado durante el ensayo de Londres (Suntharalingam *et al.*, 2006). Como control positivo para la inducción de la liberación de citocinas, se usó OKT3 de grado clínico ("Muromonomab", Janssen-Cilag, Neuss, Alemania), lo que es bien conocido por desencadenar la liberación de citocinas tanto *in vitro* como en pacientes (Abramowicz *et al.*, 1989). Después de 24 horas, se analizó un panel de citocinas que incluía los factores pro y anti-inflamatorios principales detectados en plasma de los voluntarios del ensayo de TGN1412 (Suntharalingam *et al.*, 2006) por tecnología de conjunto de microesferas de citocinas (Cytokine Bead Array, CBA) (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

10 La concentración empleada tanto de OKT3 como de TGN1412 fue de 1 µg/ml, lo que está en el intervalo de la concentración estimada que se logró en la circulación de los voluntarios durante el ensayo de TGN1412 de Londres (Duff, 2006). Valoraciones extensas de ambos anticuerpos no presentadas aquí mostraron que esta concentración está dentro del intervalo óptimo para respuestas biológicas.

15 La figura 1A muestra que el TGN1412 soluble no induce la liberación de citocinas en PBMC recién preparadas. En contraste, OKT3 es altamente eficaz en la inducción de TNF, IFN-gamma e IL-2, que son todos conocidos por contribuir a las manifestaciones patológicas del síndrome de liberación de citocinas, así como la citocina antiinflamatoria IL-10. Se aislaron PBMC de un donante sano por centrifugación de densidad con Ficoll y se cultivaron en 0,2 ml de medio RPMI1640 complementado con suero AB al 10% durante 24 horas a 10^6 /ml en placas de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos. Se analizaron las citocinas en los sobrenadantes después de 24 horas de incubación por conjunto de microesferas de citocinas. Se usaron anticuerpos monoclonales a una concentración final de 1 µg/ml. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándar de triplicados.

20 Se ha reproducido la ineficacia de TGN1412 y la capacidad de OKT3 de inducir la liberación de estas y otras citocinas (no mostrado) en cultivos de PBMC estándar, con más de 10 donantes individuales, y está en concordancia con los datos presentados por TeGeneroAG y reproducidos en el informe del Scientific Expert Group on the safety of Phase I clinical trials (Duff, 2006).

25 **Ejemplo 2: Respuesta a TGN1412 después del precultivo**

30 Para el experimento en la fig. 1B, se cultivaron PBMC de un donante sano en 1,5 ml de medio durante 2 días en 10^7 /ml en placas de cultivo tisular de fondo plano de 24 pocillos antes de lavar y reajustar a 10^6 /ml. Con estas células, se realizó el mismo experimento que se describe en el ejemplo 1.

35 La figura 1B muestra que, sorprendentemente, se restablece la sensibilidad para TGN1412 cultivando simplemente PBMC durante 2 días sin sobreestimulación. Cuando se prepararon las células el 4 de diciembre de 2008, el número de PBMC obtenidas excedía lo requerido para el experimento actual, y se almacenaron las células en exceso en medio de cultivo durante dos días a 37°C. Cuando se emplearon estas células exactamente para el mismo experimento como se realizó previamente con células recién preparadas (Fig. 1A), se produjo algo completamente inesperado: TGN1412 inducía ahora una liberación de citocinas de magnitud comparable a OKT3. La fig. 1B proporciona un ejemplo de un experimento de este tipo.

Por lo tanto, se investigaron adicionalmente la reproducibilidad y la base mecanística.

40 **Ejemplo 3: Reproducibilidad de la observación clave**

45 La figura 2 resume el efecto del precultivo sobre la reactividad de TGN1412 para 7 donantes sanos individuales. Se muestran datos de 7 donantes sanos individuales, representado cada uno por un símbolo. Las condiciones para la estimulación de anticuerpos y para el precultivo eran como en la figura 1. Aunque existen variaciones específicas de donantes para ambas repuestas de OKT3 y TGN1412, es evidente que en todos los casos, las células de donantes recién preparadas no respondieron a la estimulación de TGN1412 con liberación de citocinas y que se perdió este estado resistente después de 2 días de precultivo. Se esperan variaciones específicas de donantes, tal como se ilustra por las grandes diferencias en la magnitud de la tormenta de citocinas experimentada por los voluntarios del ensayo de TGN1412 de Londres (Suntharalingam *et al.*, 2006).

Ejemplo 4: Optimización del nuevo procedimiento.

50 Las figuras 3 a 5 describen los parámetros que determinan la adquisición de sensibilidad para TGN1412 de linfocitos T de sangre periférica.

Para el experimento de la figura 3, se cultivaron PBMC a 10^6 /ml o a 10^7 /ml durante 2 días antes de estimularse por TGN1412 a 10^6 /ml como se describe en la figura 1.

Para el experimento de la figura 4, se estimularon PBMC recién preparadas, (barras de la izquierda de los tripletes) y PBMC precultivadas a 10^7 /ml durante 24 (barras del medio de los tripletes) o 48 horas (barras de la derecha de los tripletes) con TGN1412 durante 24 horas bajo las condiciones dadas en la figura 1.

5 Para el experimento de la figura 5, se cultivaron PBMC durante dos días a alta densidad (10^7 /ml, barras a la derecha de los tripletes) o a baja densidad (10^6 /ml, barras de la izquierda y del medio de los tripletes) en 1,5 ml de cultivos Transwell que contenían una inserción con membrana semipermeable sobre la que se cultivaron PBMC a alta densidad (10^6 /ml bajo la membrana, 10^7 /ml sobre la membrana, barras del medio de los tripletes). Se estimularon células y se sometieron a ensayo como se proporciona en la figura 1.

10 Como se muestra anteriormente, las PBMC adquieren sensibilidad para TGN1412 por precultivo en medio con suero AB disponible comercialmente o autólogo al 10 %. Se probó el papel de los siguientes parámetros en la adquisición de sensibilidad para TGN1412.

15 Densidad celular. En contraste con los ensayos de estimulación de PBMC convencionales, en los que se cultivan células a 10^6 /ml o 2×10^5 /cm² del pocillo de cultivo, se realizó un "estacionamiento" durante 2 días a una densidad 10 veces mayor. La figura 3 muestra que el precultivo de PBMC a alta (10^7 /ml o 2×10^6 /cm²), pero no a baja densidad (10^6 /ml o 2×10^5 /cm²) induce la reactividad para TGN1412 en el cultivo secundario.

Tiempo. La figura 4 muestra que se logra la total reactividad para TGN1412 (comparable con la reactividad para OKT3) después de 2 días de precultivo. 1 día de precultivo sólo da lugar a un incremento moderado en la reactividad.

20 Requisito para el contacto célula-célula. El requisito para una densidad celular alta durante el precultivo de PBMC para la adquisición de reactividad para TGN1412 se puede deber a la necesidad de un contacto célula-célula y/o a la acción de factores solubles que necesitan alcanzar una determinada concentración para promover la maduración del estado reactivo. Usando un sistema Transwell (Corning Incorporated, Lowell, MA, EE. UU.), en el que las células cultivadas a alta densidad se separan de las cultivadas a baja densidad por una membrana de poros de 8 μ m lo que permite la difusión de factores solubles, se muestra en la figura 5 que se requiere un contacto célula-célula.

25 **Ejemplo 5: Otras características del nuevo procedimiento**

La figura 6 muestra que las PBMC precultivadas, pero no recién aisladas, proliferan en respuesta a TGN1412. Se prepararon PBMC recién preparadas y precultivadas y se cultivaron como se describe para las Fig. 1A y B, respectivamente. El día 3, se añadió 1 μ Ci de 3H-timidina, y se recogieron los cultivos 16 horas después y se procesaron para determinar el recuento de centelleo líquido. Además de la liberación de citocinas, la activación de linfocitos T policlonales da como resultado la proliferación que se puede medir como radioactividad incorporada como timinida tritiada. Como se observa en la figura 2, OKT3 estimuló la proliferación tanto de PBMC recién preparadas como precultivadas, mientras que TGN1412 sólo pudo inducir la proliferación en PBMC precultivadas. Por tanto, la proliferación también se puede usar como lectura.

35 La figura 7 muestra que en PBMC precultivadas, TGN1412 libera citocinas proinflamatorias de células CD4 de memoria. Se estimularon PBMC recién preparadas y precultivadas durante 2 días de alta densidad durante 16 horas con 1 μ g/ml de OKT3 o TGN1412. Durante las 4 últimas horas del cultivo, se añadieron 5 μ g/ml de brefeldina A para bloquear la exportación celular de citocinas. Después de la tinción de la superficie celular con mAb conjugado con fluorocromo para determinar CD4 y CD45RO (marcador de memoria), se fijaron las células, se permeabilizaron y se tiñeron con mAb para determinar TNF (todos de BD Pharmingen, Mountain View, CA, EE. UU.). Se obtuvieron 40 15.000 acontecimientos detectados vivos en un citómetro de flujo BD Calibur y se analizaron los datos usando el programa informático FlowJo (Three Star Inc., Ashland, OR, EE.UU.). Los datos mostrados se detectan en linfocitos T CD4. La tormenta de citocinas provocada por OKT3 en pacientes es un fenómeno bien conocido, y la información adjunta proporcionada con este fármaco (Muromonomab, Janssen-CILAG) previene explícitamente contra este síndrome. Para comparar la fuente celular de dos citocinas proinflamatorias clave TNF e IFN-gamma en respuesta a OKT3 y TGN1412, se retuvieron dentro de la célula mediante el bloqueo de su transporte a través del aparato de Golgi usando el fármaco brefeldina A (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), y se revelaron por tinción intracelular de células fijadas y permeabilizadas con mAb específico de TNF fluorescente (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EE. UU.). En paralelo, se determinó el fenotipo de superficie celular de las PBMC estimuladas. El principal subconjunto de linfocitos T productores de citocinas, los linfocitos T CD4, se identificó así y se dividió adicionalmente 50 en subconjuntos indiferenciados (CD45RO-) y de memoria (CD45RO+). La figura 7 muestra que en las PBMC tanto recién preparadas como precultivadas, OKT3 desencadena la producción de citocinas predominantemente en el subconjunto de células de memoria CD4. Además, TGN1412, aunque no puede desencadenar la producción de TNF en PBMC recién preparadas, sí lo hace eficazmente en la misma población de células CD4 de memoria después de un precultivo de alta densidad.

55 La figura 8 muestra que la liberación de TNF de PBMC precultivadas sigue la misma cinética cuando se induce por OKT3 o bien TGN1412. Se prepararon PBMC precultivadas de alta densidad, como en la fig. 1B y se estimularon con 1 μ g/ml de OKT3 o TGN1412. Se recogieron los sobrenadantes en los tiempos indicados y se analizó el contenido como en la figura 1. *In vivo*, la liberación de TNF, la citocina proinflamatoria más importante de la

"tormenta de citocinas", sigue la misma cinética cuando se induce por OKT3 o TGN1412 (Abramowicz *et al.*, 1989; Suntharalingam *et al.*, 2006). Por lo tanto, se compararon las cinéticas de liberación de TNF en PBMC precultivadas entre los dos mAb y se encontró que eran virtualmente idénticas.

Ejemplo 6: Base mecanística para la inducción de reactividad para TGN142 durante el precultivo de alta densidad: Autorreconocimiento del MHC

Este ejemplo proporciona información funcional sobre la invención sin vincularse a ninguna teoría. A partir del trabajo realizado en ratones, se ha sugerido que el reconocimiento de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC; HLA en humanos) por los receptores de antígeno (TCR) de linfocitos T en los órganos linfoides (ganglios linfáticos, bazo, etc.) sensibiliza el TCR para una señalización mejorada durante el posterior encuentro con el antígeno (Stefanova *et al.*, 2002). Puesto que el laboratorio de los inventores había mostrado antes que la señalización del superagonista de CD28 actúa a través de la amplificación de señales de TCR débiles (Dennehy *et al.*, 2007), se planteó la hipótesis de que es la pérdida de esta señal de sensibilización lo que hace que los linfocitos T en circulación (que no tienen contacto célula-célula, a diferencia de la situación en los órganos linfoides) sean resistentes a la estimulación por TGN1412. Esto se probó incluyendo mAb bloqueantes que reaccionan con todas las moléculas HLA de clase I y clase II humanas durante los dos días de precultivo (mAb 646-2.6 y Tü39, Becton-Dickinson) a 10 µg/ml.

La figura 9 muestra que los mAb específicos de HLA de clase I y, en menos medida de HLA de clase II, pueden bloquear la adquisición de la reactividad de TGN1412, lo que pone de manifiesto la necesidad reconocimiento de HLA por el TCR de las células que adquieren esta reactividad. Se realizó el precultivo de alta densidad de PBMC como se proporciona en la figura 1B. A algunos precultivos de alta densidad, se les añadieron mAb para HLA de clase I o para HLA de clase II a 10 µg/ml.

Este hallazgo sugiere de forma convincente que la interacción del TCR con las moléculas de HLA en los órganos linfoides densamente compactados es un prerrequisito para la fuerte reactividad para TGN1412 como se experimentó por los voluntarios en el ensayo de Londres, y que esta situación está imitada por el cultivo de alta densidad *in vitro*, restaurando así la reactividad de los linfocitos T en circulación, que han perdido el contacto célula-célula, con la de los linfocitos T en órganos linfoides. También explica por qué se observa la respuesta para OKT3 no sólo en PBMC precultivadas sino también en PBMC recién preparadas: Puesto que, en contraste con TGN1412, OKT3 dirige el propio TCR, no hay necesidad para "estacionar" este receptor por interacciones con moléculas de HLA. La capacidad diferencial de mAb específicos de HLA de clase I y clase II para bloquear la adquisición de reactividad para TGN1412 se explica por el hecho de que más del 90 % de las moléculas de HLA disponibles en los cultivos de PBMC son de clase I.

Ejemplo 7: Prueba de la capacidad de los corticoesteroides para controlar la liberación de citocinas mediadas por TGN1412

La tormenta de citocinas inducida por OKT3 se controla rutinariamente por la prevención o intervención con corticoesteroides en dosis alta (Goldman *et al.*, 1989). Hasta la fecha, fue imposible probar la sensibilidad de la liberación de citocinas inducida por TGN1412 para corticoesteroides debido a que no existía un sistema de ensayo. Por lo tanto, se usó el nuevo procedimiento para comparar la sensibilidad de la liberación de citocinas en PBMC recién preparadas y precultivadas para dexametasona ("Dex", Sigma-Aldrich).

La figura 10 muestra que la liberación de citocinas inducida por TGN1412 es sensible a los corticoesteroides. Se prepararon células precultivadas de alta densidad y se estimularon por mAb como se describe en la figura 1B. Donde se indica, se incluyó dexametasona a las concentraciones finales dadas, y se midieron las citocinas después de 24 horas de cultivo.

La liberación de citocinas inducidas tanto por OKT3 como TGN1412 se suprime totalmente por la dosis más alta empleada (1 µM), y se suprime casi completamente a una dosis diez veces menor (100 nM). Esto sugiere de forma convincente que la liberación de citocinas inducidas por TGN1412 se puede controlar por medicación corticoesteroides apropiada como se usa clínicamente para pacientes tratados con OKT3.

Abramowicz, D. *et al.*, Transplantation 47, 606-608 (1989).

Dennehy, K. M. *et al.*, J Immunol 178, 1363-1371 (2007).

Dietz, A. B. *et al.*, Transfusion 46, 2083-2089 (2006).

Duff, G. W. C.. Expert Scientific Group on Phase One Clinical Trials Final Report (Norwich, Reino Unido, Stationary Office 2006).

Gogishvili, T. *et al.*, PLoS ONE 4, e4643 (2009).

Goldman, M. *et al.*, Lancet 2, 802-803 (1989).

Hunig, T., Adv Immunol 95, 111-148 (2007).

Nguyen, D. H. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 103, 7765-7770 (2006).

Schraven, B. *et al.*, Immunity 28, 591-595 (2008).

Stefanova, I. *et al.*, Nature 420, 429-434 (2002).

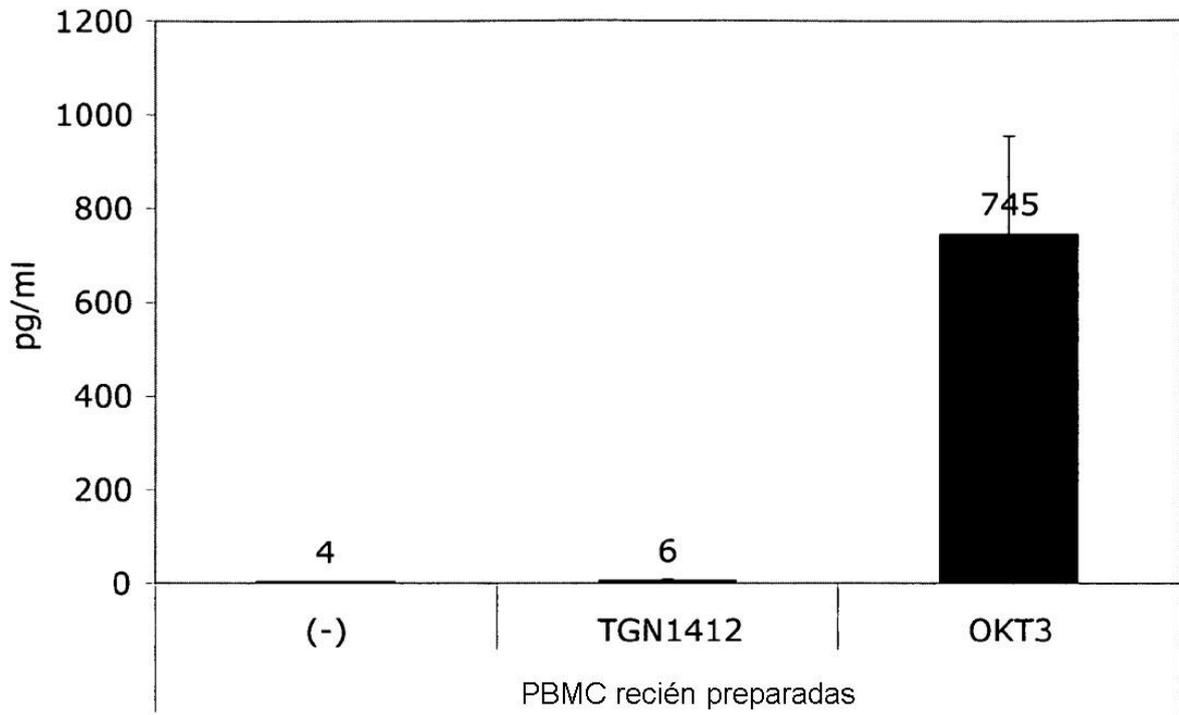
Suntharalingam, G. *et al.*, N Engl J Med 355, 1018-1028 (2006).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para probar un fármaco inmunomodulador en estudio o conocido para la activación de linfocitos T, que comprende la etapa de poner en contacto *in vitro* un cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con una cantidad predeterminada del fármaco inmunomodulador en estudio o conocido y observar el cultivo de PBMC para determinar la liberación de al menos una citocina de las PBMC o para determinar la proliferación celular después de ponerse en contacto con el fármaco inmunomodulador en estudio o conocido, en el que la densidad celular de un precultivo de PBMC durante y/o después de la etapa de precultivo es de al menos $2 \cdot 10^6$ /ml o de al menos $4 \cdot 10^5$ /cm² de modo que se permite el contacto célula-célula de las PBMC, y en el que el precultivo de PBMC se cultiva durante al menos 12 h.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de precultivo se lleva a cabo almacenando el cultivo de PBMC durante al menos 24 h, preferentemente al menos 36 h, más preferentemente al menos 45 h, de 35 °C a 40 °C en ausencia de fármacos inmunomoduladores antes del contacto con el fármaco inmunomodulador que se va a probar.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el fármaco inmunomodulador es un fármaco inmunoestimulante.
- 15 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el fármaco inmunoestimulante es un anticuerpo.
5. El procedimiento de la reivindicación 4 en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal superagonista específico de CD28 humano.
- 20 7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la citocina observada se selecciona del grupo que consiste en TNF, IFN-gamma, IL-1-beta, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL12p70, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL- 21, IL-35, LT y combinaciones de las mismas.
8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el cultivo de PBMC precultivadas se pone en contacto adicionalmente con un fármaco en estudio para atenuar la liberación de al menos una citocina, mientras se pone en contacto al mismo tiempo el cultivo de PBMC con el fármaco inmunomodulador, en particular estimulante, conocido o posteriormente después de un periodo de tiempo predeterminado, o un periodo de tiempo predeterminado antes, en el que se observa adicionalmente liberación de citocinas.
- 25 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el periodo de tiempo predeterminado puede estar en el intervalo de 10 s a 12 h, preferentemente en el intervalo de 10 s a 1 h.
- 30 10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en el que el fármaco en estudio para atenuar la liberación de citocinas es un corticoesteroide.

Fig. 1A

IFN γ



IL-2

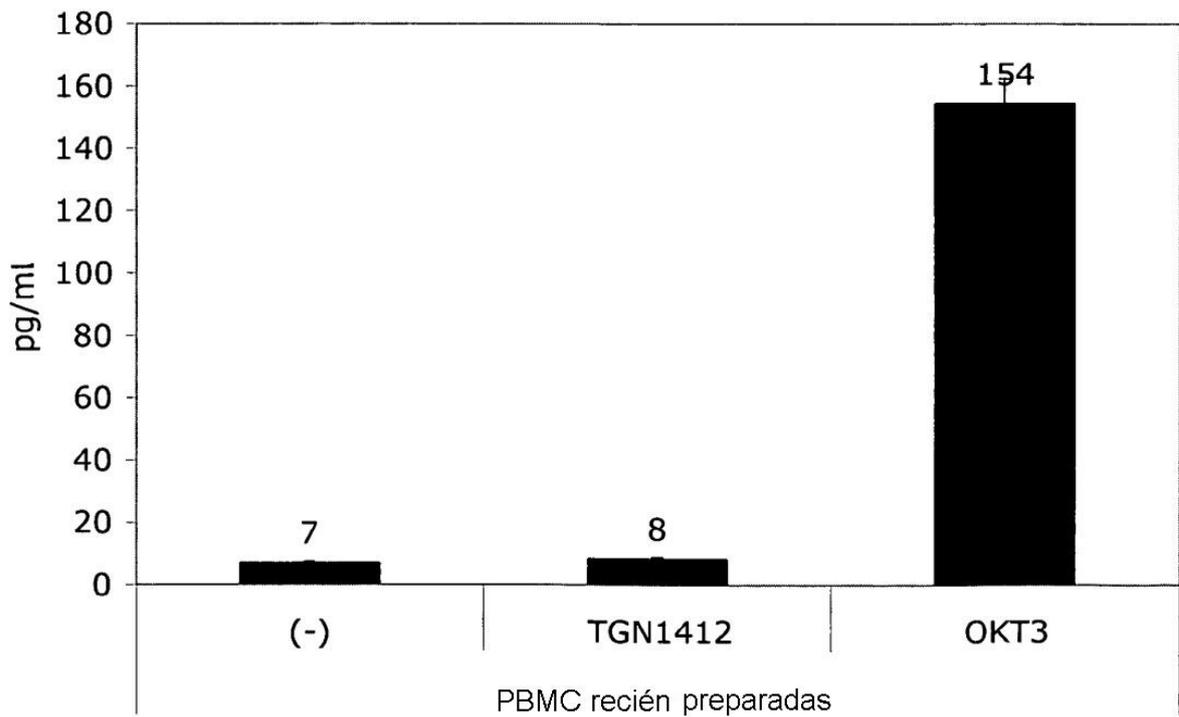
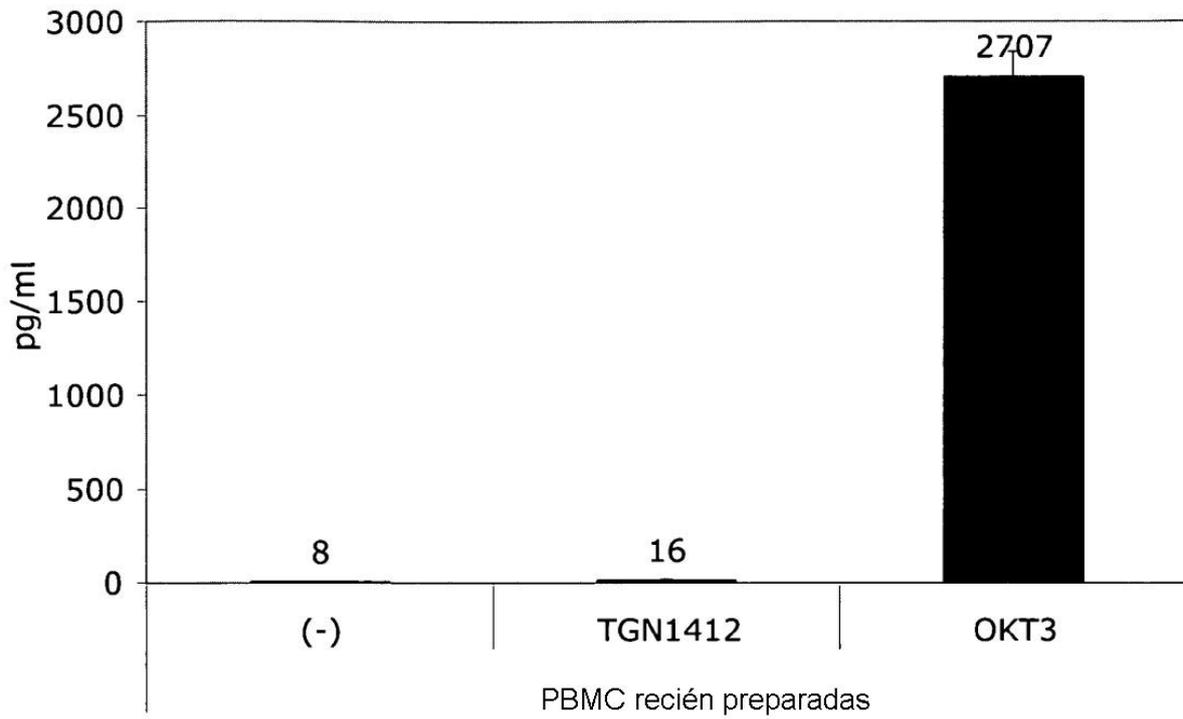


Fig. 1A continuación

TNF



IL-10

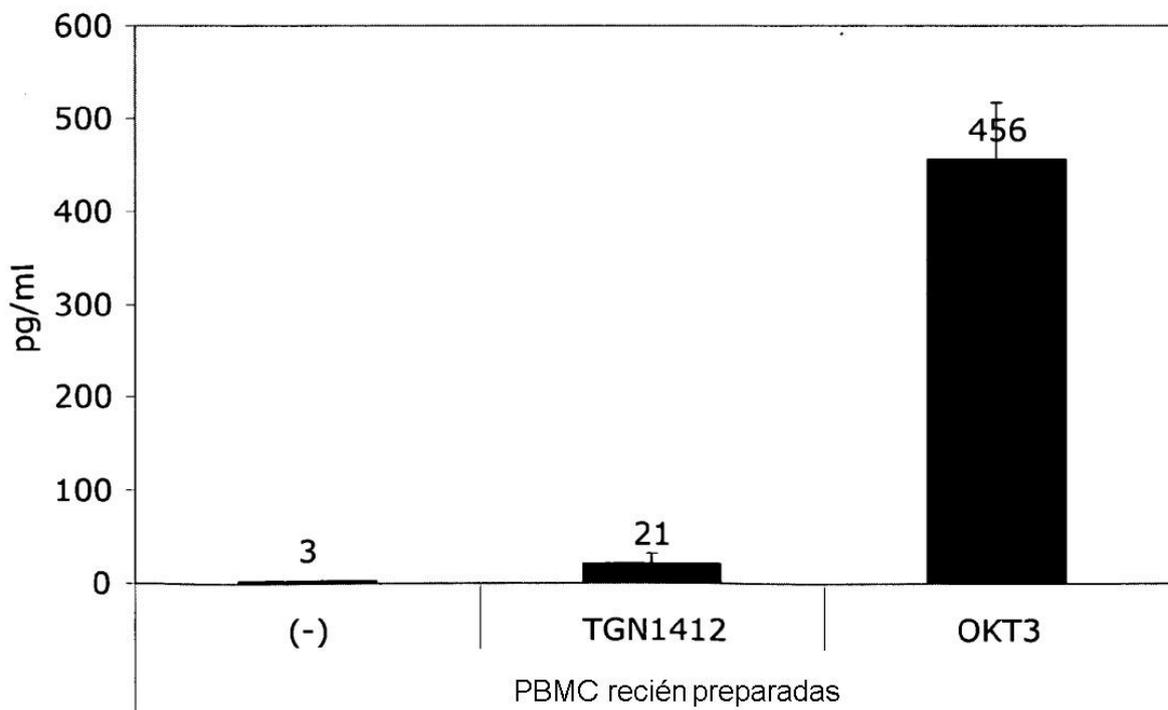
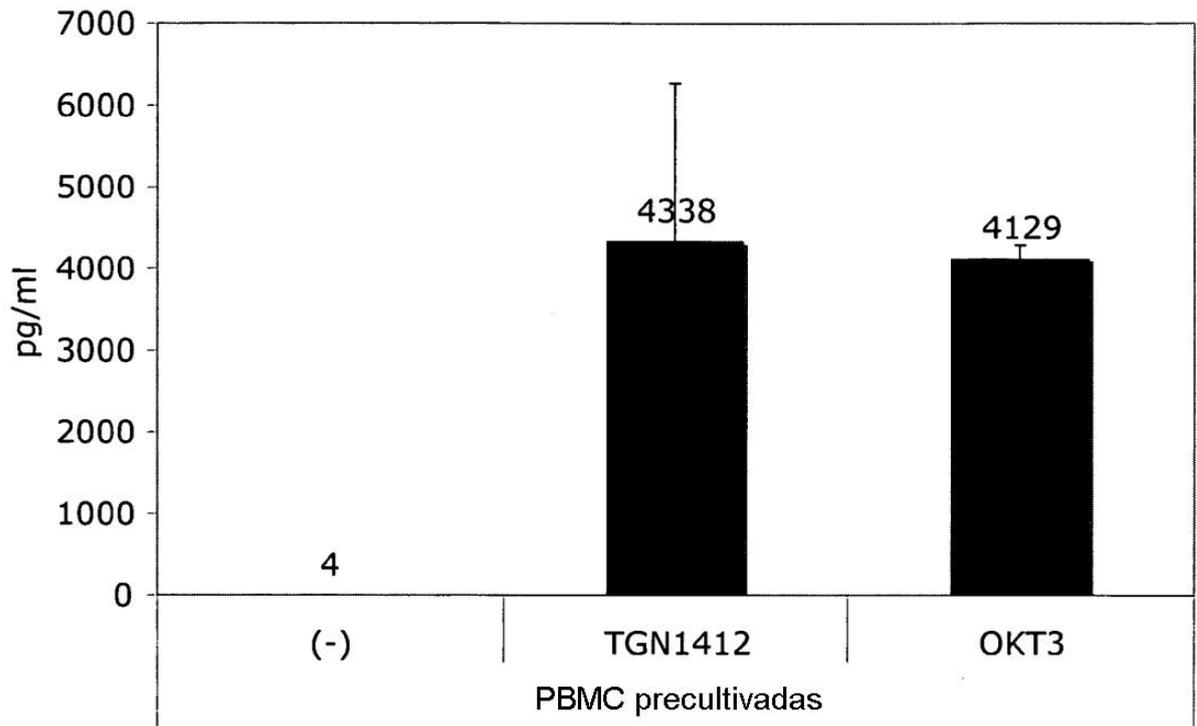


Fig. 1B

IFN γ



IL-2

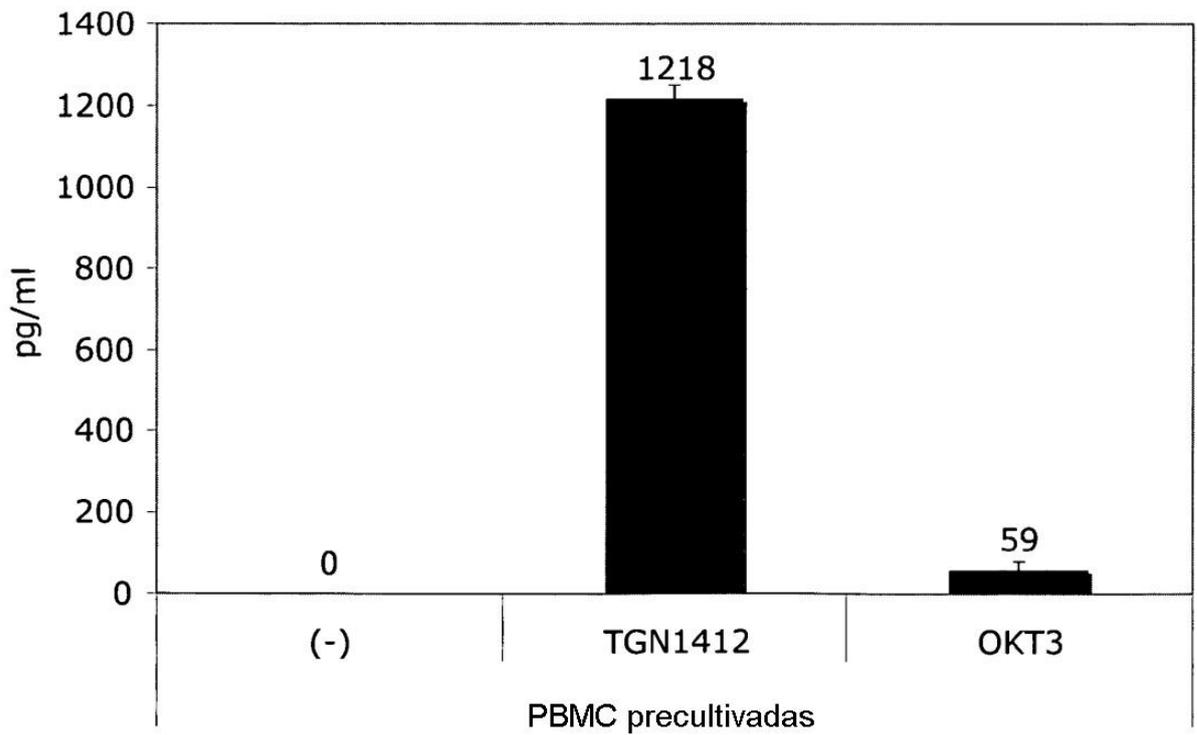
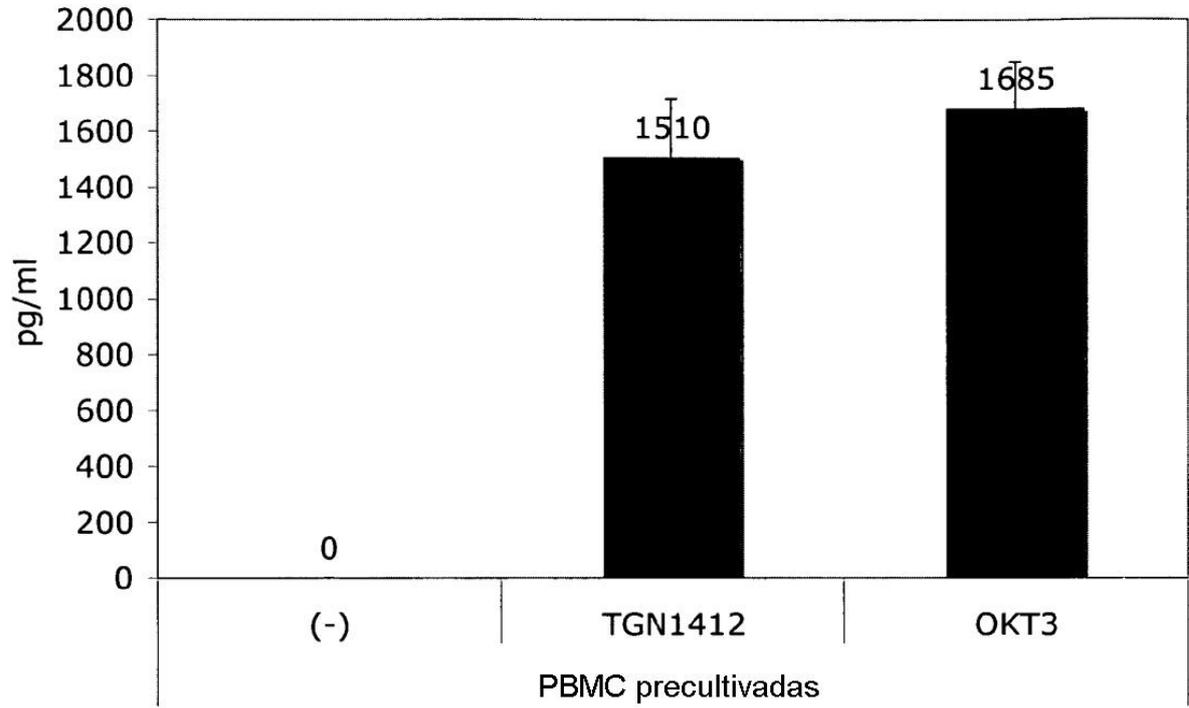


Fig. 1B continuación

TNF



IL-10

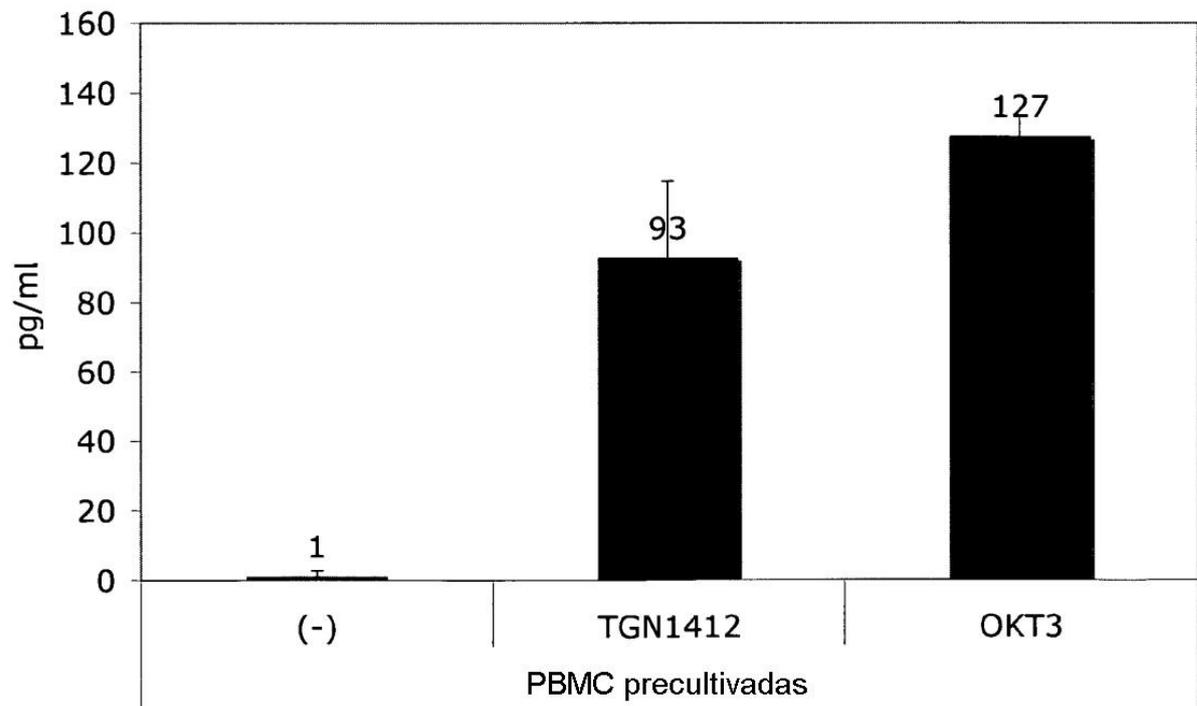


Fig. 2

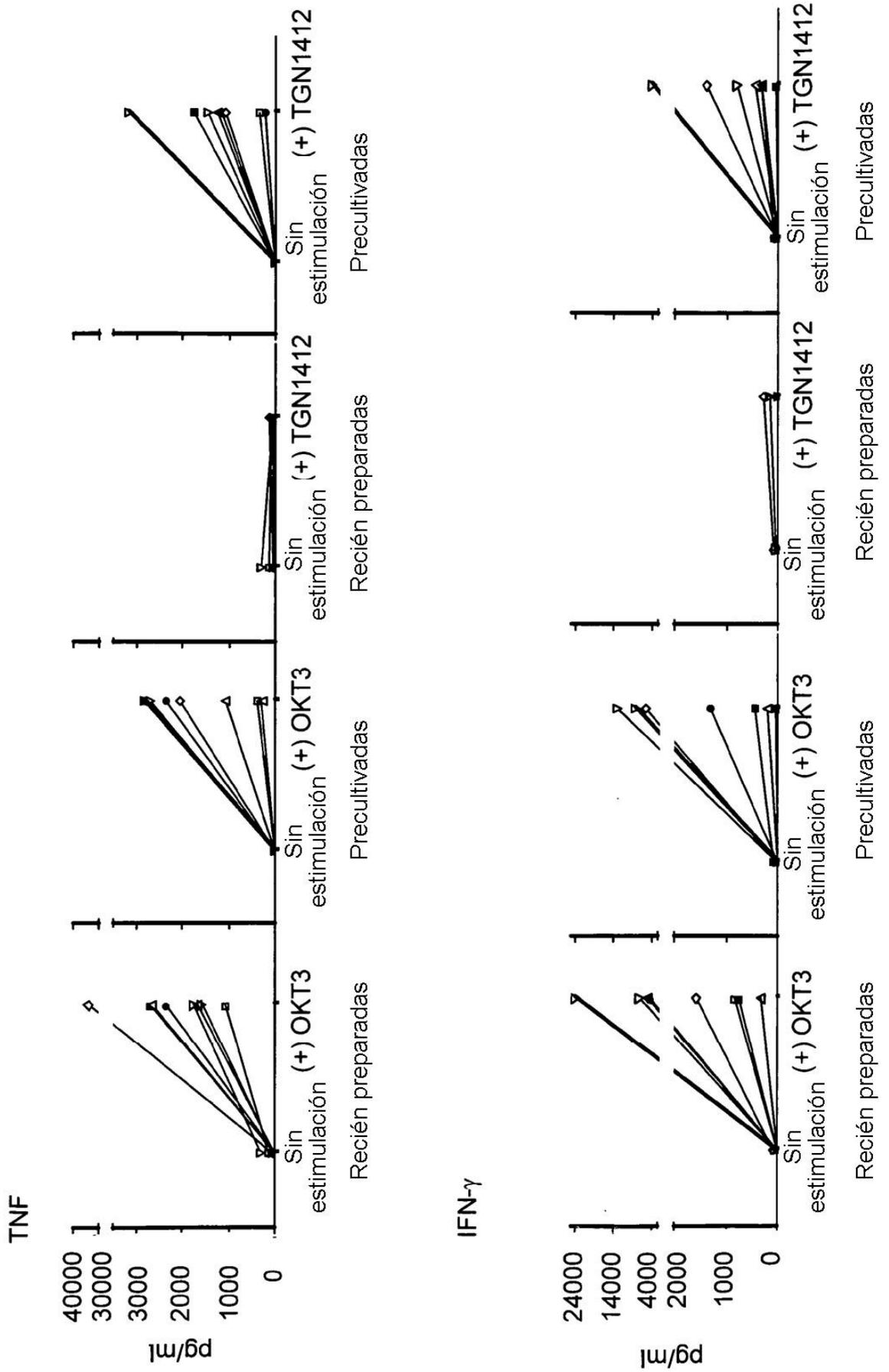


Fig. 2 Continuación

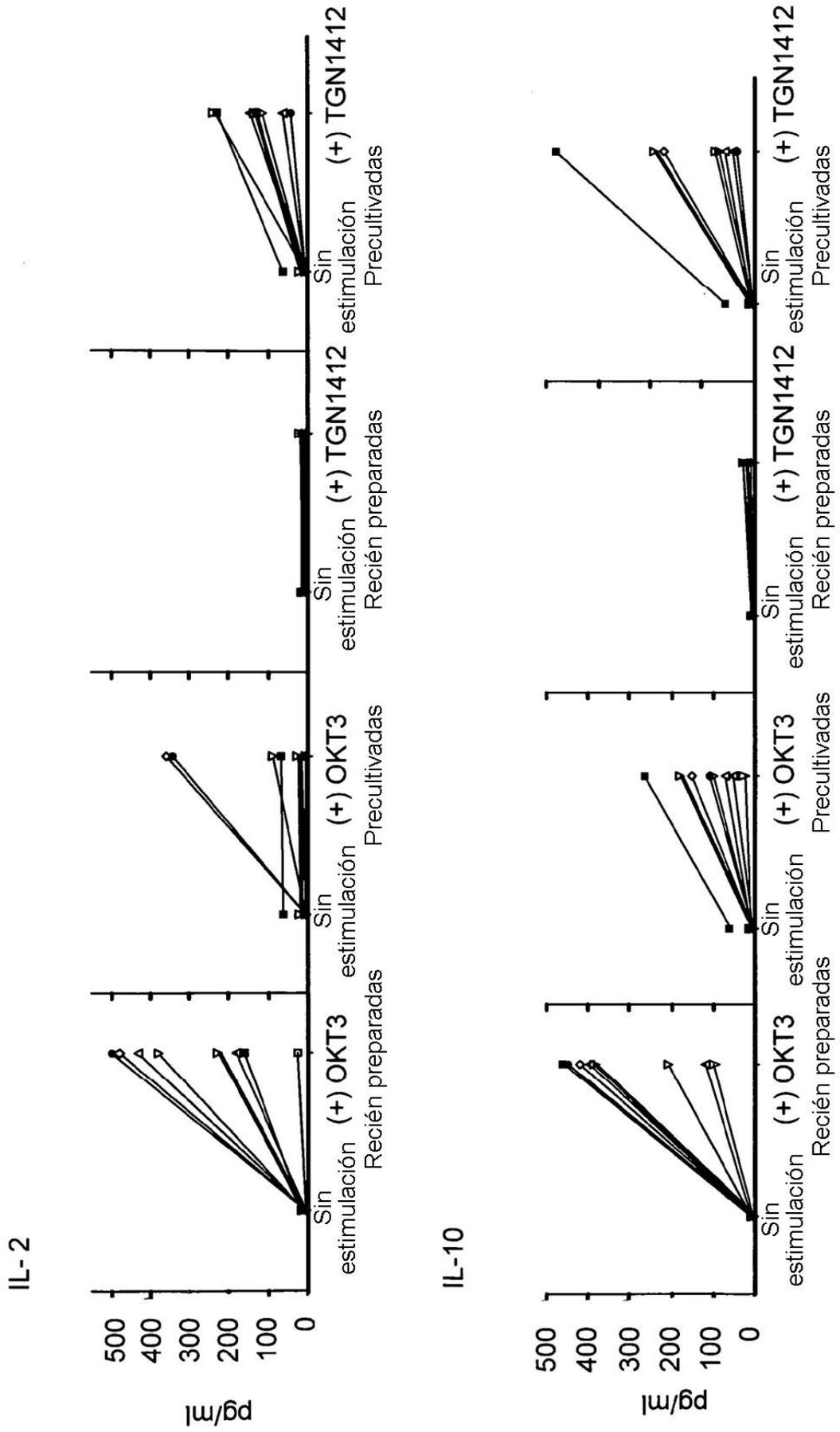


Fig. 3

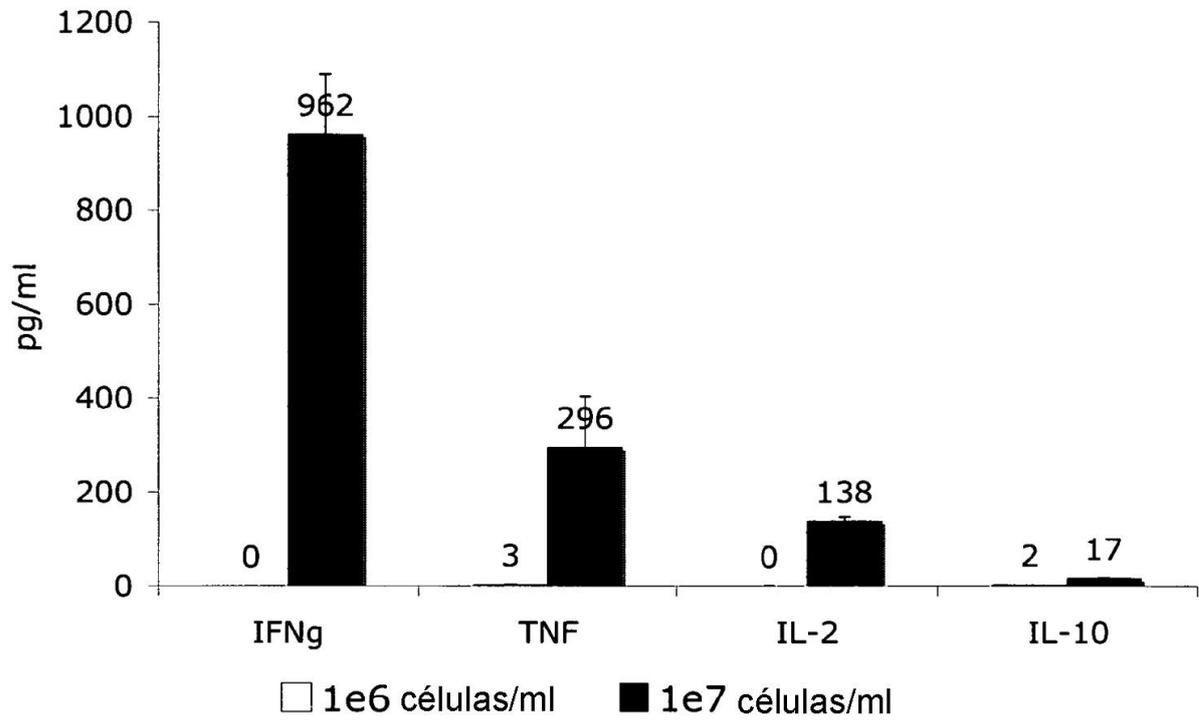
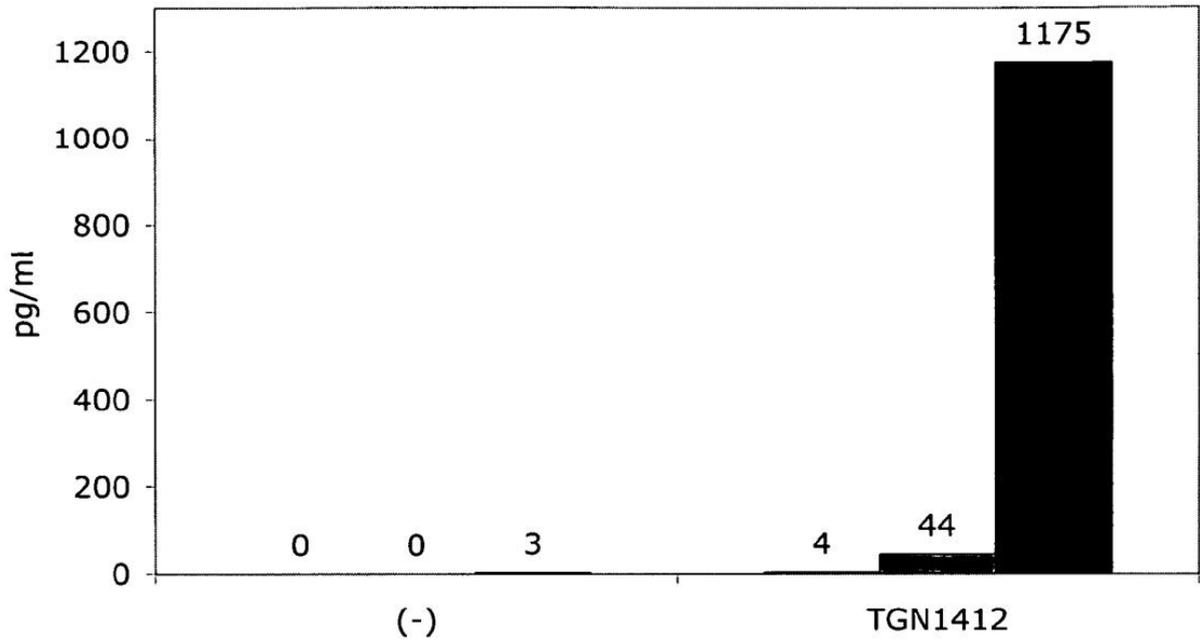


Fig. 4

IFN γ



IL-2

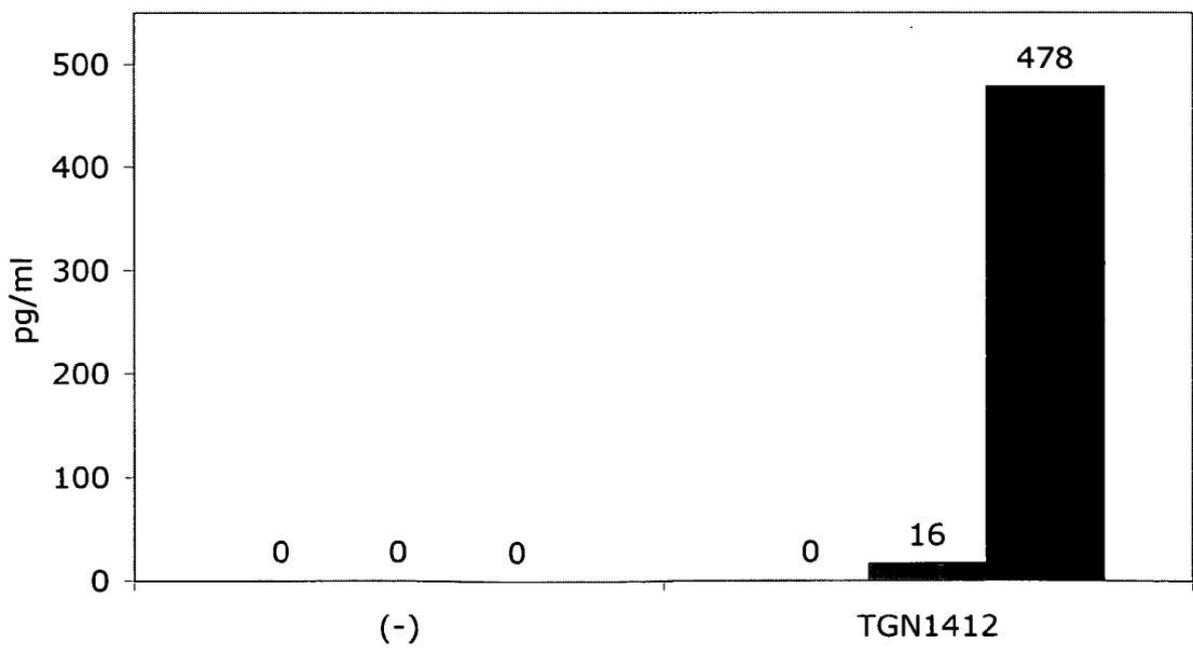
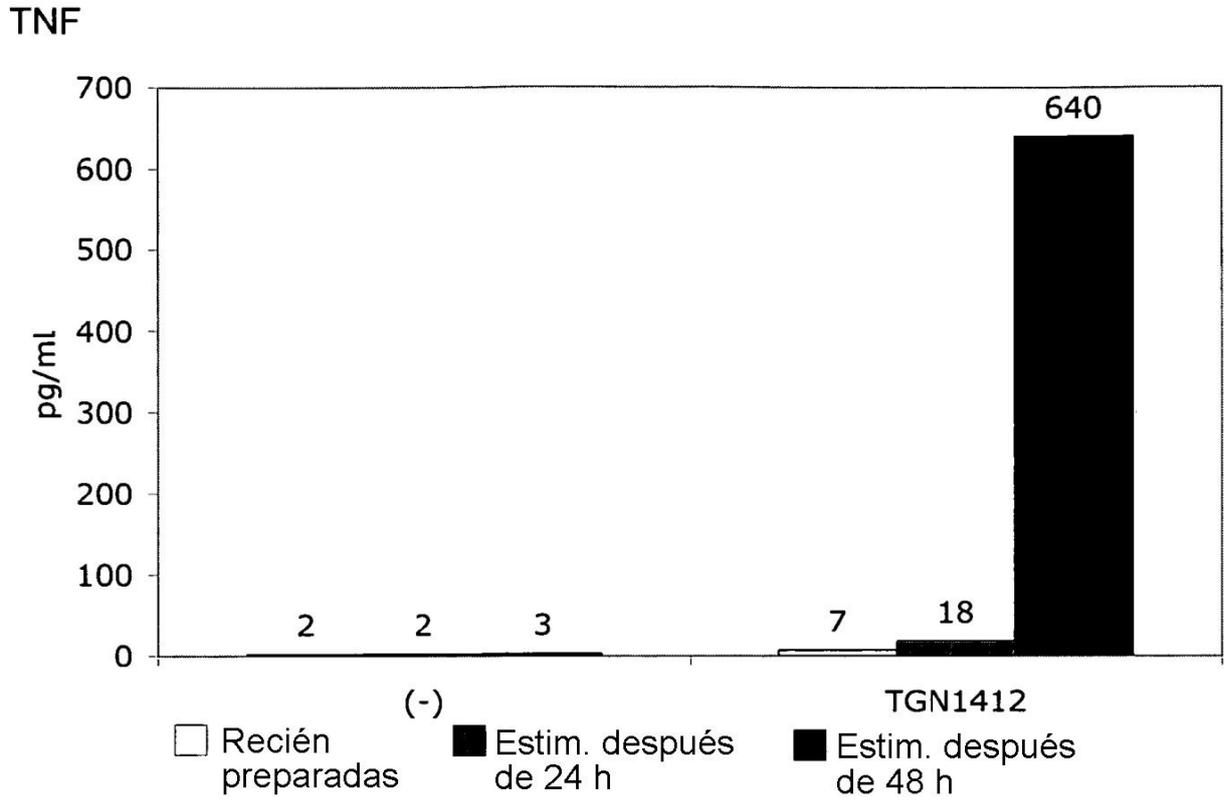


Fig. 4 Continuación



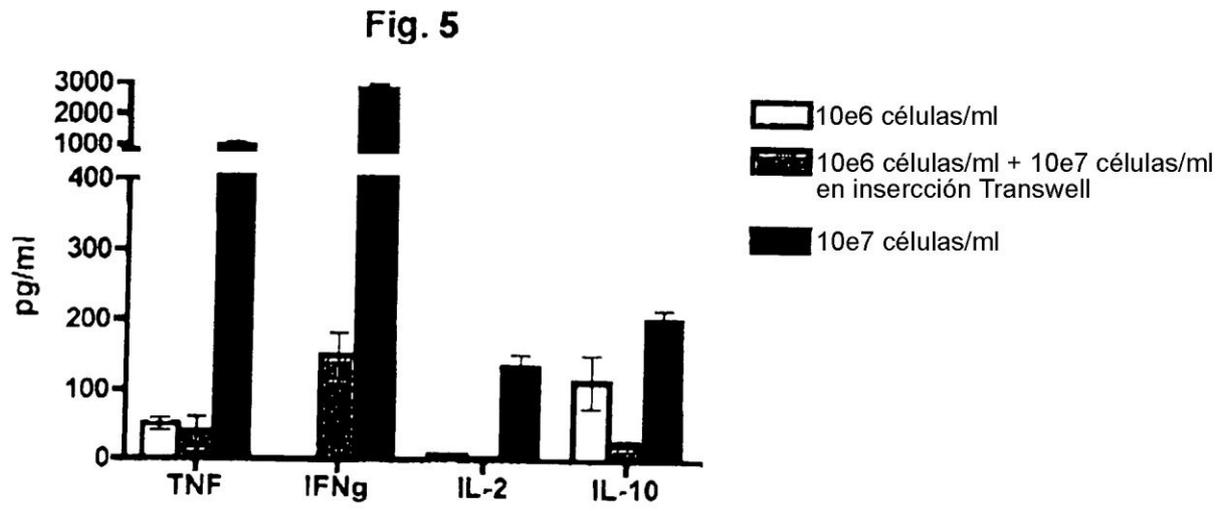


Fig. 6

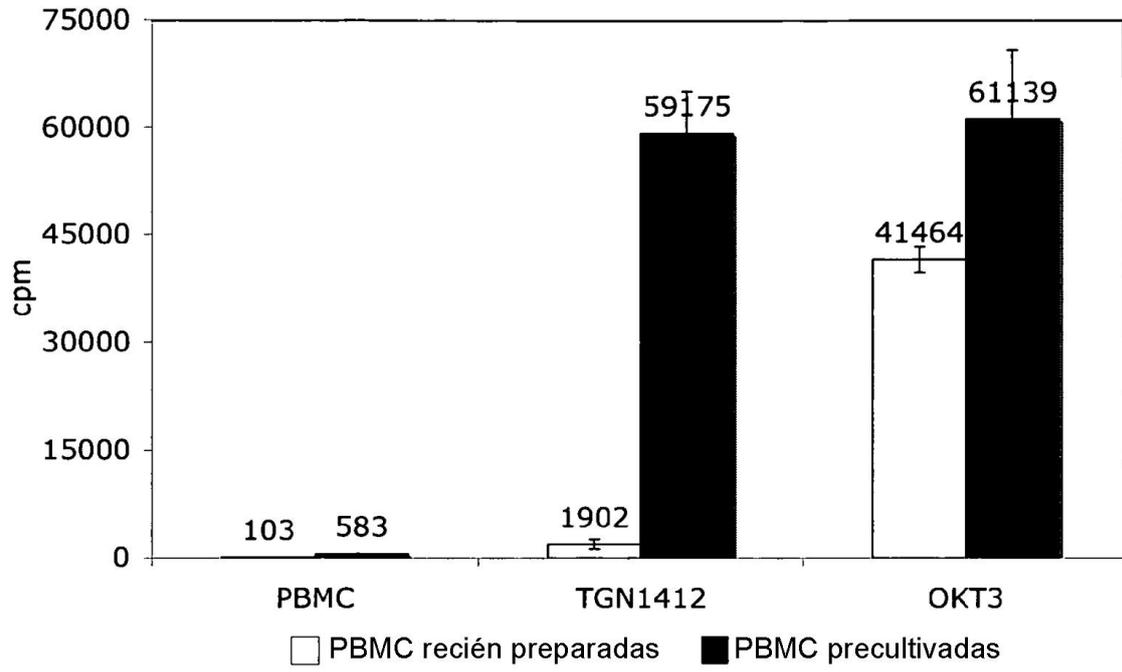
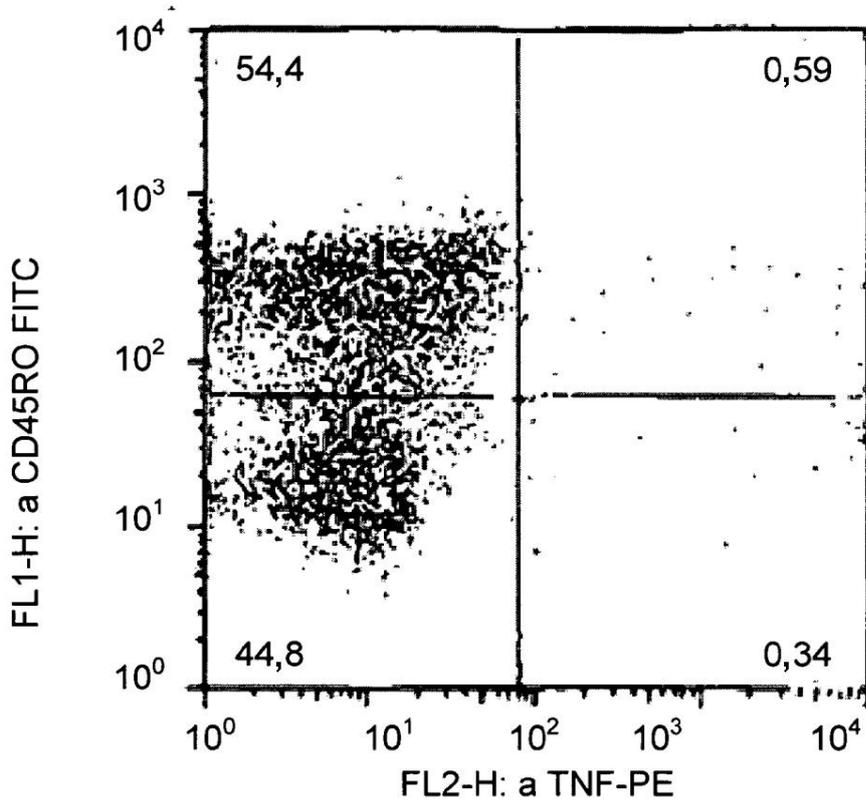
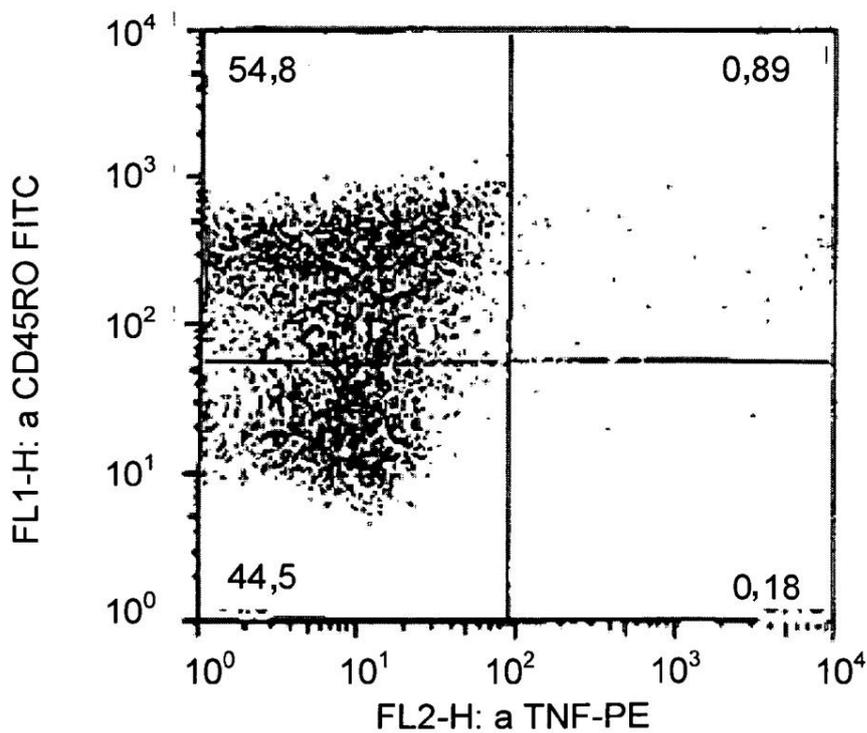


Fig. 7. TNF intracelular

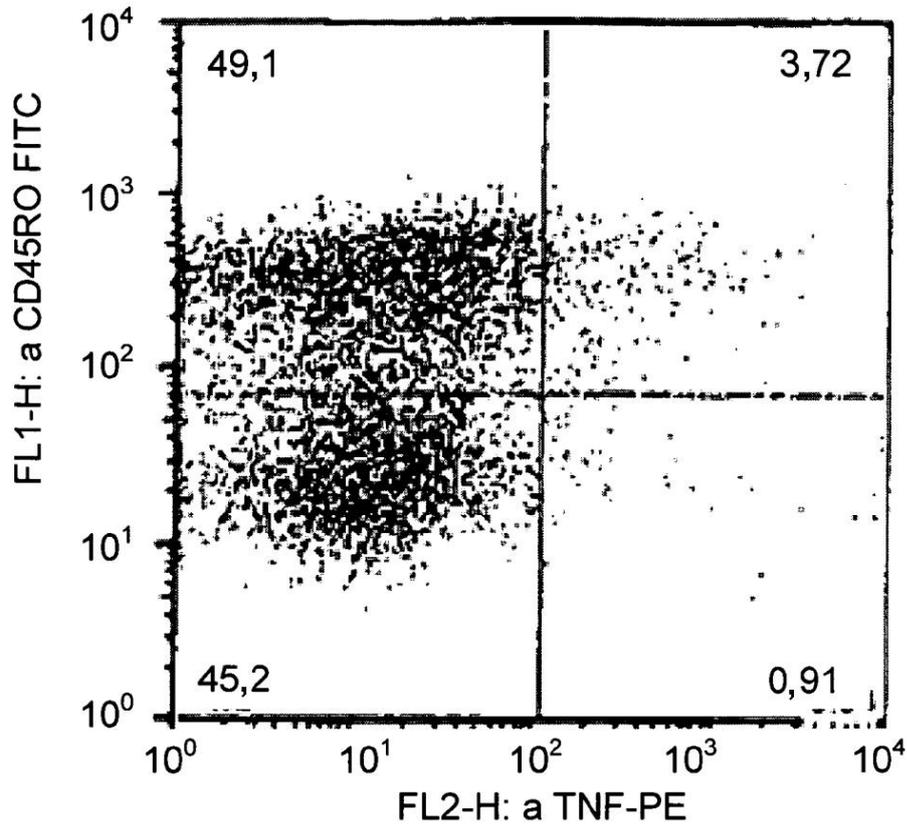
PBMC recién preparadas



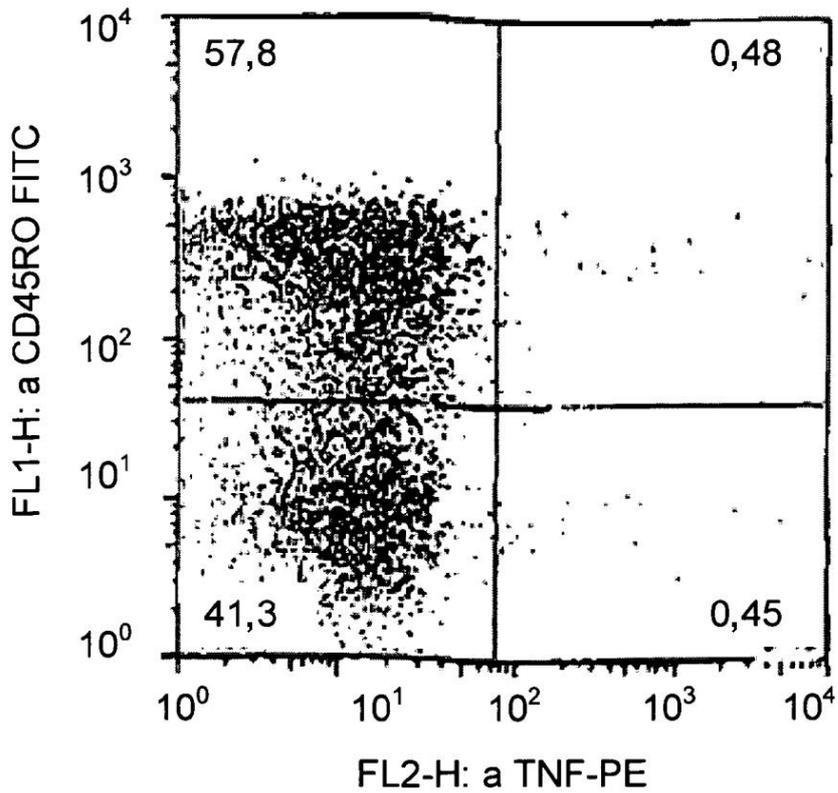
PBMC recién preparadas + TGN1412



PBMC recién preparadas + OKT3



PBMC precultivadas



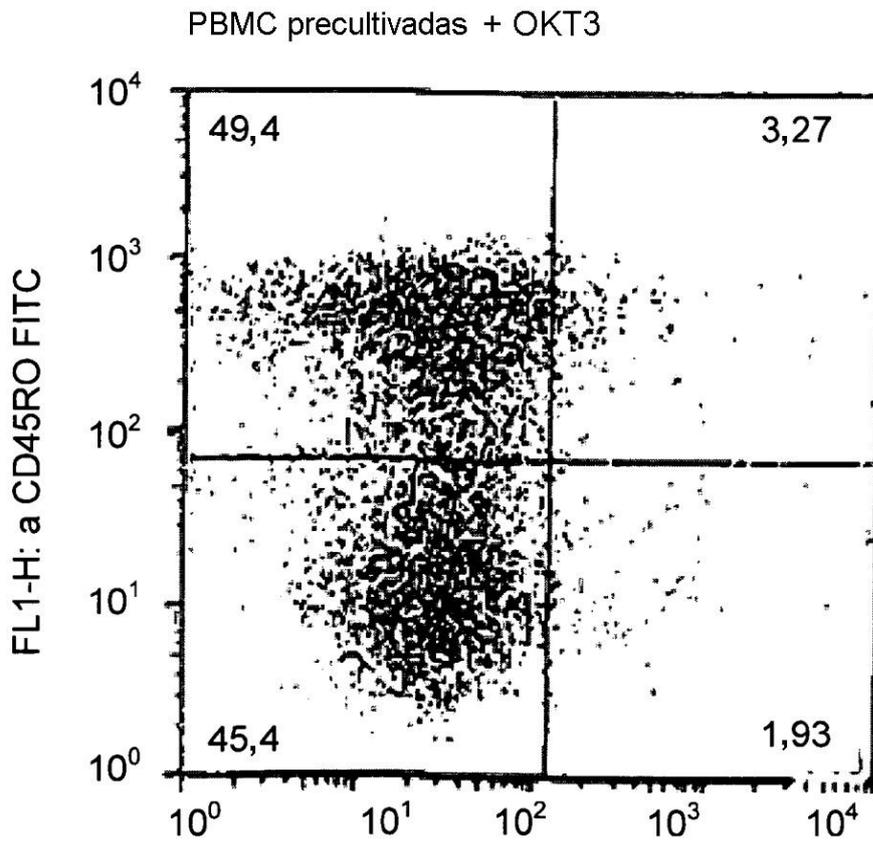
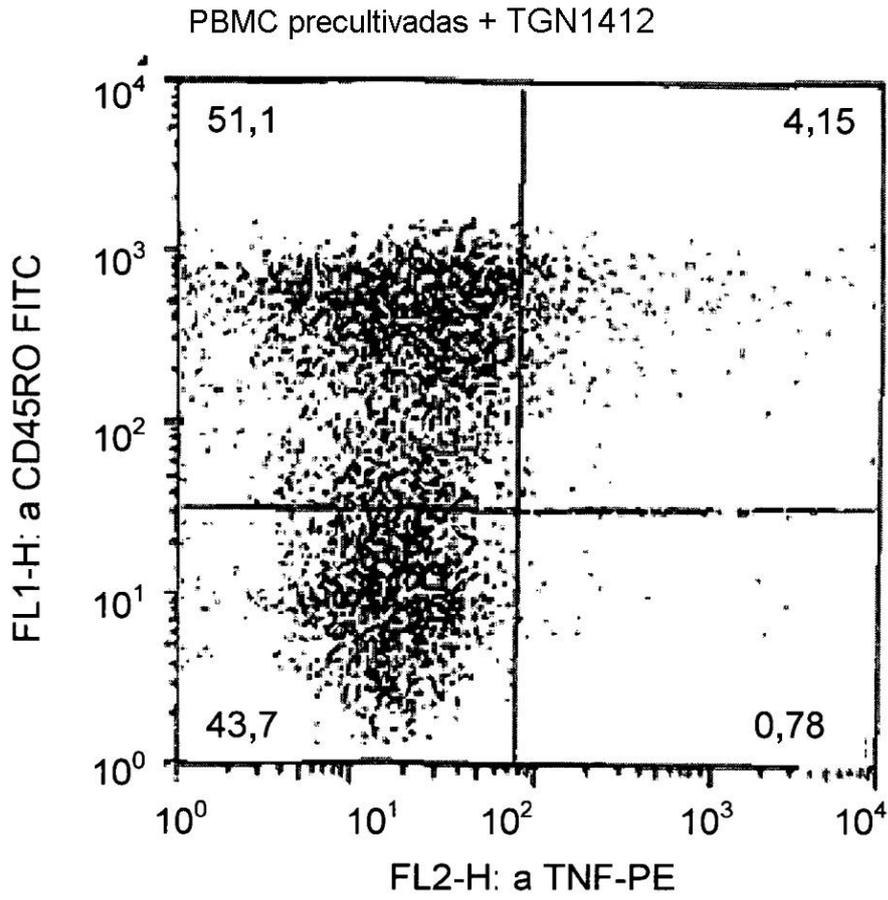


Fig. 8

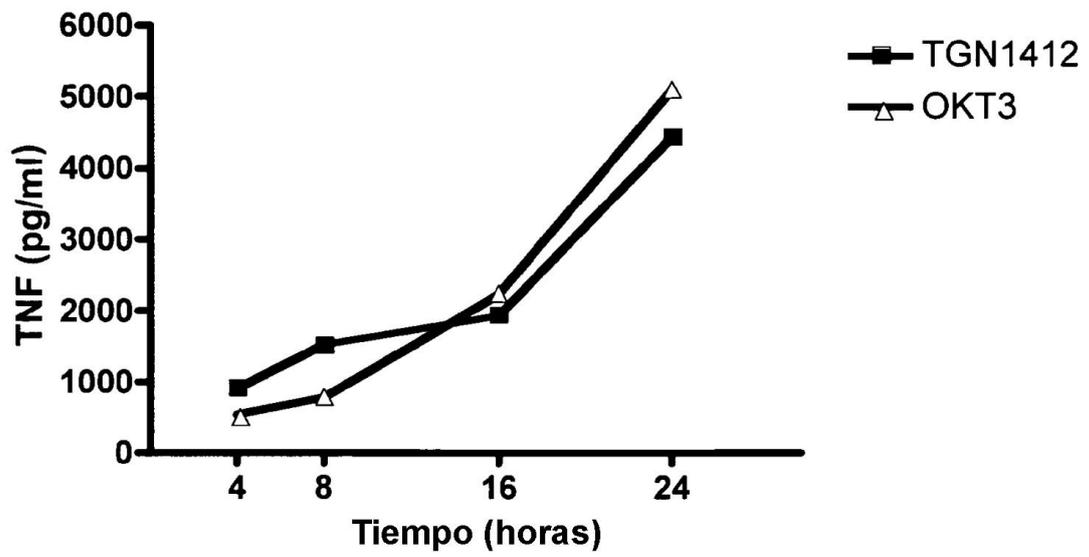
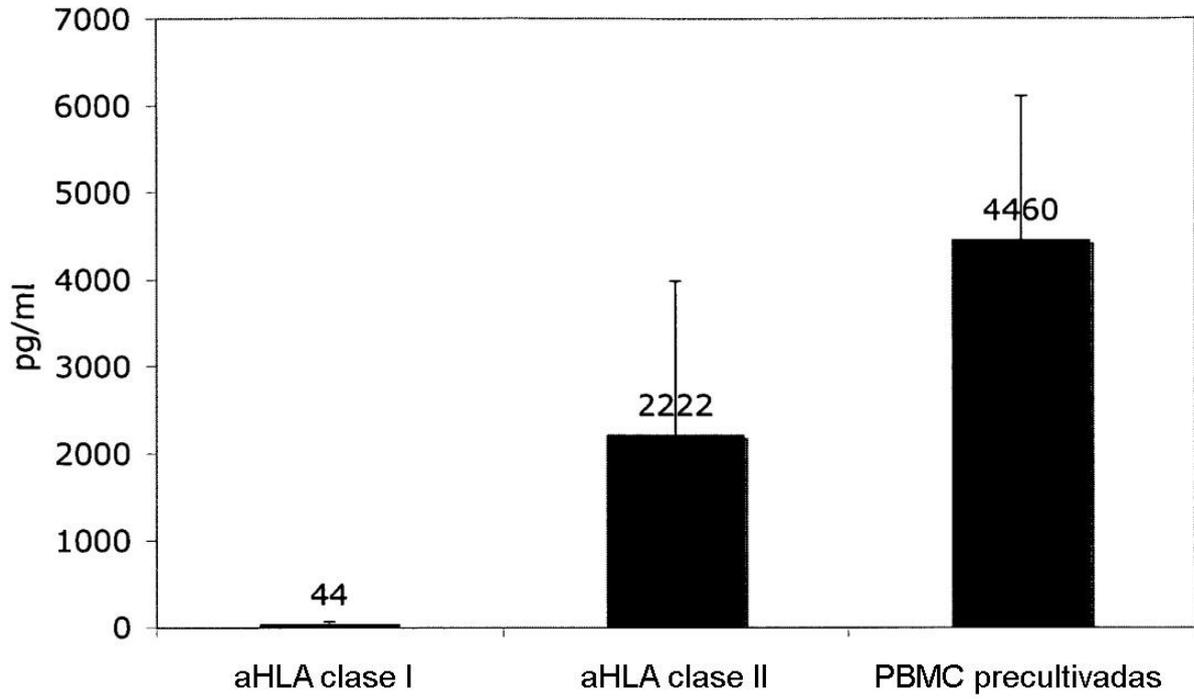


Fig. 9.

IFN γ



IL-2

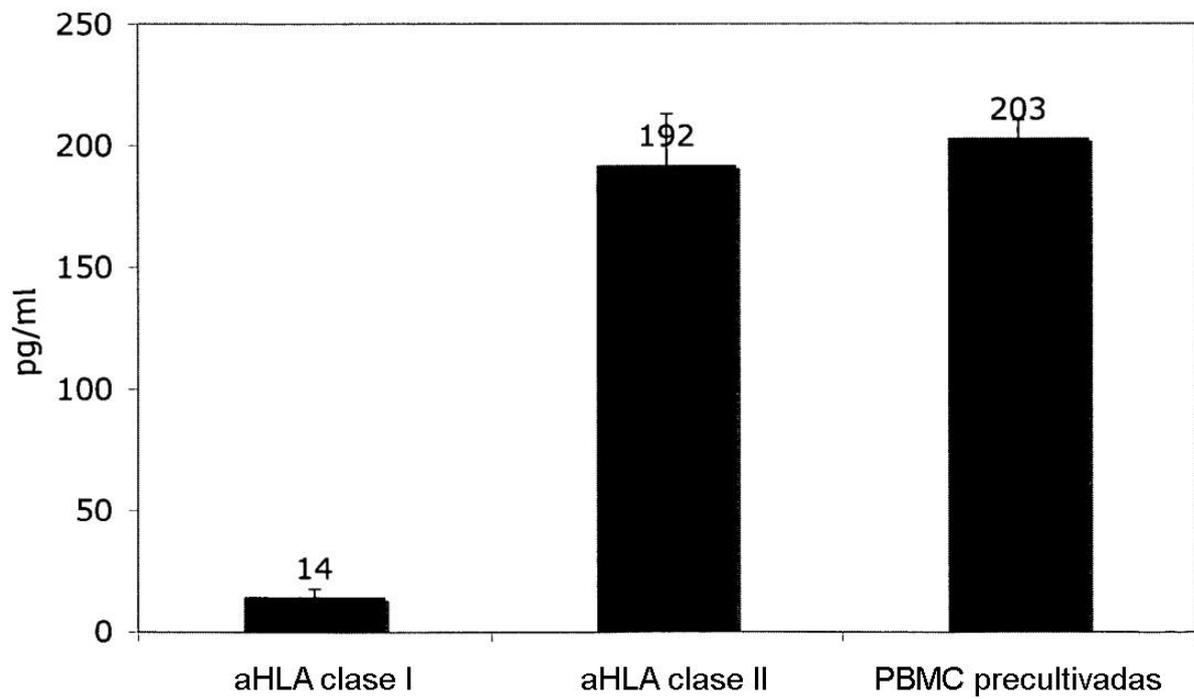
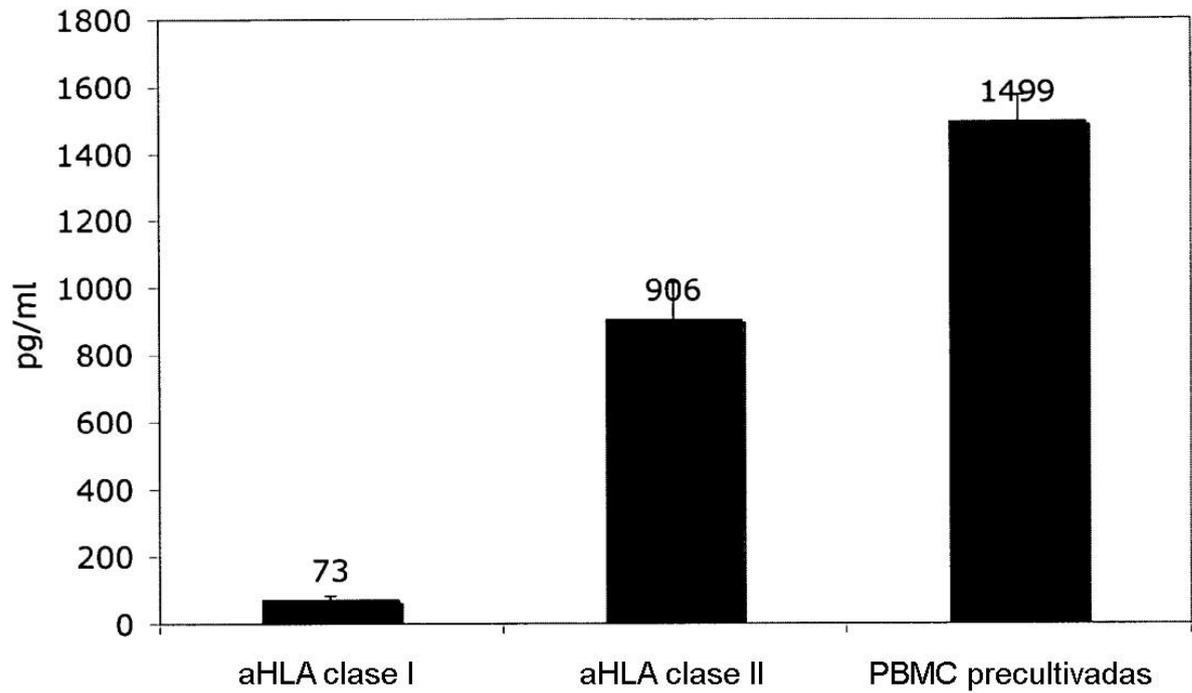


Fig. 9 continuación

TNF



IL-10

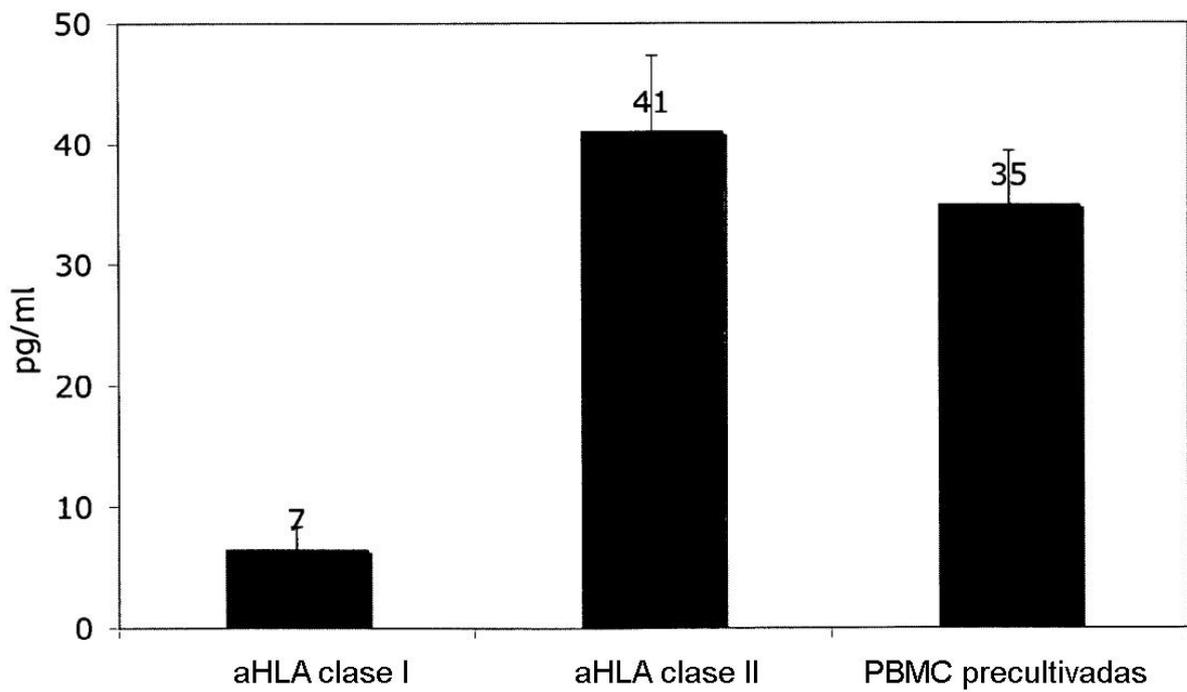
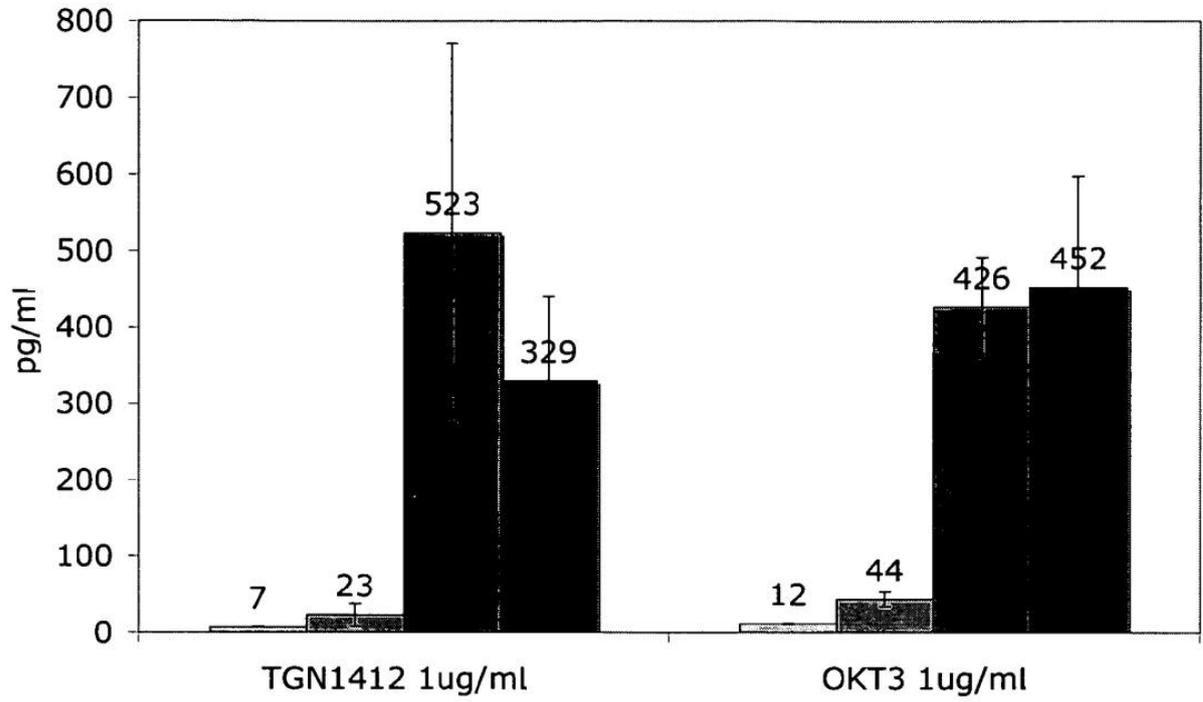


Fig. 10.

IFN γ



IL-2

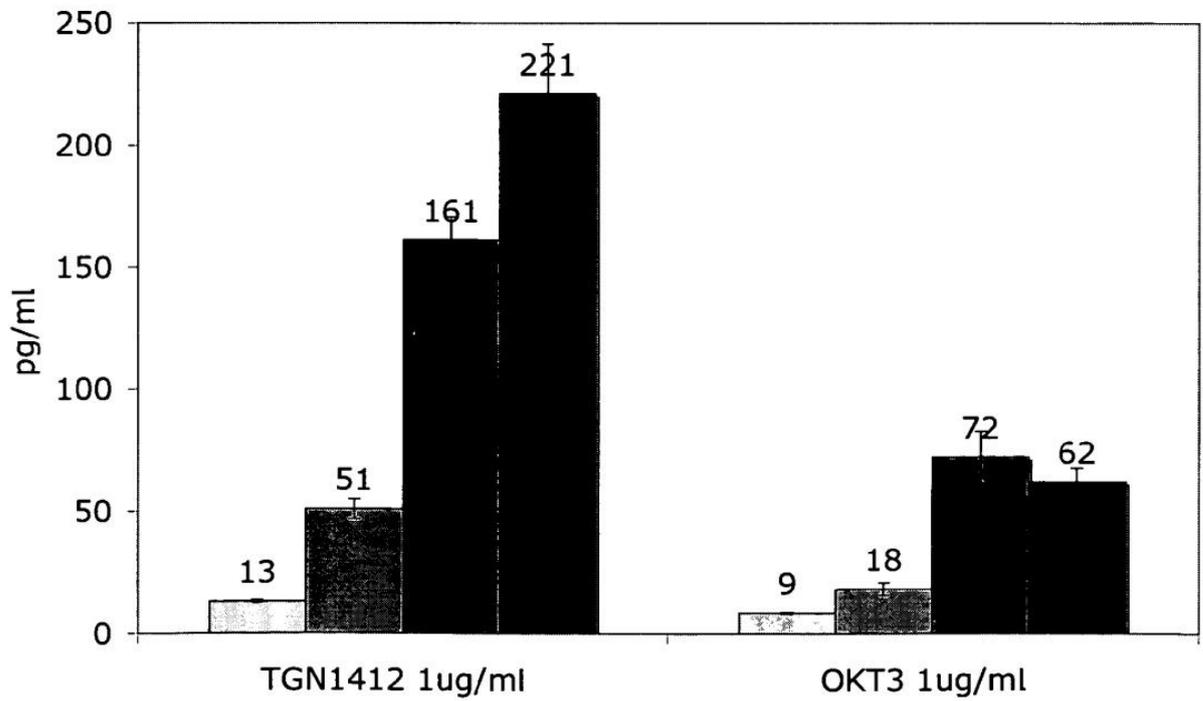
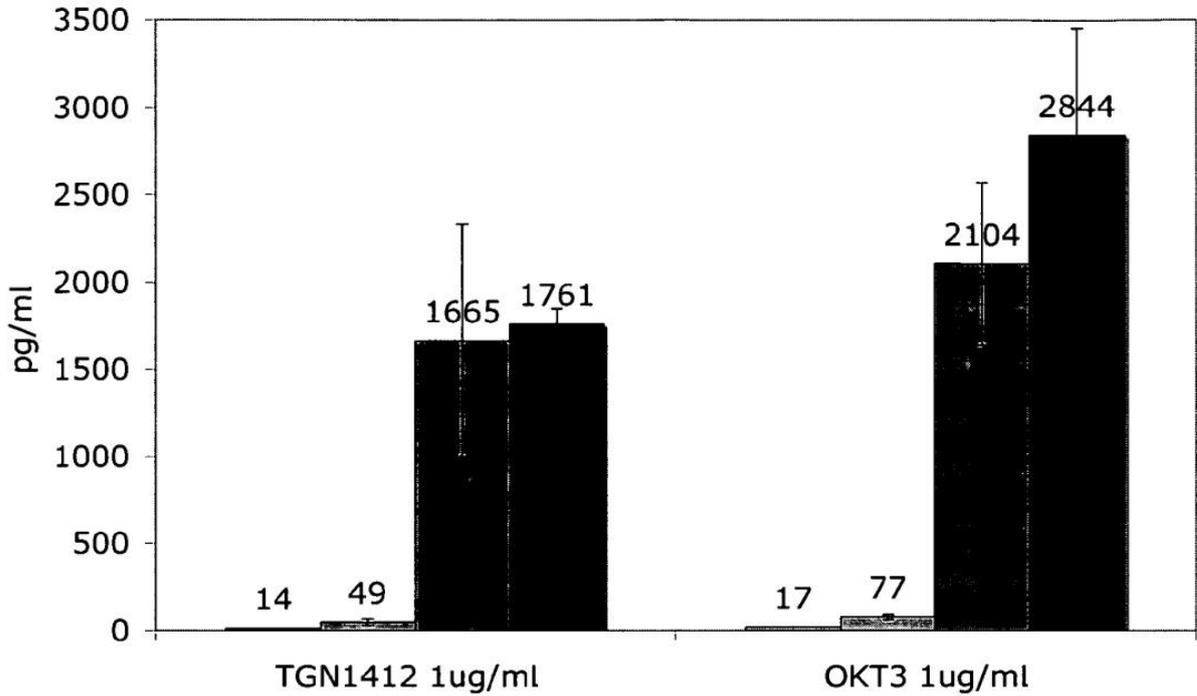
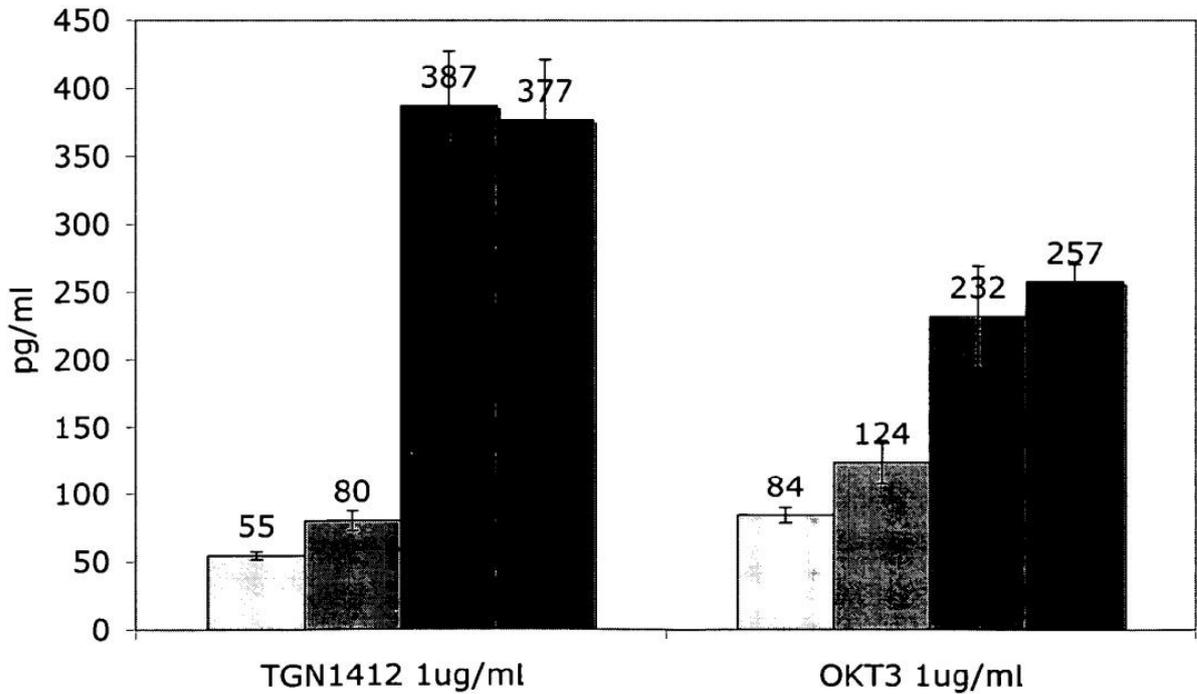


Fig. 10 continuación

TNF



IL-10



□ Dex 1uM ■ Dex 100nM ■ Dex 10nM ■ (-)