

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 352**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2014 PCT/EP2014/055695**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14147216**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2014 E 14722559 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2976641**

54 Título: **Método in vitro para evaluar respuestas de tormenta de citoquinas**

30 Prioridad:

22.03.2013 GB 201305318
24.05.2013 GB 201309385

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.04.2018

73 Titular/es:

IMPERIAL INNOVATIONS LTD (100.0%)
52 Princes Gate Exhibition Road
London SW7 2PG, GB

72 Inventor/es:

MITCHELL, JANE ALISON

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 664 352 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

Método *in vitro* para evaluar respuestas de tormenta de citoquinas

La presente descripción se refiere a un método mejorado para predecir *in vitro* el potencial de un compuesto de ensayo, en particular supuestos agentes biológicos terapéuticos, para causar una respuesta adversa de citoquinas y/o de tormenta de citoquinas (también referida como CRS) en un paciente humano.

En marzo de 2006, ocurrieron eventos adversos graves en un ensayo con voluntarios humanos sanos realizado en el hospital Northwick Park que implicaba al agente biológico terapéutico TGN1412. Al menos seis voluntarios del estudio fueron hospitalizados debido a eventos adversos después de la administración del agente terapéutico y muchos de estos tenían disfunción orgánica múltiple.

Se informó que los voluntarios habían experimentado el síndrome de liberación de citoquinas (también conocido como tormenta de citoquinas y síndrome de liberación de citoquinas) que produce angioedema, hinchazón de la piel y membranas mucosas, parecido a los efectos de la cascada del complemento en la reacción alérgica grave. Los pacientes se trataron con corticosteroides para reducir la inflamación y se les practicó un intercambio de plasma para intentar eliminar el TGN1412 de su circulación. Posteriormente, se confirmó que los voluntarios habían padecido una tormenta de citoquinas y que, paradójicamente, sus células sanguíneas blancas habían desaparecido casi completamente varias horas después de la administración de TGN1412.

TGN1412 se había ensayado en animales antes de la administración a seres humanos. Sin embargo, se cree que, en el aspecto relevante, el agente terapéutico incitó una respuesta diferente en los seres humanos que en los animales de laboratorio. Se ha establecido la hipótesis de que la reacción observada en los seres humanos solo podría haber ocurrido en los animales con células T de memoria. Considerando que los animales criados en condiciones de laboratorio, "condición estéril", no tienen esencialmente células T de memoria, por lo tanto, no incitan la misma respuesta. Ahora se revela que la especie de animal empleada en los estudios de laboratorio simplemente tiene menos células T de memoria y así no incitan las mismas respuestas, de manera que, ejemplo, los ratones no parecen incitar reacciones de tormenta de citoquinas. TGN1412 también se ensayó en células T humanas aisladas y primates y no hubo ninguna sugerencia de los problemas que se observaron posteriormente en los seres humanos. Sin embargo, ahora sabemos que TGN1412 requiere una interconexión con células endoteliales (u otras) con el fin de activar las células inmunes (véase más adelante).

La tormenta de citoquinas se produce cuando la liberación de citoquinas por las células inmunes (y otras) se vuelve excesiva y daña el tejido y órganos. En algunos pacientes, la respuesta es tan grave que causa la muerte.

El endotelio que recubre la superficie luminal de cada vaso sanguíneo es la primera célula de contacto para los leucocitos circulantes activados. La interacción entre el endotelio y los leucocitos puede dar como resultado la amplificación profunda de las respuestas inflamatorias. Los estudios pioneros de Stebbings y otros¹ sugieren que este fenómeno se requiere con el fin de observar una respuesta de citoquinas al superagonista anti-CD28 TGN1412 *in vitro* por parte de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana.

Actualmente, existe un número limitado de ensayos *in vitro* que puedan detectar una respuesta de citoquinas a un superagonista anti-CD28 tal como TGN1412. Estos ensayos emplean bien una mezcla de componentes celulares incluyendo:

- células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC) y PBMC¹,
- anticuerpo inmovilizado (fijado; p. ej., dejando que disoluciones acuosas de anticuerpo se evaporen dejando el anticuerpo/fármaco adherido a la estructura de la superficie) en placas de plástico¹ o lechos sintéticos² antes de ser añadido a PBMC, o
- cultivos de sangre humana completa³.

Está claro que los bioensayos de tejidos humanos requieren una mezcla de componentes celulares como se pone de manifiesto por los descubrimientos de que TGN1412 y moléculas relacionadas no activan preparaciones aisladas de PBMC o HUVEC, pero cuando las PBMC y HUVEC se cultivan conjuntamente, TGN1412 incita una respuesta de citoquinas fuerte^{1,3,4}. Sin embargo, el presente inventor cree que este tipo de bioensayo y otros que aparecen en la bibliografía son fundamentalmente imperfectos ya que se basan en el mezclado de células endoteliales de un donante (en el caso de HUVEC; células fetales) y las PBMC de otro. Además, los bioensayos convencionales de mezcla de tejido no describen apropiadamente, en algunos casos, algunos anticuerpos de citoquinas³⁻⁵ tales como TGN1412 que tienen un efecto profundo de tormenta de citoquinas de aquellos que causan respuestas graves, pero más moderadas y gestionables, tales como Campath. Así, los resultados obtenidos en los ensayos basados en células del estado de la técnica no reflejan adecuadamente las mismas tendencias que las observadas en las respuestas *in vivo* a los mismos agentes terapéuticos.

Este problema se investigó en un artículo relativamente reciente de Findlay et al⁴ que afirma:

"Los cultivos de PBMC.HUVEC no reflejan completamente las mediciones reportadas *in vivo* o la liberación estimulada *in vitro* por TGN1412 inmovilizado, indicando que hay mecanismos estimuladores alternativos que desencadenan la liberación de la liberación de diferentes citoquinas" (página 142 col 1 primer párrafo).

Findlay *et al* continuaron con la hipótesis de que esto puede deberse a uno o más de los siguientes:

- 5 1. "Las HUVEC están cerca de la senescencia y se aíslan de un vaso hipóxico. Por lo tanto, pueden no proporcionar el mejor modelo para las interacciones endoteliales. Además, las células endoteliales de diferentes órganos y vasos sanguíneos presentan una heterogeneidad considerable y podría haber características específicas de tejido que no poseen las HUVEC que se requieren para una coestimulación máxima, p. ej., las vénulas altamente endoteliales que median la adherencia y migración de las células T *in vivo*.
- 10 2. Para la estimulación máxima se requieren tipos de células además de los presentes en los cultivos de HUVEC.
3. El bajo nivel de producción de IL-2 en cocultivos da como resultado un consumo continuo para dirigir la proliferación de las células T mientras que, en los ensayos de inmovilización, un mayor nivel de producción da como resultado niveles saturantes y acumulación en el sobrenadante.
- 15 4. Lo más probablemente, en el ensayo de inmovilización ocurre un mecanismo diferente de liberación de citoquinas comparado con el cocultivo, que implica posiblemente diferentes subconjuntos de células T y que adicionalmente en los cocultivos, la liberación de IL-6, IL-8 y TNFalfa ocurre mediante un mecanismo diferente a la liberación de IL-2 e IFNgamma, p. ej., la producción de IL-6 por HUVEC en respuesta a TNFalfa".

El punto 2 se investigó en artículos posteriores. Desde 2006, los expertos en la técnica han estado intentando abordar este problema y, hasta la fecha, no se ha identificado un ensayo estándar adecuado para uso general, que sea predictivo para resultados *in vivo*.

Esto deja un hueco en la capacidad de ensayar agentes terapéuticos para determinar inconvenientes. Así, existe actualmente una necesidad urgente insatisfecha de desarrollar ensayos de prueba de tejido humano adecuados que, por ejemplo, predecirán las respuestas de tormenta de citoquinas inducidas por bioterapéuticos, tales como TGN1412⁶ y/o para ensayar la eficacia en el desarrollo de nuevos fármacos y moléculas pequeñas, así como terapias basadas en proteínas o en células madre que interaccionan con las rutas inmunes.

El presente inventor ha descubierto un ensayo mejorado que parece proporcionar resultados análogos a los observados en seres humanos a los que se administra TGN1412 y, de esta manera, satisface una necesidad significativa insatisfecha en el área del ensayo de la seguridad, en particular, para fármacos biológicos. La invención, a diferencia del ensayo del estado actual de la técnica, también permite el ensayo directo de poblaciones celulares relevantes para la situación clínica *in vivo* concretamente endotelial y PBMC de grupos de pacientes diana.

Aunque los ensayos de la técnica anterior pueden usarse para demostrar una señal de citoquinas frente a TGN1412 el presente inventor establece la hipótesis de que debido a que los ensayos de la técnica anterior emplean células de donantes no concordantes, son susceptibles de producir respuestas que son falsos positivos y falsos negativos. El último puede resultar del mezclado de tejido de donantes no concordantes, que puede activar/inhibir respuestas inmunes nativas para cada donante individual. Esto se ilustra por los datos recientes del inventor que muestran que en un bioensayo de tejido mixto de sangre completa/HUVEC había una activación inflamatoria profunda observada usando sangre de al menos el 10 % de los donantes³.

No es posible fácilmente concordar células HUVEC con el otro tejido, tal como PBMC, empelado en el ensayo y así se requería un sistema alternativo.

40 **Resumen de la invención**

La presente descripción proporciona un método *in vitro* para ensayar la estimulación de una respuesta de tormenta de citoquinas que comprende las etapas de:

- a. cocultivar PBMC y células endoteliales diferenciadas concordantes para proporcionar un sistema representativo de las respuestas humanas *in vivo*, y
- 45 b. exponer el sistema de células cocultivadas a un agente de ensayo,
- c. analizar el sistema para determinar la presencia de una o más citoquinas liberadas después de exponer el sistema de cocultivo a dicho agente de ensayo, y
- d. opcionalmente, evaluar la respuesta al agente de ensayo en comparación con una respuesta a uno o más agentes control.
- 50 en el que las células endoteliales son autólogas respecto a las PBMC; y
- en el que las células endoteliales derivan de células endoteliales circulantes de crecimiento tardío.

Los presentes inventores han establecido que pueden prepararse BOEC (células endoteliales circulantes de crecimiento tardío) a partir de una muestra de sangre y también pueden prepararse PBMC, por ejemplo, a partir de la misma muestra (u otra muestra de sangre del mismo donante) para uso en el ensayo descrito en la presente memoria.

5 Ventajosamente, el presente inventor ha descubierto que este sistema de ensayo es predictivo de las respuestas *in vivo* y es probablemente una herramienta potente en la investigación y en las evaluaciones de seguridad farmacéutica. En estudios de comparación con el ensayo actual estándar de la industria, que utiliza cocultivos de HUVEC y PBMC o sangre humana completa, que no es concordante, el inventor ha descubierto que el ensayo según la presente descripción predice de forma más exacta el 'orden de rango' de algunos fármacos para causar reacciones de tormenta de citoquinas.

El inventor también ha mostrado previamente que, a diferencia de las BOEC, las células endoteliales derivadas de otros tipos de células madre (concretamente las células endoteliales derivadas de células madre embrionarias; hESC-EC) tienen una respuesta inmunológica profundamente comprometida⁸ que las haría predictores no adecuados de las respuestas de tormenta de citoquinas en cualquier tipo de ensayo basado en células *in vitro*.

15 De forma importante, el bioensayo según la presente descripción (BOEC más PBMC, pero ninguno de los dos tipos de células solo) no detecta un resultado positivo para anticuerpos de control negativo que se proporcionan de forma segura a pacientes y que no inducen tormenta de citoquinas.

Ventajosamente, el ensayo descrito aquí puede emplearse para investigar la intensidad de la respuesta de citoquinas. Los ensayos de la técnica anterior, por ejemplo, ensayos de cocultivo de HUVEC, no son capaces de usarse de esta manera.

Además, cuando los materiales, por ejemplo, BOEC y PBMC, se toman de un único sujeto, tal como un sujeto humano, el ensayo puede usarse para investigar la respuesta de una persona individual a un agente terapéutico o agente de ensayo dado.

25 Así, en una realización, el ensayo descrito en la presente memoria puede emplearse en un contexto de medicina personalizada para predecir la idoneidad de un agente terapéutico para un ser humano dado.

Descripción detallada de la descripción

Un método *in vitro* tal y como se emplea aquí es uno realizado completamente fuera del cuerpo de un ser humano o animal usando materiales derivados generalmente de una muestra, tal como tejido y/o sangre humana.

30 La tormenta de citoquinas (también referida como hipercitoquinemia) tal y como se emplea en la presente memoria es una respuesta inmune potencialmente mortal que resulta de la señalización positiva inapropiada entre las citoquinas y las células inmunes y finalmente la liberación de citoquinas. En los pacientes, esto da lugar a fiebre alta, hinchazón y enrojecimiento, fatiga extrema, náusea y, en algunos casos, es mortal. Aunque se piensa que más de 150 mediadores inflamatorios conocidos se liberan durante la tormenta de citoquinas, generalmente, en el ensayo *in vitro* de la presente descripción se miden una o más citoquinas adecuadas, por ejemplo, se miden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más citoquinas, tales como las citoquinas seleccionadas independientemente de IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-2, IL-10, IFN γ , IL-12p70 y GM-CSF (por ejemplo, IL-6, TNF α , IFN γ , IL-2 e IL-8).

La lectura para este ensayo no está limitada a las citoquinas, sino que podría ser cualquier factor liberado que indique la activación celular y/o cualesquiera respuestas celulares (p. ej., proliferación) que indique activación y/o inflamación.

40 Cuando solo se mide una citoquina, puede ser especialmente apropiado incluir concomitantemente un control positivo para la tormenta de citoquinas en el ensayo para proporcionar un contexto a la respuesta.

Así, en una realización, el ensayo comprende uno o más controles, por ejemplo, un control positivo y/o negativo, tal como un control positivo, en particular un superagonista anti-CD28, por ejemplo, TGN1412- o ANC28 (tal como TGN1412) y/o un anticuerpo anti-CD52, tal como alemtuzumab (Campath), que causan respuestas de citoquinas en el hombre y activan las células en el ensayo. Por el contrario, los anticuerpos tales como el anticuerpo de CD20 Arzerra no causan una tormenta de citoquinas profunda indiscriminadamente en el hombre ni activan cocultivos de células en el ensayo.

ANC28 es un superagonista CD28 y un modelo para la respuesta de TGN1412. TGN1412 puede emplearse en el ensayo según la presente descripción y los resultados obtenidos son igualmente predictivos de las respuestas de CRS.

En una realización, el ensayo puede optimizarse para un superagonista dado empleado, quizá como un control, en el ensayo, por ejemplo, ANC28 puede emplearse con medios según los ejemplos descritos en la presente memoria.

TGN1412 puede emplearse con medios que contienen aproximadamente 2 % de suero humano.

El experto en la técnica es muy capaz de afinar y optimizar las condiciones para un sistema dado en relación con los medios y suero usando solo técnicas rutinarias.

Las PBMC son fáciles de obtener a partir de sangre donada por voluntarios.

5 Las células endoteliales diferenciadas concordantes tal y como se emplean en la presente memoria se refieren a células endoteliales que son concordantes en sangre, concordantes en HLA, concordantes en sexo o completamente concordantes con las PBMC. Completamente concordantes tal y como se emplea en la presente memoria significa autólogas, es decir, las PBMC y las células endoteliales son del mismo donante.

En una realización, las PBMC y las células endoteliales derivan de la misma muestra de un único donante.

10 Los inventores han mostrado que las células endoteliales diferenciadas descritas aquí se comportan, en maneras clave, como las células endoteliales de vasos maduros. Estas incluyen (i) alineamiento en la dirección de la fuerza de cizallamiento, (ii) liberación de las hormonas de células endoteliales endotelina-1 y (iii) expresión de los marcadores de las células endoteliales (por ejemplo, CD31 y VE-cadherina).

15 Así, las "células endoteliales diferenciadas" tal y como se emplea en la presente memoria es una célula que se comporta en una o más maneras clave como las células endoteliales de vasos maduros, por ejemplo, alineamiento en la dirección de la fuerza de cizallamiento, liberación de una hormona de células endoteliales, tal como endotelina-1, y/o la expresión de uno o más marcadores de las células endoteliales, tal como CD31 y/o VE-cadherina.

PBMC, tal y como se emplea en la presente memoria, se refiere a las células mononucleares de sangre periférica. En una realización, las PBMC empleadas en el método están en sangre completa, es decir, no están aisladas. En una realización, se emplean en el método PBMC aisladas.

20 Convenientemente, las células endoteliales que crecen a partir de células progenitoras (denominadas células endoteliales circulantes de crecimiento tardío; BOEC⁹⁻¹¹) pueden emplearse en el ensayo de la presente descripción. Esto es ventajoso porque permite que las células en el ensayo concuerden de una manera conveniente y simple porque estas células pueden crecerse a partir de una muestra de sangre y así no se requiere tejido post mortem ni material de bancos celulares (tal como HUVEC).

25 Se piensa que las BOEC se originan a partir de una célula progenitora en la circulación y podrían estar implicadas en la reparación del crecimiento de los vasos⁹. No obstante, cuando se crecen *in vitro*, estas células tienen un fenotipo claro de células endoteliales y pueden usarse para estudiar las células endoteliales de pacientes y proporcionan nueva información sobre la enfermedad^{11,12} y, posiblemente, como en la presente descripción, respuestas de pacientes a fármacos cuando se crecen en cocultivo con PBMC autólogas.

30 BOEC, tal y como se emplea en la presente memoria, se refiere a células endoteliales diferenciadas cultivadas a partir de poblaciones en la sangre humana u otras fuentes corporales.

35 En la técnica se describen varias maneras de cultivar las BOEC. El método exacto para cultivar las BOEC incluyendo la duración del cultivo pueden variarse siempre que las células empleadas en el ensayo presenten el fenotipo endotelial diferenciado. Una buena indicación visual de este fenotipo es la forma/morfología de adoquines discutida más adelante y que reconocerá el experto en la técnica.

Los presentes inventores han caracterizado estas células como que tienen los distintivos clásicos del endotelio nativo y, de forma importante, realizaron experimentos de prueba de concepto que mostraron que, en presencia de PBMC del mismo donante, las BOEC responden ávidamente a un superagonista anti-CD28.

40 En una realización, las células endoteliales pueden cultivarse para proporcionar un fenotipo que se caracteriza como elongado y alineado, por ejemplo, para confirmar su identidad, quizá como una etapa de control de calidad. Este cultivo se realiza en condiciones de cizallamiento complejo¹³.

Sin embargo, generalmente, las células endoteliales cultivadas empleadas en el ensayo de la presente descripción tienen una apariencia que se describe como adoquinada, por ejemplo, como se muestra en las Figuras. Esto es porque se cultivan en condiciones de cultivo 'estáticas'.

45 En una realización, las células endoteliales se crecen como una capa confluyente en un recipiente, por ejemplo, un pocillo en una placa de plástico o recipiente empleado en un laboratorio.

El número de células, dependiendo del contexto, puede ser una consideración relevante, por ejemplo, si el espacio del recipiente es limitado.

50 En una realización, se emplean 5.000 a 50.000 células endoteliales por muestra de ensayo (por agente terapéutico ensayado), por ejemplo, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000 o 45.000.

Cocultivado, tal y como se emplea en la presente memoria, es cuando las células endoteliales y las PBMC se cultivan durante un periodo unas en presencia de las otras, es decir, en contacto físico. En una realización, las PBMC se añaden a un cultivo de células endoteliales después de un periodo de aproximadamente 24 horas.

5 En una realización, cocultivar puede emplearse en suero autólogo, esto es, suero de la misma muestra de sangre de la que se obtuvieron las PBMC y opcionalmente las células endoteliales.

En una realización, las células se cocultivan en presencia de una proteína de matriz, por ejemplo, fibronectina, gelatina, matrigel, colágeno o similar.

En una realización, el cocultivo se realiza en ausencia de una proteína de matriz.

10 En una realización, el análisis para liberaciones de citoquinas se realiza en uno o más puntos de tiempo 1 a 36 horas después de la adición del agente de ensayo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas después de la adición del agente de ensayo.

15 En una realización, la etapa b) del método según la presente descripción comprende además exponer el sistema de células cocultivadas a un agente que induce tormenta de citoquinas en el sistema, seguido de la exposición del sistema a un inhibidor de ensayo de la respuesta inducida. Los inhibidores conocidos de la tormenta de citoquinas incluyen inhibidores de OX40. En una realización, el ensayo puede incluir un inhibidor control tal como un inhibidor de OX40.

20 Así, en una realización, el método de la presente descripción puede comprender una etapa adicional de identificar un inhibidor de la tormenta de citoquinas en el sistema de células cocultivadas *in vitro* descrito en la presente memoria. El método comprende además una o más de las siguientes etapas, desarrollo y ensayo de dicho compuesto adicionalmente, formulación del compuesto, búsqueda de aprobación reglamentaria para el compuesto para un uso farmacéutico, comercialización y venta del compuesto y administración del mismo a un paciente que lo necesite. Lo siguiente se extiende al producto directo del método, es decir, un inhibidor de la tormenta de citoquinas identificado a partir del método.

25 La descripción en la presente memoria también se extiende al uso de los datos generados en un método descrito en la presente memoria para apoyar una solicitud reglamentaria, por ejemplo, una solicitud IND o NDA o un proceso equivalente en otro territorio o país.

En un aspecto, se proporciona un método *in vitro* para cocultivar PBMC con BOEC diferenciadas concordantes y una población de células obtenida o que se puede obtener de estas.

30 En un aspecto, se proporciona una población de células endoteliales derivada de BOEC para uso en un bioensayo concordante según la presente descripción.

También se proporciona un kit que comprende un sistema de cocultivo de PBMC y células endoteliales diferenciadas concordantes representativo de las respuestas de tormenta de citoquinas humanas *in vivo*.

35 Un aspecto adicional de la presente descripción es el uso de un sistema de cocultivo de PBMC y células endoteliales diferenciadas concordantes adecuado para uso en un bioensayo ensayo *in vitro* representativo de las respuestas de tormenta de citoquinas humanas *in vivo*.

Ejemplos

Anti-CD28, tal y como se emplea en los ejemplos, se refiere generalmente a ANC28. El último es un anticuerpo disponible comercialmente.

40 Algunas figuras presentadas en la presente memoria se han ajustado para mostrar los resultados de 0 iguales al límite de detección del instrumento porque la muestra que se está analizando es una dilución 1 en 10 y esta "corrección" se acepta como apropiada en esta situación.

45 Figure 1A-G Colonias de BOEC que surgen de cocultivos de PBMC 5-20 días después de la siembra en placas en placas recubiertas con colágeno (se muestra el día 8; sin colonias (A; izquierda) y el día 16 cuando surgieron las colonias (A; derecha). Las BOEC expresaron CD31, VE-cadherina y F-actina los núcleos se tiñeron con DAPI (b,c) cuando se cultivaron durante 4 días en condiciones de fuerza de cizallamiento (B) y se alinearon en el borde del pocillo donde el flujo es unidireccional/laminar (B; borde) pero no en el centro donde el flujo es no direccional/no laminar (b; centro). Las BOEC también se crecieron en condiciones estáticas y expresaron CD31, VE-cadherina y F-actina (C). Las BOEC no expresaron CD45 (D). Las BOEC cuando se cultivaron durante 24h con Lonza-EGM2 + 10 %FBS liberaron endotelina (ET)-1 (E) y se compararon con HUVEC y células endoteliales microvasculares de pulmón humano) HMVEC en condiciones similares. Los datos son la media \pm SEM (BOEC n=8) (HMVEC n=4) (HUVEC n=6).

50 Figura 2 Datos del bioensayo de mono y cocultivo de BOEC más PBMC. Las PBMC se añadieron a BOEC concordantes. Las PBMC se añadieron a BOEC concordantes después de 24h. Para los monocultivos se añadió

medio de vehículo en lugar de las PBMC. Al mismo tiempo, los cultivos se trataron +/- vehículo, ANC28 (ANC28. 1/5D10; superagonista semejante a TGN) (10µg/ml), Campath (10 µg/ml), Avastina (10 µg/ml) o Arzerra (10 µg/ml) durante 24h. Los datos son la media ± SEM (A-C; n=5 de 5 donantes de BOEC y PBMC). (A) Muestra los datos combinados con respuestas promediadas de todos los donantes. (B) Los datos de experimentos en los que las PBMC y las BOEC se trataron en cocultivo del mismo individuo se muestran de forma separada por donante en la figura 2B y se refieren como "donante" A, donante C, donante F, donante Q y donante Z. (C) Los datos para donantes individuales para todas las condiciones de ensayo se muestran en un gráfico separado para claridad. La significancia estadística entre los tratamientos se determinó por ANOVA de una vía seguido del ensayo de Comparación Múltiple de Bonferroni (*p<0,05) (mostrado en A,B) y entre mono/cocultivos por ANOVA de dos vías (*p<0,05) seguido de postensayo de Bonferroni.

El paciente C se volvió a ensayar posteriormente usando el ensayo MSD y no mostró signos de las respuestas de citoquinas después de exposición al superagonista CD-28. De forma notable, no todos los donantes respondieron en el mismo grado al superagonista CD-28. Esto muestra que el ensayo puede emplearse para evaluar el vigor/fuerza de la reacción del paciente a la terapia propuesta.

Los datos también se presentan en 2C con un n=8 (es decir, el análisis de un número mayor de muestras y el nuevo análisis para el donante C).

Figura 3A-B Datos del bioensayo de mono y cocultivo de HUVEC (A) y BOEC de donante mixto (B) más PBMC. Las PBMC se añadieron a HUVEC (A) o BOEC de diferentes donantes (B) después de 24h. Para los monocultivos se añadió medio de vehículo. Al mismo tiempo, los cultivos se trataron +/- vehículo, ANC28 (superagonista semejante a TGN1412) (10µg/ml), Campath (10 µg/ml), Avastina (10 µg/ml) o Arzerra (10 µg/ml) durante 24h. Los datos son la media ± SEM (A; n=3) (B; n=3). La significancia estadística entre los tratamientos se determinó por ANOVA de una vía seguido del ensayo de Comparación Múltiple de Bonferroni (*p<0,05)

Figura 4 Datos del bioensayo de mono y cocultivo de células no endoteliales (fibroblastos de pulmón humano (HLF)); PBMC. Las PBMC se añadieron a HLF. Para los monocultivos se añadió medio de vehículo. Al mismo tiempo, los cultivos se trataron +/- vehículo, anti-CD28 (fármaco ANC28 semejante a TGN) (10µg/ml), Campath (10 µg/ml), Avastina (10 µg/ml) o Arzerra (10 µg/ml) durante 24h. Los datos son la media ± SEM (n=2 de 2 aislamientos).

Figura 5A-C Datos de liberación de citoquinas del análisis MSD. Las mediciones se llevaron a cabo usando un Ensayo Proinflamatorio MSD 9 plex de 10 puntos (véanse los métodos). Los datos son la media ± SEM (n=5 de 5 donantes concordantes). El ensayo estadístico se llevó a cabo entre 5 donantes por ANOVA de una vía seguido del ensayo de comparación múltiple de Dunnett comparando las respuestas con fármaco con el control respectivo solo (*p<0,05).

Materiales y Métodos:

Medios y disoluciones:

El medio Lonza-EGM2 se preparó por la adición de suplementos Lonza-EGM2 SingleQuot y factores de crecimiento a medio basal Lonza-EBM2 (Lonza, Bélgica). La información de las concentraciones de las adiciones en 'los suplementos SingleQuot y factores de crecimiento' no están disponibles, sin embargo, la información del proveedor afirma que se incluyen los siguientes; hEGF, gentamicina-anfotericina-B 100, R3-IGF-1, ácido ascórbico, VEGF, hFGF-B, heparina, hidrocortisona. La preparación del medio se modificó ya que el FBS del proveedor se desechó y se reemplazó por 50ml de FBS (Hyclone HYC-001-330Y) para proporcionar Lonza-EGM2 10 %FBS. Todos los suplementos se añadieron separadamente al medio. El medio se alícuotó para el uso diario y se almacenó a 4 °C apartado de fuentes de luz.

La disolución de colágeno tipo-1 de cola de rata se preparó en ácido acético glacial 0,02N según las instrucciones del fabricante a una concentración de 50µg/ml. Las superficies de las placas y los matraces usados para el aislamiento y mantenimiento de BOEC se recubrieron con 5,2µg/cm² de disolución de colágeno y se incubaron a 37 °C, 5 %CO₂ durante 1h antes de lavar tres veces con PBS y la adición de medio/disoluciones/suspensiones celulares.

Aislamiento de células endoteliales circulantes de crecimiento tardío:

Las BOEC se aislaron como se ha publicado en otro lugar¹² con modificaciones menores. Brevemente, se recogió sangre de voluntarios sanos (48ml) (código ético: 08/H0708/69) y se prepararon PBMC. Los tubos se invirtieron 8 veces y después se centrifugaron a 1.600RCF durante 30mins a temperatura ambiente con aceleración y velocidad de frenado máximas. Los tubos se invirtieron entonces 8 veces más para permitir el mezclado de la capa leucoplaquetaria y la fracción plasma/suero. Esta fracción mezclada de 8 tubos se combinó entonces cuidadosamente en un tubo falcon de 50ml y se añadió 10 % FBS/PBS para proporcionar un volumen final de 50ml. Las células se centrifugaron entonces a 520RCF durante 10mins con aceleración máxima y frenado intermedio. El sobrenadante se desechó y los sedimentos se resuspendieron en 10ml de 10 %FBS/PBS. Este proceso se repitió dos veces más proporcionando tres lavados en total. Antes de la centrifugación final, se añadieron 10µl de la suspensión celular a un hemocitómetro para recuento. Después del lavado final, las células se resuspendieron

posteriormente para proporcionar $3-5 \times 10^7$ células por pocillo (4ml) en Lonza-EGM2 con 10 %FBS y se añadió a pocillos recubiertos con colágeno (BD, Oxford, Reino Unido) (véase anteriormente) de una placa de 6 pocillos (Nunc, Dinamarca). Las placas se incubaron a 37 °C, 5 %CO₂. Después de 24h, el medio se retiró cuidadosamente, las células se lavaron con Lonza-EGM2 10 %FBS y se añadieron 4ml de Lonza-EGM2 10 %FBS fresco a cada pocillo. Este proceso se repitió cada 24h durante 4d, después cada 24h sin lavar hasta el día 7. Después del día 7, el medio se reemplazó en días alternos sin lavar hasta que aparecieron las colonias. Las colonias de células endoteliales surgieron típicamente entre los días 7-20. Una vez las colonias surgieron, se dejó que se expandieran durante no más de 4 días. Las colonias se retiraron por digestión con tripsina (TrypLE 1x) usando 2ml de tripsina/pocillo. La tripsina se neutralizó con 4ml de Lonza-EGM2 10 %FBS y los 6ml de mezcla células/tripsina se recogieron en un tubo falcon de 50ml y se centrifugaron a 190RCF durante 5min a temperatura ambiente con ajustes de aceleración máxima y freno intermedio. Las células se sembraron en placas, se expandieron y se mantuvieron en matraces de cultivo T25 o T75 (Nunc, Dinamarca) pretratados con colágeno como se ha descrito anteriormente.

Las células endoteliales de vena umbilical humana usadas en este estudio fueron un obsequio del Profesor Carloine Wheeler- Jones en el Royal Veterinary College, Londres.

15 Aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica humana:

El aislamiento de las PBMC es un protocolo de laboratorio estándar y puede hacerse usando varios métodos modificados. Aquí, las muestras de sangre periférica (20ml) se recogieron de voluntarios sanos en tubos de centrifuga de 50ml que contenían citrato de sodio (la relación de citrato de sodio:sangre fue 1:9). La sangre citrada se diluyó con medio RPMI:Lonza EGM2 a 37 °C a una relación de 1:1. La sangre (6ml) se puso en capas en Histopaque 1077 (Invitrogen, Reino Unido) (3ml) y se centrifugó a 400RCF con ajustes de aceleración máxima y freno mínimo durante 30min a temperatura ambiente. La capa leucoplaquetaria de células de sangre periférica se retiró cuidadosamente de cada tubo usando una pipeta Pasteur. Las PBMC se transfirieron a tubos de centrifuga de 15ml (hasta 7ml por tubo) y se llevaron hasta 14ml con RPMI:Lonza EGM2 10 %FBS (1:1). Los tubos se centrifugaron a 200RCF durante 15min a temperatura ambiente para eliminar cualquier Histopaque remanente. Los sobrenadantes se desecharon de cada tubo. Los sedimentos celulares se combinaron en tubos falcon de 50ml con 20ml de medio fresco y se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones para un lavado final. Los sobrenadantes se retiraron y los sedimentos celulares se resuspendieron en 1ml de medio y se contaron usando un hemocitómetro. Las PBMC se sembraron en una placa de 96 pocillos con/sin BOEC presembradas al 70-80 % de confluencia (Nunc, Dinamarca) a 1×10^5 células/pocillo.

30 Cultivo de fibroblastos de pulmón humano:

Los fibroblastos de pulmón humano fueron un obsequio del Dr Andrew Thorley y se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dubecco (DMEM; Life Technologies) con los siguientes suplementos penicilina-estreptomina (con 10.000 unidades de penicilina y 10 mg de estreptomina/ml en NaCl al 0,9 %) (Sigma, Reino Unido), L-glutamina (Sigma, Reino Unido), aminoácidos no esenciales (Invitrogen, Reino Unido) y 10 % FCS (Invitrogen, Reino Unido).

35 Protocolo del ensayo autólogo de células dual:

Para el ensayo de células dual, las BOEC se aislaron de voluntarios sanos como se ha descrito anteriormente. Una vez en el subcultivo 3 y confluentes, las células se sembraron en placas en placas de 96 pocillos recubiertas con gelatina al 1% (Nunc, Dinamarca) y se dejó que se adhirieran toda la noche. Los pacientes se volvieron a llamar y las PBMC se aislaron como se ha descrito anteriormente y se añadieron a las BOEC. Se añadieron entonces los fármacos que inducen la tormenta de citoquinas superagonista anti-CD28 semejante a TGN (ANC28. 1.5D10, referido como ANC28) (10µg/ml), Herceptina (anti-EGFR2: trazituzumab) (10µg/ml) y Campath (anti-CD52: alemtuzumab) (10µg/ml) en el día 0. La avastina (anti-VEGF_A: bevacizumab) (10µg/ml) y Arzerra (anti-CD20: ofatumumab) (10µg/ml) se incluyeron como controles negativos para la inducción de la liberación de citoquinas. Las placas se incubaron entonces durante 24h. Los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a -20 °C para análisis adicional por ELISA y a -80 °C para análisis por la plataforma MSD.

Medición de CXCL8:

CXCL8 (IL8) se midió por ELISA (Kit Duoset CXCL8, DY208E; R & D Systems, Abingdon, Reino Unido), según las instrucciones del fabricante

Matriz de citoquinas usando la plataforma MSD

Para analizar adicionalmente las citoquinas liberadas por cocultivos concordantes de BOEC y PBMC, así como los monocultivos respectivos después de la estimulación con biológicos, se usó un análisis con la plataforma MSD (Meso Scale Discovery, EEUU). Las placas de MSD de proinflamatorios humanos 9-Plex MULTISPOT 96 pocillos-10 puntos se adquirieron en MSD (Gaithersburg, Maryland) (No. de cat. N05007A-1). Las muestras se diluyeron 1:10 en mezcla de Lonza-EGM2 10 %FBS/RPMI y se añadieron a la placa de MSD. El inmunoensayo se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron usando un MSC Sector Imager 2400 y se analizaron usando software MSD Discovery® Workbench. Las citoquinas analizadas fueron IL-2, CXCL8 (IL-8), IL-12q70, IL-1β, GM-CSF, IFNγ, IL-6, IL-10 y TNFα.

Análisis estadístico

Los protocolos del análisis estadístico se diseñaron antes de la experimentación. El análisis se llevó a cabo usando software GraphPad Prism5. Los detalles de los ensayos específicos se proporcionan en las leyendas de las figuras.

Resultados

5 Caracterización de BOEC:

Las BOEC surgieron a partir de los aislamientos de PBMC de voluntarios sanos en cultivo entre los días 7-20. Como han mostrado otros, las BOEC presentaron una morfología típica de célula endotelial 'en adoquines' (Figura 1A) en cultivo estático y expresaron los marcadores requeridos de células endoteliales, CD31, VE-cadherina (Figura 1B) pero no el antígeno común de leucocitos CD45 (Figura 1D). Las células endoteliales de los vasos sanguíneos tienen una respuesta fenotípica típica a la fuerza de cizallamiento. Con el fin de caracterizar adicionalmente las BOEC como típicas endoteliales, las crecimos durante 4 días en patrones cizallamiento complejo. Las BOEC en la región de cizallamiento direccional/laminar presentaron el fenotipo típico de células endoteliales de ser elongadas y estar alineadas (Figura 1B) mientras aquellas que crecieron en regiones de cizallamiento turbulento o en estático tuvieron una apariencia típica de adoquines (Figura 1C-D). Las BOEC también liberaron el péptido endotelial endotelina-1 (ET-1) a niveles similares a las células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC) o la microvasculatura de pulmón (HMVEC) (Figura 1E). Las BOEC en nuestro estudio presentaron estas características típicas.

Bioensayo con BOEC:PBMC del mismo donante para detectar anticuerpos biológicos que inducen tormenta de citoquinas:

Las PBMC liberaron niveles bajos de CXCL8 en condiciones de cultivo control. Las BOEC del mismo donante liberaron relativamente más CXCL8 que las PBMC (Figura 2). El cocultivo de BOEC y PBMC del mismo donante no tuvo un efecto discernible sobre los niveles de la liberación de CXCL8 cuando se compara con los niveles liberados por cualquiera de los tipos celulares solo en condiciones control. Para que nuestro bioensayo de células endoteliales:PBMC del mismo donante sea útil, debería revelar una liberación de citoquinas en respuesta a anticuerpos terapéuticos que se sabe que causan tormenta de citoquinas en el hombre, pero no en respuesta a los usados en el hombre que causan respuestas de citoquinas observadas generalmente moderadas y no limitan el uso de la terapia en el hombre. En nuestro estudio de prueba de concepto, ensayamos dos anticuerpos como control positivo, un superagonista anti-CD28 semejante a TGN1412 (ANC28) y el anticuerpo de CD52 alemtuzumab (Campath). Ensayamos tres anticuerpos como control negativo, que se usan terapéuticamente, pero que no causan respuestas de tormenta de citoquinas, estos fueron (i) Herceptina, que se une al Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2; (ii) Avastina, que se une al factor de crecimiento del endotelio vascular A y (iii) Arzerra que se une a CD20. Los cultivos de PBMC o BOEC solos no respondieron a ninguno de los anticuerpos ensayados cuando se trataron como monocultivos. De forma similar, los cocultivos de PBMC y BOEC con Herceptina, Avastina o Arzerra no liberaron niveles incrementados de CXCL8. Sin embargo, los cocultivos de PBMC y BOEC liberaron niveles incrementados de CXCL8 cuando se estimularon con el superagonista anti-CD28 semejante a TGN1412 o con Campath donde TGN1412>Campath. Esto se correlaciona con la gravedad esperada de la tormenta de citoquinas para estos fármacos^{5,16} (Figura 2).

Ensayos de mono y cocultivo de HUVEC o BOEC más PBMC de donantes mixtos

Con el fin de comparar los datos de nuestro ensayo del mismo donante con los ensayos actuales del estado de la técnica^{1,3,17}, operamos en paralelo experimentos usando HUVEC como el modelo de célula endotelial detectora. Las PBMC liberaron de nuevo niveles bajos de CXCL8 que no se incrementaron por ninguno de los bioterapéuticos ensayados (Figure 3A). Las HUVEC liberaron niveles basales relativamente altos de CXCL8 que no se incrementaron por el superagonista anti-CD28 o Campath. Las HUVEC tenían una tendencia a responder a los fármacos que no inducían la tormenta de citoquinas Avastina y Arzerra (Figura 3A). La base para estos resultados diferentes no puede investigarse adicionalmente ya que los donantes de HUVEC, a diferencia de los de BOEC, no pueden localizarse fácilmente y estudiarse adicionalmente. Se encontraron resultados similares cuando las PBMC se añadieron a BOEC de un donante diferente. De forma importante, los cocultivos de HUVEC y PBMC (de dos donantes) respondieron al superagonista semejante a TGN1412 (ANC28) y a Campath. Esto plasma completamente lo que ya se sabe para este ensayo que, desde el ensayo de fase 1 de TGN1412 1, es como se usa como el ensayo estándar de oro para ensayar bioterapéuticos en el estadio preclínico^{1,17,18}. Como hemos mostrado recientemente usando sangre completa⁹, en el presente estudio encontramos que para un replicado de células de un donante, la adición de PBMC a la monocapa de HUVEC produjo una activación de la liberación de CXCL8 que pareció que activaba de forma máxima el sistema y dio como resultado que el ensayo fuera incapaz de detectar la tormenta de citoquinas. Esta respuesta de activación inmune en las condiciones control u otras se debe probablemente al mezclado de tejido de diferentes donantes y es una limitación seria para los ensayos con HUVEC u otros similares, pero esta se evita totalmente con nuestro ensayo del 'mismo donante'.

Ensayos con no endoteliales (fibroblasto de pulmón humano):PBMC

Para ilustrar que las interacciones entre las células que responden al superagonista anti-CD28 semejante a TGN1412 eran específicas de células endoteliales y que las células endoteliales eran la progenie ideal de células

madre para esta clase de ensayo, operamos el mismo ensayo usando fibroblastos de pulmón humano como una plataforma. Los fibroblastos de pulmón humano liberaron niveles relativamente mayores de CXCL8 que las PBMC de dos donantes. La liberación de citoquinas no se incrementó en ninguno de los tipos celulares en respuesta al tratamiento con ninguno de los biológicos ensayados. Cuando se cultivaron conjuntamente, los fibroblastos de pulmón humano y las PBMC se activan de forma máxima para liberar CXCL8 y no se detecta tormenta de citoquinas en respuesta a ninguno de los biológicos ensayados (Figura 4).

Análisis adicional de la tormenta de citoquinas usando la plataforma multiplex MSD:

Para evaluar adicionalmente el potencial de este ensayo para detectar de forma exacta las reacciones de tormenta de citoquinas medimos 9 citoquinas (IL-2, IL-8, IL-12p70, IL-1 β , GM-CSF, IFN γ , IL-6, IL-10 y TNF α), 7 de las cuales (IL-2, IL-1 β , IL-8, IL-6, IFN γ , IL-12p70 y TNF α) se midieron en pacientes que presentaban tormenta de citoquinas clínica cuando se les administró TGN1412 en 2006¹⁶ y son citoquinas clave asociadas con la tormenta de citoquinas. En nuestro ensayo de cocultivo de BOEC:PBMC del mismo donante, todas las citoquinas excepto IL-12p70 se incrementaron en respuesta al tratamiento con superagonista anti-CD28 semejante a TGN1412. Campath también mostró una tendencia a elevar la liberación de IL-8, IL-6 y GM-CSF en cocultivos de donantes concordantes. Estos datos sirven para i) validar nuestros datos sobre CXCL8 propios usando una plataforma MSD ultrasensible y ii) ilustrar la potencia de los cocultivos de BOEC:PBMC de donante concordante para detectar la tormenta de citoquinas frente al superagonista anti-CD28 y demarcar este efecto de fármacos menos tóxicos tales como as Campath y anticuerpos de control negativo tales como Avastina y Arzerra.

REFERENCIAS

- 20 1. Stebbings, Findlay L, Edwards C, et al. "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. *J Immunol* 2007;179:3325-31.
2. Walker MR, Makropoulos DA, Achuthanandam R, Van Arsdell S, Bugelski PJ. Development of a human whole blood assay for prediction of cytokine release similar to anti-CD28 superagonists using multiplex cytokine and hierarchical cluster analysis. *Int Immunopharmacol* 2011;11:1697- 705.
- 25 3. Bailey L, Moreno L, Manigold T, et al. A simple whole blood bioassay detects cytokine responses to anti-CD28(SA) and anti-CD52 antibodies. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2012.
4. Findlay L, Eastwood D, Ball C, et al. Comparison of novel methods for predicting the risk of pro-inflammatory clinical infusion reactions during monoclonal antibody therapy. *J Immunol Methods* 2011;371:134-42.
- 30 5. Eastwood D, Findlay L, Poole S, et al. Monoclonal antibody TGN1412 trial failure explained by species differences in CD28 expression on CD4+ effector memory T-cells. *Br J Pharmacol* 2010;161:512-26.
6. Hünig T. The storm has cleared: lessons from the CD28 superagonist TGN1412 trial. *Nat Rev Immunol* 2012;12:317-8.
7. Finco D, Grimaldi C, Fort M, et al. Cytokine release assays: Current practices and future directions. *Cytokine* 2014;66:143-55.
- 35 8. Földes G, Liu A, Badiger R, et al. Innate immunity in human embryonic stem cells: comparison with adult human endothelial cells. *PLoS One* 2010;5:e10501.
9. Yoder MC, Mead LE, Prater D, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007;109:1801-9.
- 40 10. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004;104:2752-60.
11. Paschalaki KE, Starke RD, Hu Y, et al. Dysfunction of endothelial progenitor cells from smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients due to increased DNA damage and senescence. *Stem Cells* 2013;31:2813-26.
- 45 12. George PM, Oliver E, Dorfmueller P, et al. Evidence for the Involvement of Type I Interferon in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Res* 2013.
13. Potter CM, Lundberg MH, Harrington LS, et al. Role of shear stress in endothelial cell morphology and expression of cyclooxygenase isoforms. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 2011;31:384-91.
14. Martin-Ramirez J, Hofman M, van den Biggelaar M, Hebbel RP, Voorberg J. Establishment of outgrowth endothelial cells from peripheral blood. *Nat Protoc* 2012;7:1709-15.
- 50 15. Thill M, Strunnikova NV, Berna MJ, et al. Late outgrowth endothelial progenitor cells in patients with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2696-708.

16. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006;355:1018-28.
17. Stebbings R, Eastwood D, Poole S, Thorpe R. After TGN1412: Recent developments in cytokine release assays. *J Immunotoxicol* 2012.
- 5 18. Dhir V, Fort M, Mahmood A, et al. A predictive biomimetic model of cytokine release induced by TGN1412 and other therapeutic monoclonal antibodies. *J Immunotoxicol* 2012;9:34-42.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para ensayar la estimulación de una respuesta de tormenta de citoquinas que comprende las etapas de
- 5 a. cocultivar PBMC y células endoteliales diferenciadas concordantes para proporcionar un sistema representativo de respuestas humanas *in vivo* y
- b. exponer el sistema de células cocultivadas a un agente de ensayo,
- c. analizar el sistema para determinar la presencia de una o más citoquinas liberadas después de la exposición del sistema de cocultivo a dicho agente de ensayo, y
- 10 d. opcionalmente, evaluar la respuesta al agente de ensayo en comparación con una respuesta a uno o más agentes control;
- en el que las células endoteliales son autólogas respecto a las PBMC;
- y en el que las células endoteliales derivan de células endoteliales circulantes de crecimiento tardío.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que las células endoteliales pueden cultivarse para proporcionar un fenotipo que se caracteriza como elongado y alineado.
- 15 3. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la respuesta del agente de ensayo se evalúa en comparación con uno o más agentes control.
4. Un método según la reivindicación 3, en el que el agente control se selecciona del grupo que comprende un anticuerpo anti-CD28 y un anti-CD52, tal como alemtuzumab.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la citoquina medida es CXCL8.
- 20 6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa b) comprende exponer el sistema de células cocultivadas a un agente que induce tormenta de citoquinas en el sistema, seguido de la exposición del sistema a un inhibidor de ensayo de la respuesta inducida.
7. Un método según la reivindicación 6, que comprende la etapa adicional de identificar un inhibidor de la tormenta de citoquinas en el sistema de células cocultivadas *in vitro*.
- 25 8. Un método *in vitro* para cocultivar PBMC con células endoteliales circulantes de crecimiento tardío diferenciadas concordantes; en el que las células endoteliales son autólogas respecto a las PBMC.
9. Uso de una población de células endoteliales derivadas de células endoteliales circulantes de crecimiento tardío en un bioensayo concordante como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; en el que las células endoteliales son autólogas respecto a las PBMC empleadas en el bioensayo.
- 30 10. Un kit que comprende un sistema de cocultivo de PBMC y células endoteliales diferenciadas concordantes representativo de las respuestas de tormenta de citoquinas humanas *in vivo*; en el que las células endoteliales son autólogas respecto a las PBMC; y
- en el que las células endoteliales derivan de células endoteliales circulantes de crecimiento tardío.
- 35 11. Uso de un sistema de cocultivo de PBMC y células endoteliales diferenciadas concordantes representativo de las respuestas de tormenta de citoquinas humanas *in vivo*, en un ensayo *in vitro*; en el que las células endoteliales son autólogas respecto a las PBMC; y en el que las células endoteliales derivan de células endoteliales circulantes de crecimiento tardío.

Figura 1A, B y C

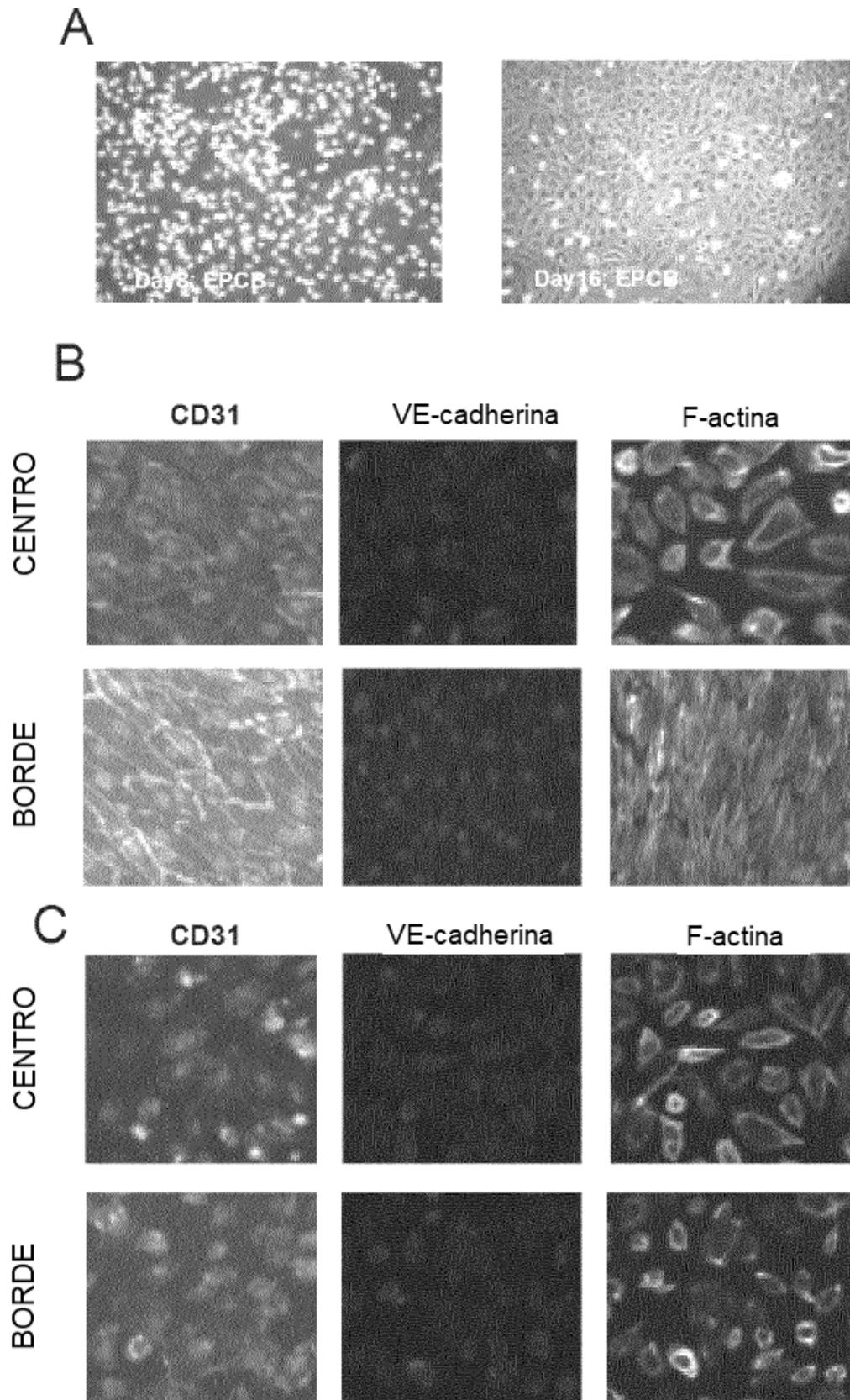


Figura 1D y E

D **CD45**

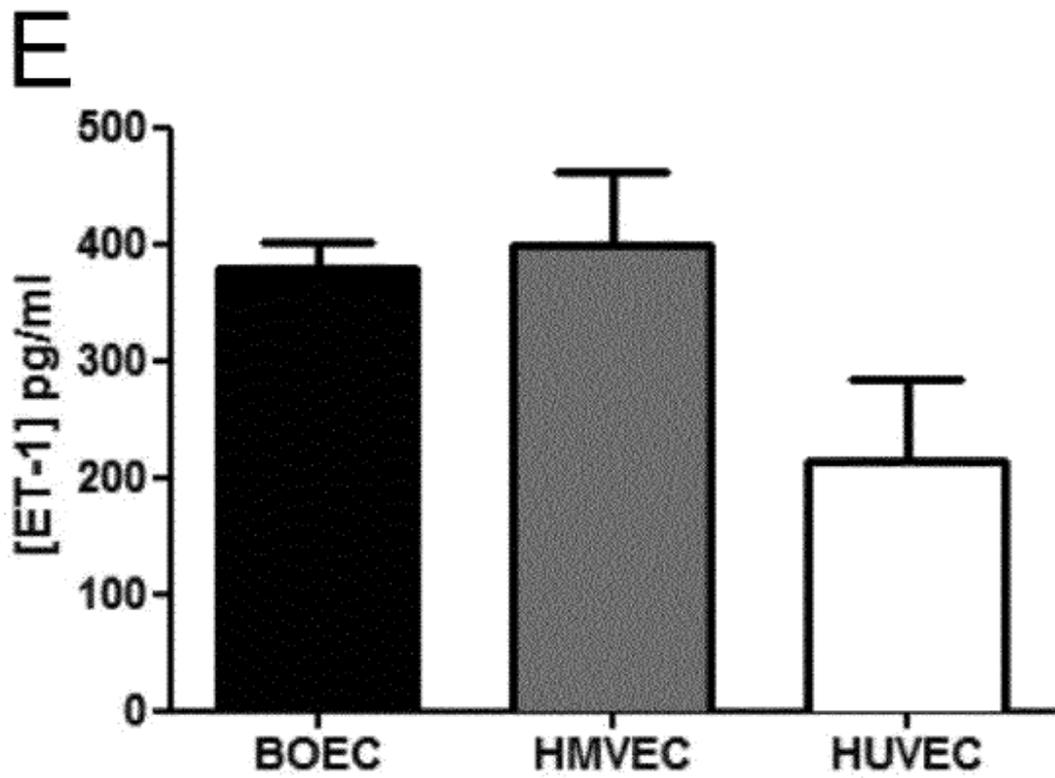
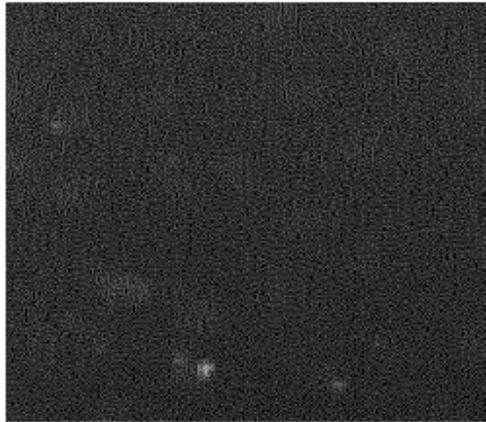


Figura 2A y B (n = 5)

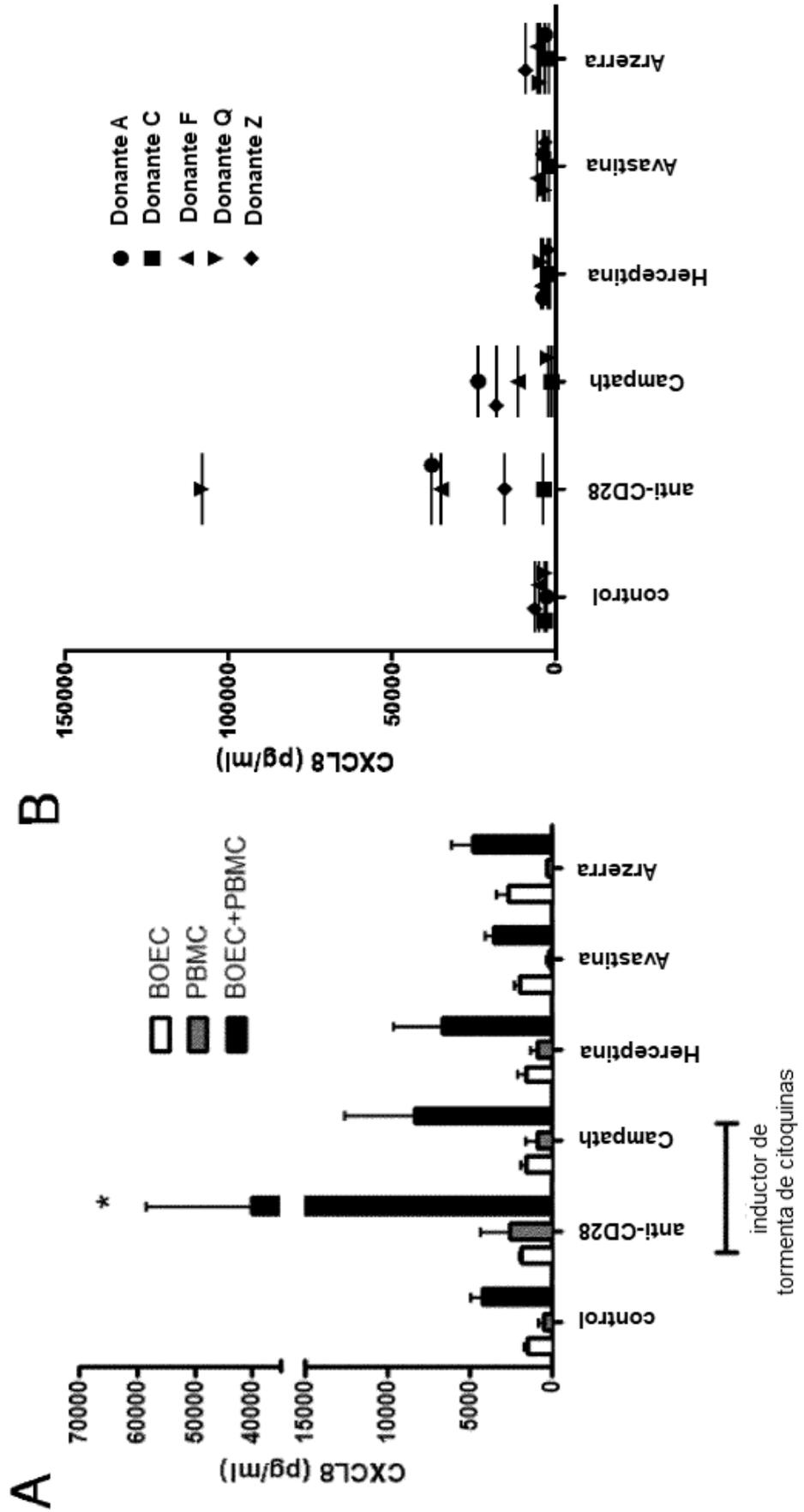


Figura 2C (n = 8)

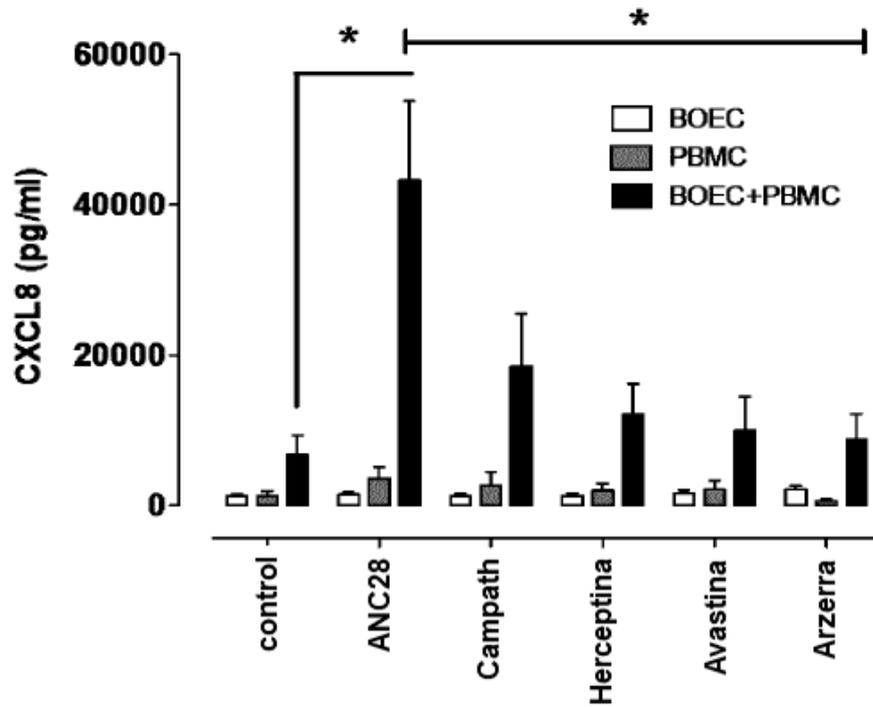


Figura 3A Un ensayo de BOEC mixto (es decir, no concordante)

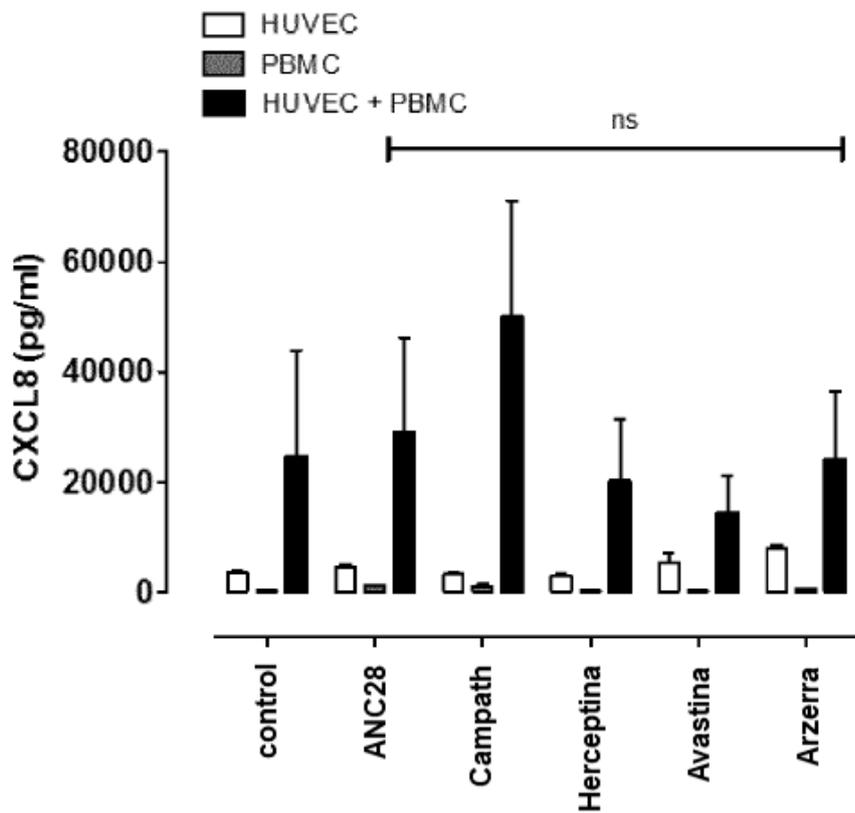


Figura 3B Un ensayo de BOEC mixto (es decir, no concordante)

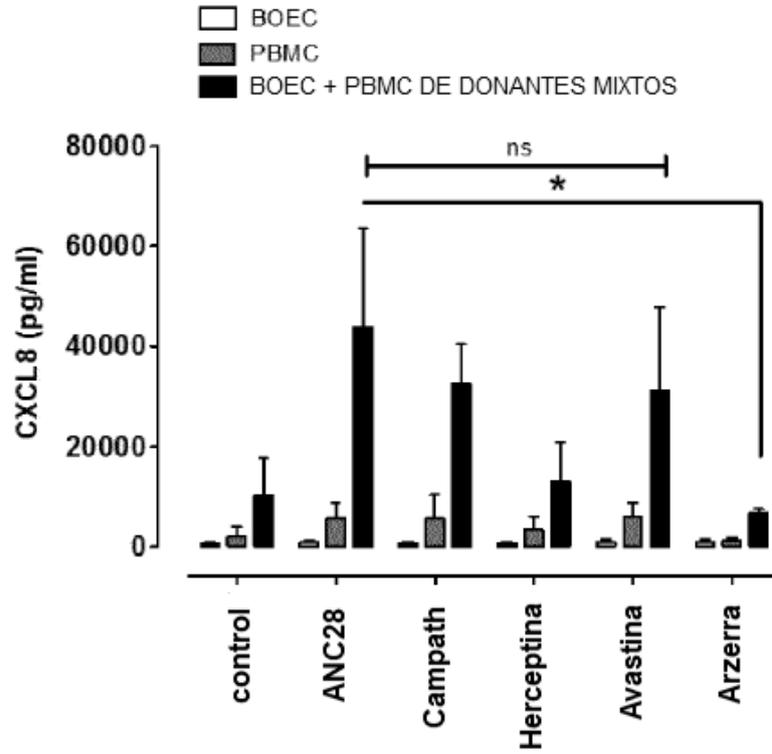


Figura 4

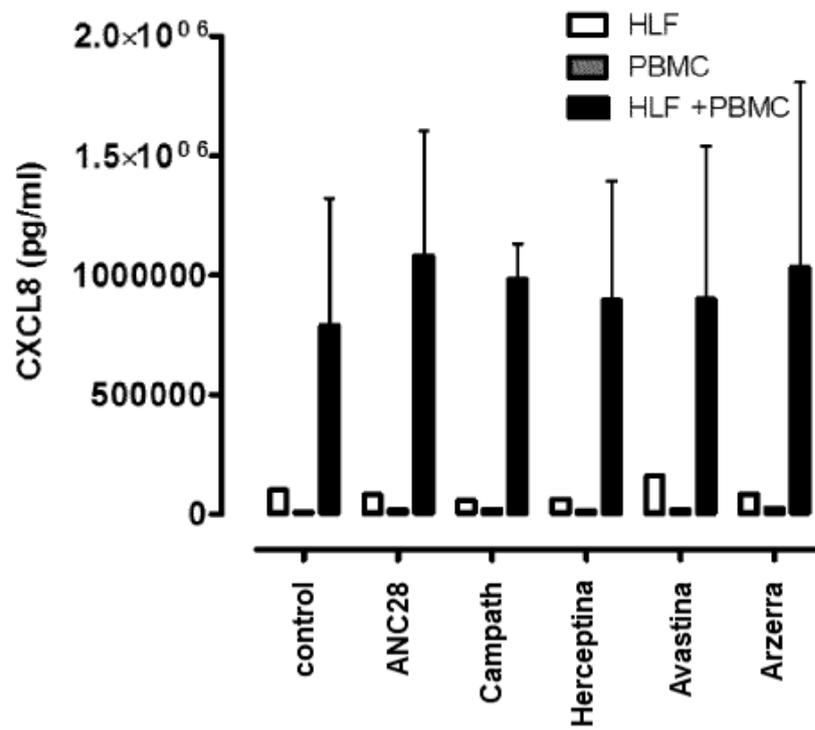


Figura 5A

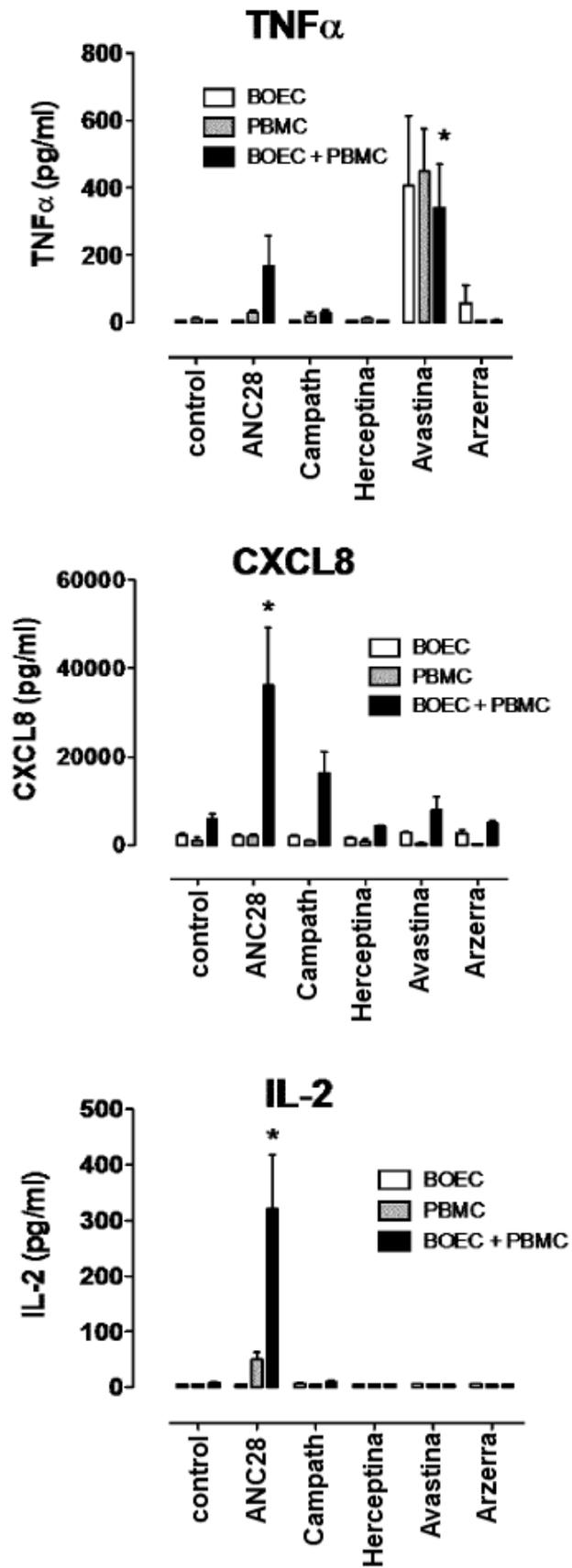


Figura 5B

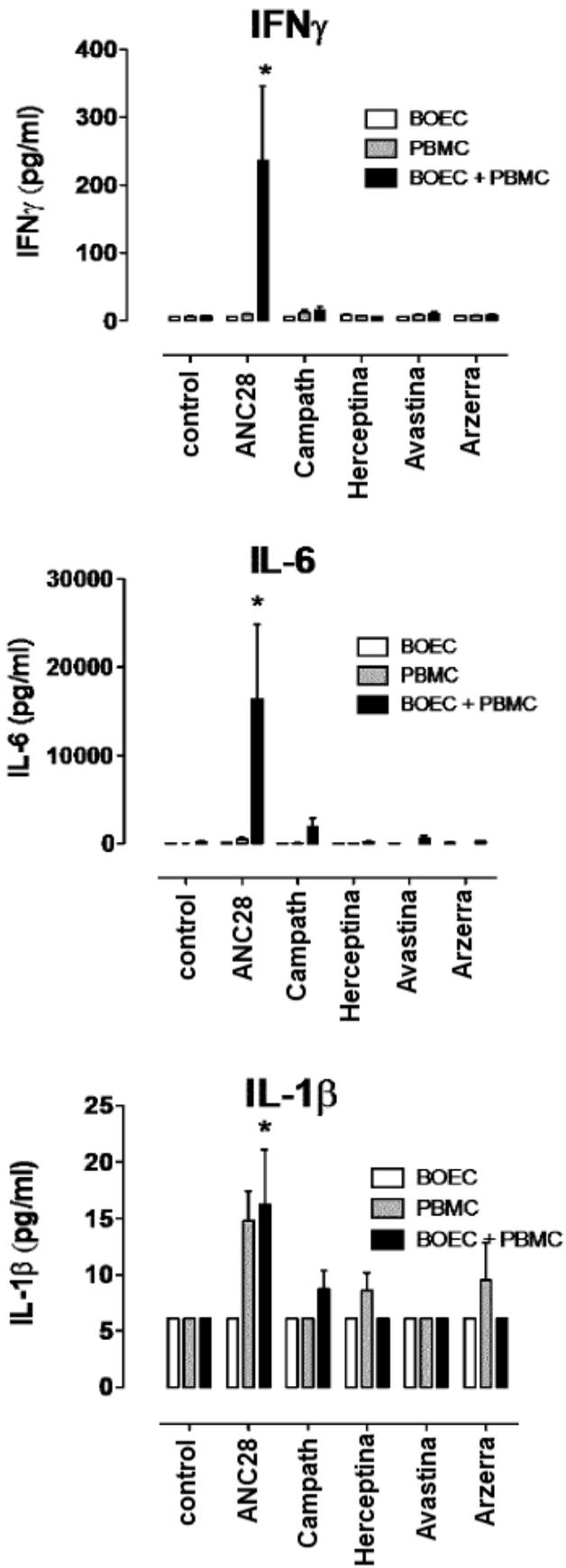


Figura 5C

