

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 677**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

A01K 67/027 (2014.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2018** **E 22173216 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024** **EP 4080209**

54 Título: **Método de determinación de la toxicidad de un fármaco inmunomodulador para el uso en seres humanos**

30 Prioridad:

17.04.2017 US 201762486441 P

19.06.2017 US 201762521617 P

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

24.10.2024

73 Titular/es:

THE JACKSON LABORATORY (100.0%)

600 Main Street

Bar Harbor, ME 04609, US

72 Inventor/es:

KECK, JAMES y

YE, CHUNTING

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 983 677 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 de determinación de la toxicidad de un fármaco inmunomodulador para el uso en seres humanos

5 Campo de la invención

La presente invención generalmente se refiere a un método para evaluar el síndrome de liberación de citocinas determinando si un fármaco inmunomodulador desencadena un síndrome de liberación de citocinas a través del uso de un método con ratones *in vivo* que tiene un valor predictivo para el uso en evaluaciones de seguridad farmacéuticas de un candidato farmacológico.

Antecedentes de la invención

15 Los anticuerpos monoclonales (mAb) se han usado terapéuticamente en el tratamiento del cáncer y enfermedades autoinmunitarias. Muchos de estos mAb terapéuticos están dirigidos contra proteínas en la superficie de células inmunitarias, especialmente las células T y las células B. No obstante, los mAb pueden tener una variedad de efectos adversos al momento de la infusión, tales como síndrome de liberación de citocinas (CRS) o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), que pueden ser letales. El CRS se manifiesta clínicamente cuando un gran número de linfocitos (células B, células T y/o células citolíticas naturales (NK)) y/o células mieloides (macrófagos, células dendríticas y monocitos) son activadas por los mAb administrados y liberan citocinas inflamatorias. El momento del inicio de síntomas y la gravedad del CRS depende de los tipos de mAb y la magnitud de la activación de células inmunitarias.

25 Generalmente hay dos métodos existentes para la prueba de toxicidad antes de los ensayos clínicos de un fármaco, prueba *in vivo* en modelos animales y valoraciones *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o sangre completa. Desgraciadamente, estos dos métodos no pueden predecir o determinar apropiadamente la toxicidad, especialmente la toxicidad inmunitaria en seres humanos. La prueba *in vitro* no puede imitar el organismo del paciente humano; la respuesta sistémica a una toxicidad farmacológica potencial no se puede modelar en ningún modelo distinto del *in vivo*. Las respuestas genómicas en roedores y modelos de primates no humanos pueden no imitar la respuesta en seres humanos. Hay una brecha significativa entre las pruebas preclínicas y los ensayos clínicos en términos de toxicidad.

30 Se han intentado métodos para hacer un injerto de células precursoras humanas en un mamífero no humano para someter a prueba. No obstante, dichos métodos presentan graves problemas con respecto a la obtención de células precursoras no embrionarias de un paciente (p. ej., obtención de médula ósea del paciente) y también resultan desventajosos en cuanto a que toman demasiado tiempo esperando que las células precursoras crezcan y se diferencien en diversas células. Por consiguiente, dichos métodos son invasivos (si es que son posibles), engorrosos y poco prácticos.

35 El TGN1412, desarrollado por la ahora extinta compañía TeGenero AG, Wurzburg, es un anticuerpo monoclonal (mAb) humanizado de la subclase IgG₄ específico para la molécula coestimuladora CD28 expresada por células T humanas. 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 células T (TCR) (Hunig, 2007, Adv Immunol 95: 111-148).

40 Durante un primer ensayo clínico en el ser humano llevado a cabo por la unidad independiente de ensayos clínicos de Parexel en el Northwick Park Hospital, Londres, el 13 de marzo del 2006, la aplicación intravenosa de 100 µg/kg de peso corporal de TGN1412 a voluntarios humanos sanos provocó un síndrome de liberación de citocinas potencialmente mortal que solo se controló después del traslado de los voluntarios a la unidad de cuidados intensivos del hospital (Suntharalingam *et al.*, 2006, Engl J Med 355: 1018-1028). Por consiguiente, el TGN1412, fármaco inmunomodulador anti-CD28, fracasó terriblemente en su ensayo de fase I debido a una tormenta de citocinas que ocurrió en los sujetos sometidos a prueba, que amenazó gravemente la vida de seis voluntarios sanos implicados, padeciendo los seis una insuficiencia multiorgánica.

45 No obstante, el trabajo preclínico presentado en ese estudio no mostró ninguna prueba de una "tormenta de citocinas" tal en un modelo de rata análogo que usaba un superagonista específico de CD28 de rata, ni en macacos de Java (*Macaca fascicularis*) que recibieron el propio TGN1412 a dosis hasta 50 veces mayores que las de los voluntarios humanos (Duff, 2006, Expert Scientific Group on Phase One Clinical Trials Final Report. Norwich, RU: Stationary Office). Asimismo, la adición de TGN1412 a cultivos de PBMC humanas no dio por resultado la liberación de citocinas. Todos los experimentos claves con monos y cultivos de PBMC fueron repetidos por el British National Institute for Biological Standards and Control (NIB SC) actuando en nombre del Expert Scientific Group on Phase One Clinical Trials del Estado y confirmaron el comportamiento inocuo del TGN1412 en estos sistemas (Duff, 2006). Por consiguiente, estas ratas, macacos de Java y valoraciones de PBMC humanas cultivadas no fueron suficientes para alertar contra la tormenta de citocinas que experimentaron los voluntarios sanos. La ineficacia de los roedores y macacos de Java para liberar citocinas sistémicas tóxicas después de la inyección de CD28SA se puede deber a diferencias entre especies en la reactividad del sistema inmunitario intacto a dichos agentes, y se han realizado sugerencias específicas para dichas diferencias. (Gogishvili *et al.*, 2009, PLoS ONE 4(2): e4643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004643>; Nguyen *et al.*, 2006, Proc Natl Acad Sci U S A. 103:7765-7770; Schraven y Kalinke, 2008, Immunity 28: 591-595). Malcom *et al.* (2012) J. Immunol Methods, 384, P33-42 discute modelos de ratones humanizados para estudiar los riesgos de la liberación de citocinas tras una terapia con anticuerpos.

Weißmuller *et al.* (2016) investigó el TGN1412 y la inducción de linfocitopenia y la liberación de citocinas en modelos de ratón humanizado.

Un ser humano posee aproximadamente 1×10^{12} linfocitos T, y menos del uno por ciento de estas células circulan en la sangre en cualquier momento dado. Actualmente, se desconoce si la ineficacia de las PBMC cultivadas para responder al 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 se debe al requisito de un tipo de célula presente en órganos linfoides, pero no en la sangre, para la activación mediada por TGN1412 de los linfocitos T.

La ineficacia de los cultivos conocidos de PBMC humanas para responder al 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 organismo. La corrección de este defecto puede no solo permitir un análisis detallado de los efectos de superagonistas (SA) de CD28 humanos, tales como TGN1412, sino que puede también revelar la reactividad de otros fármacos, aparentemente inocuos, durante el desarrollo preclínico.

Por consiguiente, hay una continua necesidad de un nuevo modelo animal humanizado *in vivo*, eficaz para la prueba de toxicidad de fármacos inmunomoduladores y para determinar toxicidades, tales como el síndrome de liberación de citocinas, en individuos antes del tratamiento en pacientes y los ensayos clínicos.

Sumario de la invención

La invención es como se describe en las reivindicaciones. En el presente documento, se divulga un método para determinar si un fármaco inmunomodulador probablemente desencadene un síndrome de liberación de citocinas grave en un ser humano tras la administración del fármaco inmunomodulador. De acuerdo con realizaciones de ejemplo, el presente método incluye:

- (a) proporcionar un ratón inmunodeficiente, dicho ratón se irradia con 75-125 cGy de rayos X;
- (b) injertar $1,5-3,0 \times 10^7$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un ser humano en dicho ratón;
- (c) administrar a dicho ratón un fármaco inmunomodulador 5-7 días después de injertar con las PBMC;
- (d) determinar la concentración sanguínea en dicho ratón de una pluralidad de citocinas que comprenden IFN- γ e IL-10, en donde la concentración sanguínea de IFN- $\gamma \geq 1800$ pg/ml e IL-10 ≥ 120 pg/ml es indicativa de un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ratón; y
- (e) determinar que dicho fármaco inmunomodulador probablemente desencadene un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ser humano, en donde la presencia de un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ratón es indicativa de que la administración de dicho fármaco inmunomodulador probablemente desencadene un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ser humano.

También se describe un método para determinar si una combinación de un primer fármaco inmunomodulador y un segundo fármaco inmunomodulador probablemente desencadene un síndrome de liberación de citocinas grave en un ser humano tras la administración de dicha combinación de fármacos inmunomoduladores. Dicho método incluye:

- (a) proporcionar un ratón inmunodeficiente, dicho ratón se irradia con 75-125 cGy de rayos X;
- (b) injertar $1,5-3,0 \times 10^7$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un ser humano en dicho ratón;
- (c) administrar a dicho ratón un primer fármaco inmunomodulador y un segundo fármaco inmunomodulador 5-7 días después de injertar con las PBMC;
- (d) determinar la concentración sanguínea en dicho ratón de una pluralidad de citocinas que comprenden IFN- γ e IL-10, en donde la concentración sanguínea de IFN- $\gamma \geq 1800$ pg/ml e IL-10 ≥ 120 pg/ml es indicativa de un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ratón; y
- (e) determinar que dicha combinación de fármacos inmunomoduladores probablemente desencadene un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ser humano, en donde la presencia de un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ratón es indicativa de que la administración de dicha combinación de fármacos inmunomoduladores probablemente desencadene un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ser humano.

También se describe un método de determinación de una dosificación segura de un fármaco inmunomodulador que no desencadena un síndrome de liberación de citocinas en un ser humano tras la administración del fármaco inmunomodulador. Dicho método comprende:

- (a) proporcionar un fármaco inmunomodulador con una primera dosificación, dicha primera dosificación del fármaco inmunomodulador se determina para desencadenar un síndrome de liberación de citocinas leve o grave en un primer ratón inmunodeficiente, irradiado y humanizado tras su administración;
- (b) proporcionar un segundo ratón inmunodeficiente, dicho segundo ratón se irradia con 75-125 cGy de rayos X;

- (c) injertar $1,5-3,0 \times 10^7$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un ser humano en dicho segundo ratón;
- (d) administrar a dicho segundo ratón un fármaco inmunomodulador 5-7 días después de injertar con las PBMC, dicho fármaco inmunomodulador se administra con una segunda dosificación que es menor que dicha primera dosificación;
- (e) determinar la concentración sanguínea en dicho segundo ratón de una pluralidad de citocinas que comprenden IFN- γ e IL-10; y
- (f) determinar una dosificación segura de dicho fármaco inmunomodulador para una administración en dicho ser humano, dicha dosificación segura es una dosificación que produce una concentración sanguínea de IFN- γ es <300 pg/ml e IL-10 es <25 pg/ml tras la administración de dicho fármaco inmunomodulador a dicho segundo ratón, en donde la concentración sanguínea de IFN- γ <300 pg/ml e IL-10 <25 pg/ml en dicho segundo ratón es indicativa de que la administración de dicha dosificación segura de dicho fármaco inmunomodulador probablemente no desencadene un síndrome de liberación de citocinas en dicho ser humano.

Se describe un método de determinación de la inmunotoxicidad de un candidato farmacológico para el uso en un ser humano, dicho método comprende:

- (a) proporcionar un ratón inmunodeficiente, dicho ratón se irradia con 75-125 cGy de rayos X;
- (b) injertar $4,5-5,5 \times 10^7$ PBMC humanas a dicho ratón;
- (c) administrar un candidato farmacológico a dicho ratón 4-7 días después de injertar;
- (d) determinar la concentración de citocina en sangre de dicho ratón, en donde dicha citocina es al menos una citocina seleccionada del grupo que consiste en IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 y TNF; y
- (e) determinar la inmunotoxicidad de dicho candidato farmacológico, en donde la concentración sanguínea en dicho ratón es de al menos una citocina seleccionada del grupo que consiste en:

IFN- γ ≥ 300 pg/ml,
 IL-2 ≥ 15 pg/ml,
 IL-4 ≥ 10 pg/ml,
 IL-6 ≥ 10 pg/ml,
 IL-10 ≥ 25 pg/ml, y TNF ≥ 5 pg/ml, que es indicativa de una inmunotoxicidad de dicho candidato farmacológico en un ser humano.

Se describe un método para determinar la probabilidad de que la administración de un fármaco inmunomodulador a un ser humano inducirá un síndrome de liberación de citocinas grave en el ser humano, dicho método comprende:

- (a) proporcionar una muestra de sangre de un ratón inmunodeficiente, irradiado y humanizado, administrado con un fármaco inmunomodulador 5-7 días después del injerto con $1,5-3,0 \times 10^7$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un ser humano; y
- (b) detectar *in vitro* la concentración de una pluralidad de citocinas que comprenden IFN- γ y/o IL-10 presente en la muestra de sangre del ratón, en donde una concentración de IFN- γ ≥ 1800 pg/ml o de IL-10 ≥ 120 pg/ml es indicativa de que la administración del fármaco inmunomodulador al ser humano probablemente induzca un síndrome de liberación de citocinas grave.

Se divulga un método para determinar la probabilidad de que la administración de una combinación de un primer fármaco inmunomodulador y un segundo fármaco inmunomodulador a un ser humano inducirá un síndrome de liberación de citocinas grave en el ser humano, dicho método comprende:

- (a) proporcionar una muestra de sangre de un ratón inmunodeficiente, irradiado y humanizado, administrado con una combinación de un primer fármaco inmunomodulador y un segundo fármaco inmunomodulador 5-7 días después del injerto con $1,5-3,0 \times 10^7$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un ser humano; y
- (b) detectar *in vitro* la concentración de IFN- γ y/o IL-10 presente en la muestra de sangre del ratón, en donde una concentración de IFN- γ ≥ 1800 pg/ml o de IL-10 ≥ 120 pg/ml es indicativa de que la administración de la combinación del primer fármaco inmunomodulador y el segundo fármaco inmunomodulador al ser humano probablemente induzca un síndrome de liberación de citocinas grave.

También se divulga un método para determinar la inmunotoxicidad de un candidato farmacológico en un ser humano. Dicho método comprende:

- (a) proporcionar una muestra de sangre de un ratón inmunodeficiente, irradiado y humanizado, administrado con un candidato farmacológico 4-7 días después del injerto con $4,5-5,5 \times 10^7$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un ser humano; y
- (b) detectar *in vitro* la concentración de al menos una citocina humana presente en la muestra de sangre del ratón para determinar la inmunotoxicidad del candidato farmacológico en el ser humano, en donde la al menos una

citocina humana se selecciona del grupo que consiste en IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 y TNF, y en donde el candidato farmacológico tiene una inmunotoxicidad baja en el ser humano cuando se detecta una concentración baja de citocina humana en la muestra de sangre del ratón.

5 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1A representa la medición del peso corporal de ratones NSG y NSG-CSF-1 después del injerto de células mononucleares de sangre periférica humana (hPBMC), 2×10^7 hPBMC/ratón. Hubo 10 ratones por grupo y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La FIG. 1B representa la medición del peso corporal de ratones NSG después del injerto de 2×10^7 hPBMC/ratón. Cada línea representa un ratón.

La FIG. 2A representa la reconstitución de PBMC humanas en ratones NSG, NSG-IL-6 y NSG-CSF-1 en el día 5 después del injerto de 2×10^7 hPBMC/ratón del donante 331. Hubo 5 ratones por grupo y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La FIG. 2B representa diferentes poblaciones de células del día 5 o el día 10 después del injerto en ratones NSG de 2×10^7 hPBMC/ratón de cuatro donantes diferentes, 362, 213, 309 y 364. Hubo 2-5 ratones por grupo por cada punto temporal y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La FIG. 2C representa diferentes poblaciones de células del día 5 o el día 10 después del injerto en ratones NSG de 3×10^7 hPBMC/ratón del donante 358. Hubo 4 ratones por grupo por cada punto temporal y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La FIG. 3A representa la medición del peso corporal de 5 ratones NSG injertados con 5×10^7 hPBMC/ratón del donante 4692. Los datos son la media $\pm$ SEM.

La FIG. 3B representa la medición del peso corporal de 5 ratones NSG injertados con 5×10^7 hPBMC/ratón del donante 362. Los datos son la media $\pm$ SEM.

La FIG. 3C representa la medición del peso corporal de 5 ratones NSG injertados con 2×10^7 hPBMC/ratón del donante 309. Los datos son la media $\pm$ SEM.

La FIG. 3D representa la medición del peso corporal de 4 ratones NSG injertados con 3×10^7 hPBMC/ratón del donante 358. Los datos son la media $\pm$ SEM.

La FIG. 4A representa las comparaciones de la reconstitución de PBMC de 10 donantes en ratones humanizados en el día 5 (injerto de 2×10^7 hPBMC/ratón). Los ratones NSG humanizados se sometieron a prueba para la reconstitución del subgrupo de células inmunitarias indicadas mediante citometría de flujo. Se muestran las células CD45+ humanas como un porcentaje de las células totales, así como también CD3, CD19, CD14 y CD56 como un porcentaje de las células CD45+ (acotado en las células CD45+). (Los donantes A4692, A4625 y A4668 solo mostraron CD45, CD3, CD19 y CD14, pero no CD56).

La figura 4B representa información de donantes pacientes anonimizados antes del injerto (excepto los donantes A4625 y A4668).

Las FIG. 5A-5F representan la inducción de citocinas después de la inyección de mAb en ratones NSG humanizados con hPBMC (2×10^7 hPBMC/ratón) de 10 donantes diferentes. Los ratones se inyectaron por vía intravenosa con 0,5 mg/kg de OKT3 o 1 mg/kg de anti-CD28 (mAb ANC28.1/5D10), o PBS (control). Se extrajo sangre a los ratones a las 2 y 6 horas, y las concentraciones de citocina circulante se midieron mediante el kit BD CBA Th1/Th2 II. Las concentraciones de citocina se muestran en las FIG. 5A-5F. El número de ratones en cada grupo fue 2-5, y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La FIG. 5A representa los valores de IFN- γ después de la inducción tras las provocaciones con mAb: respuesta intensa/elevada: ≥ 1800 pg/ml; respuesta media/discreta: $300 \text{ pg/ml} \leq \text{IFN-}\gamma < 1,800$ pg/ml; y respuesta baja / ninguna respuesta: < 300 pg/ml.

La FIG. 5B representa los valores de IL-10: respuesta intensa/elevada: ≥ 120 pg/ml; respuesta media/ discreta: $25 \text{ pg/ml} \leq \text{IL-10} < 120$ pg/ml; y respuesta baja / ninguna respuesta: < 25 pg/ml.

La FIG. 5C representa el valor de IL-6 de los ratones humanizados después de la inducción de citocinas tras las provocaciones con mAb.

La FIG. 5D representa el valor de IL-2 de los ratones humanizados después de la inducción de citocinas tras las provocaciones con mAb.

La FIG. 5E representa el valor de IL-4 de los ratones humanizados después de la inducción de citocinas tras las provocaciones con mAb.

La FIG. 5F representa el valor de TNF de los ratones humanizados después de la inducción de citocinas tras las provocaciones con mAb.

La FIG. 6 representa las diferentes respuestas entre los 10 donantes que recibieron la administración de OKT3 o mAb anti-CD28. Después de la administración de mAb anti-CD28, los donantes A4692, A4668 y 362 respondieron con valores intensos/elevados de IFN- γ e IL-10; los donantes A4625, 366, 345, 309 y 213 respondieron con valores medios/discretos de IFN- γ e IL-10; y los donantes 364 y 353 respondieron con valores bajos / ningún valor de IFN- γ e IL-10.

La FIG. 7 representa los cambios de temperatura rectal en ratones NSG humanizados que se injertados con hPMBC de 10 donantes, seguido de inyecciones con PBS de control, OKT3 o mAb anti-CD28. El número de ratones en cada grupo fue 2-5, y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La FIG. 8 representa la puntuación clínica de los ratones humanizados de 10 donantes después de la inyección de los fármacos inmunomoduladores. A las 2 y 6 horas después de la inyección con PBS, OKT3 o mAb anti-CD28, la puntuación clínica de cada ratón se evaluó con los criterios siguientes: Puntuación: 0=actividad normal; 1= actividad normal, piloerección, marcha de puntillas; 2=encorvado, actividad reducida pero aún móvil; 3=hipomotilidad pero móvil cuando es motivado; 4=moribundo (insensible al tacto). El número de ratones en cada grupo fue 2-5, y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

Las FIG. 9A-9F representan una comparación de la respuesta de citocinas en ratones humanizados del donante 213 con 2×10^7 PBMC/ratón o 5×10^7 PBMC/ratón.

La FIG. 9A representa el valor de IFN- γ que subió por encima de 1800 pg/ml en 5×10^7 PBMC/ratón, pero no en 2×10^7 PBMC/ratón.

La FIG. 9B representa el valor de IL-10 que subió por encima de 120 pg/ml en 5×10^7 PBMC/ratón, pero no en 2×10^7 PBMC/ratón.

La FIG. 9C representa el valor de IL-6 con 2×10^7 PBMC/ratón y 5×10^7 PBMC/ratón.

La FIG. 9D representa el valor de IL-2 con 2×10^7 PBMC/ratón y 5×10^7 PBMC/ratón.

La FIG. 9E representa el valor de IL-4 con 2×10^7 PBMC/ratón y 5×10^7 PBMC/ratón.

La FIG. 9F representa el valor de TNF con 2×10^7 PBMC/ratón y 5×10^7 PBMC/ratón.

Las FIG. 10A-10F representan la inducción de citocinas después de la inyección de anticuerpos en ratones NSG humanizados con diferentes concentraciones de PBMC humanas (2×10^7 , 3×10^7 y 4×10^7 por ratón del donante 309). Los ratones se inyectaron por vía intravenosa con 0,5 mg/kg de OKT3, 1 mg/kg de anti-CD28, 10 mg/kg de KEYTRUDA® (pembrolizumab) o PBS como control. Se extrajo sangre a los ratones a las 2 y 6 horas, y las concentraciones de citocina circulante se midieron mediante el kit BD CBA Th1/Th2 II. El número de ratones en cada grupo fue 3-5, y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La FIG. 10A representa el valor de IFN- γ con 2×10^7 PBMC/ratón, 3×10^7 PBMC/ratón y 4×10^7 PBMC/ratón.

La FIG. 10B representa el valor de IL-10 con 2×10^7 PBMC/ratón, 3×10^7 PBMC/ratón y 4×10^7 PBMC/ratón.

La FIG. 10C representa el valor de IL-6 con 2×10^7 PBMC/ratón, 3×10^7 PBMC/ratón y 4×10^7 PBMC/ratón.

La FIG. 10D representa el valor de IL-2 con 2×10^7 PBMC/ratón, 3×10^7 PBMC/ratón y 4×10^7 PBMC/ratón.

La FIG. 10E representa el valor de IL-4 con 2×10^7 PBMC/ratón, 3×10^7 PBMC/ratón y 4×10^7 PBMC/ratón.

La FIG. 10F representa la cantidad de TNF con 2×10^7 PBMC/ratón, 3×10^7 PBMC/ratón y 4×10^7 PBMC/ratón.

Las FIG. 11A-11D representan los cambios de temperatura corporal y puntuación clínica en respuesta a OKT3, anti-CD28 y KEYTRUDA® (pembrolizumab) en ratones humanizados con PBMC del donante 309.

La FIG. 11A representa la población de células de ratones del donante 309 en el día 5. Cinco ratones NSG se injertaron con 2×10^7 PBMC/ratón; cinco ratones NSG se injertaron con 3×10^7 PBMC/ratón y cinco ratones NSG se injertaron con 4×10^7 PBMC/ratón. Todos los ratones se injertaron 4 horas después de una irradiación con 100cGy de rayos X.

Se extrajo sangre a los ratones el día 5 para examinar la población de células CD45, CD3, CD19, CD14 y CD56 mediante citometría de flujo.

La FIG. 11B representa la puntuación clínica de ratones humanizados a las 2 y 6 horas después de la inyección del fármaco: PBS de control, 0,5 mg/kg de OKT3, 1 mg/kg de anti-CD28 o 10 mg/kg de KEYTRUDA® (pembrolizumab). La puntuación clínica se evaluó con los criterios siguientes: Puntuación: 0=actividad normal; 1= actividad normal, piloerección, marcha de puntillas; 2=encorvado, actividad reducida pero aún móvil; 3=hipomotilidad pero móvil cuando es motivado; 4=moribundo. Hubo 5 ratones/grupo, y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La FIG. 11C muestra temperaturas rectales que se midieron usando 2×10^7 PBMC/ratón con el donante 309. Los ratones se inyectaron con PBS de control, 0,5 mg/kg de OKT3, 1 mg/kg de anti-CD28 o 10 mg/kg de KEYTRUDA® (pembrolizumab). La temperatura rectal se midió a las 2 y 6 horas después de la inyección de fármacos. Hubo 3-5 ratones/grupo, y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La FIG. 11D muestra temperaturas rectales que se midieron usando 3×10^7 PBMC/ratón con el donante 309. Los ratones se inyectaron con PBS de control, 0,5 mg/kg de OKT3, 1 mg/kg de anti-CD28 o 10 mg/kg de KEYTRUDA® (pembrolizumab). La temperatura rectal se midió a las 2 y 6 horas después de la inyección de fármacos. Hubo 3-5 ratones/grupo, y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La FIG. 11E muestra temperaturas rectales que se midieron usando 4×10^7 PBMC/ratón con el donante 309. Los ratones se inyectaron con PBS de control, 0,5 mg/kg de OKT3, 1 mg/kg de anti-CD28 o 10 mg/kg de KEYTRUDA® (pembrolizumab). La temperatura rectal se midió a las 2 y 6 horas después de la inyección de fármacos. Hubo 3-5 ratones/grupo, y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

Las FIG 12A-12F representan el efecto de dosis de KEYTRUDA® (pembrolizumab) en la inducción de diferentes valores de citocinas con diferentes dosis de KEYTRUDA®. Los ratones NSG se injertaron con 3×10^7 PBMC/ratón del donante 358 seis días antes de la dosificación de KEYTRUDA®. El día de la dosis, los ratones se inyectaron por vía intravenosa con PBS, 0,5 mg/kg de OKT3, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg y 10 mg/kg de KEYTRUDA®. A los ratones se les extrajo sangre a las 2 y 6 horas, y las concentraciones de citocina circulante se midieron mediante el kit BD CBA Th1/Th2 II. Hubo 5 ratones/grupo, y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La FIG. 12A representa el valor de IFN- γ con 3×10^7 PBMC/ratón.

La FIG. 12B representa el valor de IL-10 con 3×10^7 PBMC/ratón.

La FIG. 12C representa el valor de IL-6 con 3×10^7 PBMC/ratón.

La FIG. 12D representa el valor de IL-2 con 3×10^7 PBMC/ratón.

La FIG. 12E representa el valor de IL-4 con 3×10^7 PBMC/ratón.

La FIG. 12F representa el valor de TNF con 3×10^7 PBMC/ratón.

Las FIG. 13A-13C representan los cambios de temperatura corporal y puntuación clínica en respuesta a KEYTRUDA® (pembrolizumab) en ratones humanizados con PBMC del donante 358.

La FIG. 13A representa la población de células de ratones del donante 358 en el día 5. Cuatro (4) ratones NSG se injertaron con 3×10^7 hPBMC 4 horas después de una irradiación con 100cGy de rayos X. Se extrajo sangre a los ratones el día 5 para examinar la población de células CD45, CD3, CD19, CD14 y CD56 mediante citometría de flujo.

La FIG. 13B representa la puntuación clínica de ratones humanizados después de la inyección del fármaco. Después de 2 y 6 horas de PBS, 0,5 mg/kg de OKT3, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg y 10 mg/kg de KEYTRUDA® (pembrolizumab), la puntuación clínica se evaluó con los criterios siguientes: Puntuación: 0=actividad normal; 1= actividad normal, piloerección, marcha de puntillas; 2=encorvado, actividad reducida pero aún móvil; 3=hipomotilidad pero móvil cuando es motivado; 4=moribundo. Hubo 5 ratones/grupo, y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La FIG. 13C representa la temperatura rectal medida en ratones humanizados en diferentes momentos. Los ratones se inyectaron con PBS de control, 0,5 mg/kg de OKT3, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg y 10 mg/kg de KEYTRUDA® (pembrolizumab), y la temperatura rectal se midió a las 2 y 6 horas después de la inyección de fármacos. Hubo 5 ratones/grupo, y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

Las FIG. 14A-B representan los diferentes resultados de la medición *in vitro* e *in vivo* de la liberación de citocinas después de la exposición al fármaco.

La FIG. 14A presenta histogramas que comparan los grados de liberación de citocinas en respuesta al tratamiento con anti-CD28 obtenidas mediante experimentos *in vitro* (paneles a y c) o *in vivo* (paneles b y d) con 4 donantes de PBMC diferentes para IFN- γ (paneles a y b) o IL-10 (paneles c y d). Los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La FIG. 14B presenta histogramas que comparan los grados de liberación de citocinas en respuesta al tratamiento con anti-CD28 obtenidas mediante experimentos *in vitro* (paneles e y g) o *in vivo* (paneles f y h) con 4 donantes de PBMC diferentes para IL-6 (paneles e y f) o IL-4 (paneles g y h). Los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La FIG. 15 presenta histogramas de grados de liberación de citocinas en respuesta al tratamiento con anti-CD28 obtenidas mediante experimentos *in vitro* o *in vivo* con el donante 213 de PBMC diferentes para a) IFN- γ ; b) IL-10; c) IL-6; y d) IL-4. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. La línea de puntos en cada gráfico constituye el nivel de control para el experimento con anti-CD28.

La FIG. 16 presenta histogramas de grados de liberación de citocinas en respuesta al tratamiento con KEYTRUDA® (pembrolizumab), REVLIMID® (lenalidomida) o ambos fármacos para el donante 213 o donante 364 de PBMC para a) IFN- γ ; b) IL-6; c) IL-4; d) IL-10; e) IL-2; y f) TNF. El tratamiento con PBS fue el control. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La FIG. 17 presenta histogramas de grados de liberación de citocinas en respuesta al tratamiento con KEYTRUDA® (pembrolizumab), ATG o ambos fármacos para el donante 213 o donante 364 de PBMC para a) IFN- γ ; b) IL-10; c) IL-6; d) IL-2; e) IL-4; y f) TNF. El tratamiento con PBS fue el control. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La FIG. 18 presenta histogramas de grados de liberación de citocinas en respuesta al tratamiento con anti-CD28, ATG o ambos fármacos para el donante 213 o donante 364 de PBMC para a) IFN- γ ; b) IL-6; c) IL-4; d) IL-2; e) IL-4; y f) TNF. El tratamiento con PBS fue el control. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La FIG. 19 ilustra poblaciones de células del día 5 o el día 10 en la sangre completa de ratones humanizados con o sin irradiación anterior al injerto con PBMC humanas; los ratones se humanizaron con PBMC provenientes de uno a seis donantes diferentes: 362, 345 y 2785 (gráfico superior) y 213, 364 y 3251 (gráfico inferior).

La FIG. 20 muestra la pérdida de peso corporal en función de los días después del injerto de PBMC para ratones humanizados con PBMC humanas provenientes de uno a seis donantes diferentes: 362, 345 y 2785 (panel a) y 213, 364 y 3251 (panel b) después de la irradiación (IR) y sin irradiación (sin IR).

La FIG. 21 muestra el valor de citocinas en ratones humanizados con PBMC sin ningún tratamiento farmacológico el día 10 después del injerto con PBMC.

Las FIG. 22A-22B presentan gráficos del valor de citocinas liberadas después del tratamiento farmacológico (mediante ratones humanizados irradiados y no irradiados con PBMC del donante 362 o 213. Los fármacos (OKT3, KEYTRUDA o ATG) o el control negativo (PBS) se administraron el día 6 después del injerto de PBMC.

La FIG. 22A presenta gráficos del valor de citocina de IFN- γ (panel a), IL-10 (panel b) e IL-6 (panel c).

La FIG. 22B presenta gráficos del valor de citocina de IL-2 (panel d), IL-4 (panel e) y TNF (panel f).

Descripción detallada de la invención

Definiciones:

Al describir las formas de realización preferidas, se emplea una terminología específica en aras de claridad. Sin embargo, las formas de realización no pretenden limitarse a la terminología específica. A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional.

Como se usa en el presente documento, "un" o "una" puede significar uno/a o más. Como se usa en el presente documento, "otro(a)" puede significar al menos un(a) segundo(a) o más. Asimismo, a menos que se requiera lo contrario por contexto, los términos en singular incluyen pluralidades y los términos en plural incluyen el singular.

El término "NSG" se refiere al modelo de ratón inmunodeficiente de NOD scid gamma (es decir, ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wj1}/SzJ; Jackson Laboratory, n.º de reserva: 005557). Los ratones portan dos mutaciones en el fondo genético de NOD/ShiLtJ; una inmunodeficiencia combinada grave (scid) y un alelo totalmente nulo de la cadena gamma común del receptor de interleucina-2 (IL-2) (IL2rgnull). Estos ratones son extremadamente inmunodeficientes.

El término "NSG-CSF-1" se refiere al modelo de ratón NSG cuyo genoma contiene un gen del CSF-1 (factor estimulante de colonias de macrófagos 1) humano y los ratones NSG-CSF-1 transgénicos expresan la citocina CSF-1 humana (Jackson Laboratory, n.º de reserva: 028654).

El término "NSG-IL-6" se refiere al modelo de ratón NSG cuyo genoma contiene un de la interleucina-6 (IL-6) humana y expresa la citocina IL-6 (Jackson Laboratory, n.º de reserva: 028655).

El término "CD" se refiere al grupo de diferenciación.

El término "CD3" se refiere al grupo de diferenciación 3 y representa un antígeno que forma parte del complejo de receptor de células T (TCR) en un linfocito T maduro.

El término "CD4" se refiere al grupo de diferenciación 4 y este antígeno es una glucoproteína que se encuentra en la superficie de las células inmunitarias, tales como células T cooperadoras, monocitos, macrófagos y células dendríticas.

El término "CD8" se refiere al grupo de diferenciación 8 y es un correceptor que se expresa predominantemente en la superficie de células T citotóxicas, pero también se puede encontrar en células citolíticas naturales, timocitos corticales y células dendríticas.

El término "CD14" se refiere al grupo de diferenciación 14 y es un antígeno expresado principalmente por macrófagos y células dendríticas.

El término "CD19" se refiere al grupo de diferenciación 19 y este antígeno se encuentra en las células B.

El término "CD28" se refiere al grupo de diferenciación 28 y es una de las proteínas expresadas en las células T que proporcionan señales coestimuladoras necesarias para la activación y la supervivencia de células T. La estimulación de células T mediante el CD28, además del receptor de células T (TCR), puede proporcionar una señal potente para la producción de diversas interleucinas (p. ej., IL-6).

El término "CD45" se refiere al grupo de diferenciación 45 y este antígeno está presente en linfocitos, monocitos y otras células mieloides del ser humano.

El término "CD56" se refiere al grupo de diferenciación 56 y es una glucoproteína de unión homofílica expresada en la superficie de las células citolíticas naturales (células NK).

El término "células mononucleares de sangre periférica (PBMC)" se refiere a las células de sangre periférica que tienen un núcleo redondo. Estas células sanguíneas mononucleares recirculan entre los tejidos y la sangre, y son un componente crítico en el sistema inmunitario para luchar combatir las infecciones y adaptarse a los cuerpos extraños. Hay dos tipos principales de células mononucleares, linfocitos y monocitos. La población de linfocitos de las PBMC típicamente consiste en células T, células B y células NK. Las PBMC se pueden aislar de muestras de sangre completa mediante métodos bien conocidos en la técnica (p. ej., gradiente de Ficoll).

El término "citocina" se refiere a un miembro de una clase de proteínas de bajo peso molecular (~5-20 kDa) que son importantes en la señalización celular. Las citocinas incluyen quimiocinas, interferones, interleucinas, linfocinas y factores de necrosis tumoral. Los ejemplos de citocinas incluyen IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 y TNF α . Las citocinas son producidas por un amplio rango de células, incluidas las células inmunitarias, como macrófagos, linfocitos B, linfocitos T y mastocitos; una citocina determinada puede ser producida por más de un tipo de célula. Su liberación tiene un efecto en el comportamiento de las células alrededor de ellas. Las citocinas se han identificado como implicados en la señalización autocrina, señalización paracrina y señalización endocrina como agentes inmunomoduladores.

La expresión "síndrome de liberación de citocinas ("CRS")" se usa en el presente documento de manera indistinta con "cascada de citocinas", "hipercitocinemia" y "tormenta de citocinas". "La tormenta de citocinas", que también se conoce como "hipercitocinemia" en la técnica, define una respuesta inflamatoria sistémica en el paciente *inter alia* caracterizada por hipotensión, pirexia y/o escalofríos, y potencialmente da por resultado la muerte. Se presume que la tormenta de citocinas es causada por un ciclo de retroalimentación positiva no controlado entre las citocinas y las células inmunitarias, lo que da por resultado valores altamente elevados de diversas citocinas. Aunque estas expresiones pueden diferir en algún grado, todas son el resultado de una liberación inaceptablemente elevada de citocinas por un sujeto, como resultado de la administración de ciertos anticuerpos al sujeto. El sujeto reacciona al tratamiento mediante la liberación de valores inaceptablemente elevados de citocinas. Al referirse a una de estas expresiones en el presente documento, se pretende abarcar todas las expresiones.

La expresión "clasificación del síndrome de liberación de citocinas ("CRS")" se basa en aquella definida por Daniel W. Lee, *et al.*, "Current Concepts in the Diagnosis and Management of Cytokine Release Syndrome", Blood. 2014 Jul 10; 124(2): 188-195: grado 1: los síntomas no son potencialmente mortales y solo requieren de tratamiento sintomático (p. ej., fiebre, náuseas, fatiga, cefalea, mialgias, decaimiento); grado 2: los síntomas requieren y responden a una intervención moderada, demanda de oxígeno <40 %, o hipotensión sensible a fluidos o dosis baja de un vasopresor, o toxicidad de órganos grado 2; grado 3: los síntomas requieren de y responden a una intervención agresiva, demanda de oxígeno $\geq$ 40 %, o hipotensión que requiere una dosis alta o múltiples vasopresores, o toxicidad de órganos grado 3 o elevación de las transaminasas grado 4; grado 4: síntomas potencialmente mortales, demanda de asistencia de respirador, toxicidad de órganos grado 4 (excluida la elevación de las transaminasas); grado 5: muerte. A los fines de la presente solicitud, el CRS grave se refiere a los grados 4-5 y el CRS leve abarca los grados 1-3.

Los presentes inventores han determinado que las concentraciones de ciertas citocinas liberadas en los modelos de ratón humanizado en respuesta a un fármaco administrado o candidato farmacológico se pueden usar para predecir la gravedad relativa del síndrome de liberación de citocinas que se espera en un ser humano en respuesta al fármaco administrado o candidato farmacológico. Los inventores han determinado, para ratones inmunodeficientes injertados con $1,5-3,0 \times 10^7$ PBMC de un ser humano, los valores umbrales para la concentración sanguínea de ciertas citocinas en el ratón para determinar la gravedad de la liberación de citocinas inducida en el ratón por un fármaco administrado al ratón 5-7 días después del injerto. Los valores umbrales se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 1. Valores umbrales para determinar la gravedad de la liberación de citocinas inducida por un fármaco administrado a un ratón inmunodeficiente injertado con $1,5-3,0 \times 10^7$ PBMC.

Citocina	Respuesta intensa/elevada	Respuesta media/discreta	Respuesta baja/ninguna respuesta
IFN- γ	$\geq 1,800$ pg/ml	300 pg/ml to < 1800 pg/ml	< 300 pg/ml
IL-10	≥ 120 pg/ml	25 pg/ml to < 120 pg/ml	< 25 pg/ml
IL-6	≥ 25 pg/ml	10 pg/ml to < 25 pg/ml	< 10 pg/ml
IL-2	≥ 80 pg/ml	15 pg/ml to < 80 pg/ml	< 15 pg/ml
IL-4	≥ 25 pg/ml	10 pg/ml to < 25 pg/ml	< 10 pg/ml
TNF α	≥ 20 pg/ml	5 pg/ml to < 20 pg/ml	< 5 pg/ml

Los valores umbrales para la concentración de citocina en el ratón de la tabla 1 se determinaron a partir de datos experimentales, en conjunto con los informes disponibles en la bibliografía, y tienen una variabilidad de ± 10 %.

Los valores umbrales para la concentración de citocina en el ratón para una respuesta intensa/elevada corresponden a un grado de CRS en el humano de 4-5; los valores umbrales para la concentración de citocina en el ratón para una respuesta media/discreta corresponden a un grado de CRS en el humano de 1-3; y los valores umbrales para la concentración de citocina en el ratón para una respuesta media/discreta corresponden a un grado de CRS en el humano < 1 .

En los métodos divulgados con injerto de $1,5-3,0 \times 10^7$ PBMC en los ratones, los inventores han determinado que, cuando se observa una respuesta intensa/elevada en los ratones, por ejemplo, cuando IFN- $\gamma \geq 1800$ pg/ml o IL-10 ≥ 120 pg/ml, entonces es probable que el ser humano pueda tener un síndrome de liberación de citocinas grave tras la administración del fármaco o candidato farmacológico. De manera similar, en los métodos divulgados con injerto de $1,5-3,0 \times 10^7$ PBMC en los ratones, los inventores han determinado que, cuando se observa una respuesta baja/ninguna respuesta en los ratones, por ejemplo, cuando IFN- $\gamma < 300$ pg/ml o IL-10 < 25 pg/ml, entonces es probable que el ser humano no tendrá un síndrome de liberación de citocinas grave tras la administración del fármaco o candidato farmacológico, sino que, en cambio, probablemente tendrá como máximo un grado bajo de liberación de citocinas. Una concentración de IFN- γ o IL-10 en los ratones injertados con $1,5-3,0 \times 10^7$ PBMC entre estos valores umbrales se designa como una respuesta media/discreta, lo que indica que es posible que el ser humano experimente un síndrome de liberación de citocinas medio/leve tras la administración del fármaco o candidato farmacológico. Los valores umbrales en ratones de IL-6, IL-4, IL-2 o TNF inducida se pueden usar de manera similar para valorar la gravedad de la respuesta de citocinas a un fármaco o candidato farmacológico. Los valores umbrales en ratones de IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-4, IL-2 y TNF α inducida se pueden usar solos o en cualquier combinación para valorar la gravedad de la respuesta de citocinas a un fármaco o candidato farmacológico en un ser humano.

Los términos “donantes”, “individuos”, “seres humanos”, “sujetos” y “pacientes” (y las formas en singular de estos términos) se usan en el presente documento de manera algo indistinta. En las pruebas llevadas a cabo por los presentes inventores, se usó PBMC de “donante”. En el presente método, más que un “donante”, se usarían PBMC de un ser humano, individuo, sujeto o paciente en particular, para quien se está considerando el fármaco inmunomodulador para una posible administración. El uso de uno de estos términos en el presente documento pretende abarcar cada uno de estos términos. En el presente método, los individuos, los sujetos y los pacientes son seres humanos. No obstante, se contempla que el método pueda aplicarse a otros mamíferos, quizás con algunas modificaciones del método, que los expertos en la técnica pueden determinar, usando los métodos y las técnicas descritas en el presente documento.

La expresión “fármaco inmunomodulador” significa cualquier agente terapéutico (p. ej., mAb) que puede activar o reducir el sistema inmunitario, p. ej., al activar o inhibir las funciones de linfocitos, por ejemplo, las funciones de células T, como la activación o inhibición de las células T. Los fármacos o agentes inmunomoduladores, o los inmunomoduladores, o los fármacos inmunoterápicos pueden incluir, por ejemplo, interleucinas, citocinas, quimiocinas, fármacos inmunomoduladores de imida u otros agentes que se pueden usar en inmunoterapia. A modo de un ejemplo no limitativo, la inmunoterapia del cáncer trata de estimular el sistema inmunitario para destruir tumores. De este modo, los se pueden usar para intentar tratar el cáncer en un paciente, pero los usos de fármacos inmunomoduladores no se limitan al tratamiento del cáncer. La inmunoterapia se puede usar sola o en combinación con otros métodos de tratamiento. Una forma de realización de ejemplo del fármaco inmunomodulador es un fármaco inmunoestimulante, como un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo monoclonal (mAb). Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo monoclonal humano, superagonista y específico de CD28.

Los ejemplos de fármacos inmunomoduladores incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); interferones; imiquimod; talidomida y sus derivados o análogos, lenalidomida (REVLIMID®), pomalidomida (IMNOVID®) y apremilast; azatioprina, cladribina, ciclofosfamida, inmunoglobulina intravenosa, metotrexato, mitoxantrona; IMLYGIC™ (talimogeno laherparepvec), una terapia vírica oncolítica modificada genéticamente; daratumumab (DARZALEX®), un anticuerpo anti-CD38; adalimumab (HUMIRA®), EMLICIT™ (elotuzumab), epacadostat, una hidroxiamidina disponible por vía oral e inhibidora de la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO1), catumaxomab (REMOVAB®), ibritumomab tiuxetano (ZEVALIN®), tositumomab-¹³¹I (BEXXAR®), brentuximab vedotin (ADCETRIS®), betuximab (ERBITUX®), rituximab (MABTHERA® o RITUXAN®), alemtuzumab (CAMPATH-1H®), bevacizumab (AVASTIN®), pertuzumab (PERJETA®), trastuzumab (HERCEPTIN®), trastuzumab emtansin (KADCYLA™), denosumab (PROLIA® o XGEVA®), ipilimumab (YERVOY®), ofatumumab (ARZERRA®) y panitumumab (VECTIBIX®).

Un inhibidor del punto de control es un fármaco que bloquea ciertas proteínas fabricadas por ciertos tipos de células del sistema inmunitario, tales como células T, y algunas células cancerosas. Estas proteínas ayudan a mantener las respuestas inmunitarias en control y pueden evitar que las células T maten a las células cancerosas. Cuando estas proteínas están bloqueadas por el inhibidor del punto de control, los “frenos” en el sistema inmunitario se liberan. Si bien esta liberación de los “frenos” inmunitarios pueden permitir que las células T sean más capaces de matar a las células cancerosas, también puede provocar el CRS como efecto adverso.

Una clase ejemplar de fármacos inmunomoduladores son los inhibidores del punto de control, que suelen ser anticuerpos monoclonales, tales como los fármacos contra el cáncer aprobados por la FDA, ipilimumab (YERVOY®), pembrolizumab (KEYTRUDA®) y nivolumab (OPDIVO®). Un aspecto importante del sistema inmunitario es su capacidad para diferenciar entre células normales en el organismo y aquellas que este ve como “extrañas”. Esto permite que el sistema inmunitario ataque a las células extrañas mientras deja las células normales solas. Para hacer esto, usa “inhibidores del punto de control”, moléculas en ciertas células inmunitarias que necesitan ser activadas (o inactivadas) para iniciar una respuesta inmunitaria. Los inhibidores del punto de control ejemplares aprobados por la FDA incluyen el inhibidor de CTLA-4, ipilimumab (YERVOY®), los inhibidores de PD-1, pembrolizumab (KEYTRUDA®) y nivolumab (OPDIVO®), y los inhibidores de PD-L1, atezolizumab (TECENTRIQ®), avelumab (BAVENCIO®) y durvalumab (IMFINZI®).

La expresión “activación de células T” preferentemente especifica los mecanismos de activación de células T que pueden variar ligeramente entre diferentes tipos de células T. No obstante, el “modelo de dos señales” en las células T CD4+ es aplicable para la mayoría de los tipos de células T. Con más detalle, la activación de células T CD4+ típicamente ocurre a través del acoplamiento del receptor de células T y el CD28 en la superficie de las células T mediante la molécula principal de histocompatibilidad, codificada y presentadora de antígeno, y con su péptido antigénico unido y miembros de la familia B7 en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC), respectivamente. Ambos contactos célula-célula generalmente son necesarios para la producción de una respuesta inmunitaria eficaz. Por ejemplo, en ausencia de una coestimulación de CD28, la señalización sola del receptor de células T puede dar por resultado anergia de las células T. Las vías de señalización adicionales posteriores desde el CD28 y el receptor de células T implican muchas proteínas adicionales conocidas para el experto en la técnica. La activación de células T se puede determinar mediante la liberación de citocinas y/o la proliferación celular, en particular, la proliferación de células T, como se describe en el presente documento a continuación.

La expresión “puntuación clínica” se adopta según lo define Jamie L Brady, *et al.* “Preclinical Screening for Acute Toxicity of Therapeutic Monoclonal Antibodies in a hu-SCID Model”, *Clinical & Translational Immunology* (2014) 3, e29; doi:10.1038/cti.2014.28; publicado en línea el 19 de diciembre del 2014: 0 = actividad normal; 1 = actividad normal, piloerección, marcha de puntillas; 2 = encorvado, actividad reducida pero aún móvil; 3 = hipomotilidad pero móvil cuando es motivado; 4 = moribundo (insensible al tacto).

El término “dosis” o “dosificación” significa la cantidad de un fármaco que un paciente debe tomar en una vez.

Una “dosificación segura” de un fármaco inmunomodulador para un ser humano se refiere en el presente documento a una dosificación que produce una concentración sanguínea de citocina en el ratón correspondiente a una respuesta baja / ninguna respuesta, p. ej., IFN-γ es <300 pg/ml e IL-10 es <25 pg/ml, tras la administración del fármaco inmunomodulador a un ratón inmunodeficiente e irradiado, injertado con $1,5\text{--}3,0 \times 10^7$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un ser humano, según se determina mediante los métodos divulgados en el presente documento. Una dosificación segura desde el punto de vista inmunológico puede corresponder o no a una dosificación que tiene eficacia terapéutica.

La “eficacia” significa la capacidad de un fármaco o un agente activo administrado a un paciente para producir un efecto terapéutico en el paciente.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad eficaz” es aquella cantidad de un agente farmacéutico para lograr un efecto farmacológico. La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” incluye, por ejemplo, una cantidad eficaz desde el punto de vista profiláctico. Una “cantidad eficaz” de un fármaco es una cantidad necesaria para lograr un efecto farmacológico deseado o una mejora terapéutica sin efectos secundarios adversos en exceso. La cantidad eficaz de un fármaco será seleccionada por los expertos en la técnica en función del paciente en particular y la enfermedad. Se

entiende que “una cantidad eficaz” o “una cantidad terapéuticamente eficaz” puede variar de un sujeto a otro, debido a la variación en el metabolismo del fármaco, la edad, el peso, el estado general del sujeto, el cuadro clínico que se está tratando, la gravedad del cuadro clínico que se está tratando y el juicio del facultativo prescriptor.

- 5 El término “inmunotoxicidad” en el presente documento se refiere a la propensión de un fármaco o un candidato farmacológico de generar una inmuoestimulación adversa, tal como el síndrome de liberación de citocinas.

10 La expresión “candidato farmacológico” significa cualquier fármaco o composición potencial, incluidos uno o más agentes activos, tales como anticuerpos, moléculas de bajo peso molecular y/u otros compuestos que son identificados mediante el cribado para el descubrimiento de fármacos para tener potencialmente un efecto terapéutico de aliviar, tratar y/o curar una enfermedad, afección, herida, dolencia o cuadro clínico.

15 Los presentes inventores produjeron un modelo de ratón humanizado para cribar y determinar la toxicidad inmunitaria del fármaco, en particular, el síndrome de liberación de citocinas (CRS) en un individuo, para pruebas preclínicas, ensayos clínicos y/o tratamiento individual del individuo que recibe el fármaco. La presente divulgación resulta útil para determinar la reactividad de los individuos a los fármacos inmunomoduladores y para determinar una dosificación segura de administración de un fármaco inmunomodulador a los individuos.

20 El presente método con ratón humanizado también resulta útil en evaluaciones de seguridad farmacéutica de un candidato farmacológico. En particular, el método divulgado proporciona una prueba preclínica mejorada en animales de la inmunotoxicidad de un candidato farmacológico en seres humanos.

25 Los métodos para determinar la inmunotoxicidad del fármaco divulgada en el presente documento tiene las ventajas de una capacidad para detectar una variación individual en la respuesta a un fármaco inmunomodulador o combinación de fármacos inmunomoduladores determinados, mayor precisión en la predicción de respuesta que los métodos de la técnica anterior, tales como los métodos *in vitro* de cultivo de células PBMC, un requisito para cantidades moderadas solo (100 ml o menos) de sangre extraída de un individuo para someter a prueba, disponibilidad en el mercado de ratones inmunodeficientes adecuados y un tiempo de recambio de menos de dos semanas.

30 Con respecto a la prueba preclínica de inmunotoxicidad de fármacos potenciales, el método tiene todas las ventajas anteriores y proporciona además un método sensible para valorar el grado de inmuoestimulación que un candidato farmacológico inducirá después de la administración, lo que permitirá ahorros de tiempo y costes en el desarrollo de fármacos al permitir una eliminación temprana de candidatos farmacológicos que inducen grados inaceptablemente elevados de inmuoestimulación (p. ej., liberación de citocinas inducida por la administración de dichos candidatos farmacológicos en seres humanos).

35 De manera ventajosa, como se discute adicionalmente en el presente documento, se ha encontrado que este sistema de valoración es predictivo de las respuestas *in vivo* y representa una herramienta poderosa en investigación y evaluaciones de seguridad farmacéutica. Las pruebas clínicas actuales de nuevos candidatos farmacológicos en sujetos humanos voluntarios suelen dar por resultado el fracaso de fármacos. El fracaso es porque las toxicidades no se expusieron en los estudios preclínicos en gran medida debido a la escasez de modelos animales *in vivo* existentes. Hay una necesidad insatisfecha sentida desde hace tiempo de un modelo animal *in vivo* que pueda predecir de manera precisa los efectos adversos de un candidato farmacológico potencial. El presente modelo de ratón humanizado resulta útil como una plataforma de cribado de fármacos con un alto grado de precisión para identificar a partir de un gran número de candidatos farmacológicos clínicamente relevantes los candidatos farmacológicos potenciales que desencadenen la liberación de citocinas. De este modo, los presentes métodos representan valoraciones consistentes de predicción para pruebas de inmunotoxicidad del fármaco, que proporcionan un vínculo necesario entre pruebas preclínicas y clínicas. La integración de la presente valoración en programas de desarrollo de fármacos debería acelerar el procedimiento de aprobación de fármacos, tal como ante la FDA, para el desarrollo de fármacos terapéuticos.

40 Por lo tanto, se divulga un método para determinar si un fármaco inmunomodulador causa toxicidad inmunitaria en un ser humano. En otras palabras, el presente método puede servir como una valoración de cribado para pacientes individuales que deben recibir un fármaco inmunomodulador si aquel paciente es seguro para recibir dicho fármaco inmunomodulador. El método puede comprender: recolectar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un sujeto humano; administrar el fármaco inmunomodulador (p. ej., mAb) a un mamífero no humano inmunodeficiente que se ha irradiado e injertado con las PBMC recolectadas de aquel individuo (p. ej., ratón inmunodeficiente humanizado); y detectar una o más citocinas (ejemplificadas con IFN- γ y/o IL-10) liberadas; y, por consiguiente, determinar si el fármaco inmunomodulador causa una toxicidad inmunitaria, en donde si el fármaco inmunomodulador desencadena una tormenta de citocinas intensa en el mamífero no humano, a continuación el fármaco inmunomodulador causa toxicidad inmunitaria en aquel individuo.

45 Hay una necesidad insatisfecha sentida desde hace tiempo de un método confiable con ratón *in vivo* para que los facultativos determinen el CRS potencial en sujetos humanos antes de la administración de un fármaco inmunomodulador. Idealmente, el método debería determinar de manera precisa cuál de los sujetos humanos que reciben el fármaco inmunomodulador padecería eventos adversos de CRS grave. Como se informó en marzo del 2006, discutido anteriormente, durante el ensayo en seres humanos en el Northwick Park Hospital que implicó el mAb TGN1412, seis voluntarios en el ensayo se hospitalizaron debido a los eventos adversos. Muchos de los pacientes padecieron

angioedema, hinchazón de la piel y de las membranas mucosas seguido de disfunción multiorgánica, aunque el trabajo preclínico de ese ensayo no mostró sugerencia de CRS en un modelo de rata o en macacos de Java (*Macaca fascicularis*) o en valoraciones *in vivo* de cultivo celular de PBMC humanas. No obstante, los presentes inventores descubrieron que ciertos pacientes pueden tener o no eventos adversos de CRS grave para un fármaco inmunomodulador determinado y, por lo tanto, divulgan un método para determinar de antemano si un paciente en particular puede padecer CRS si se le administra un fármaco en particular.

El síndrome de liberación de citocinas ocurre con la activación de células T y células citolíticas naturales (NK), así como también otras poblaciones de células inmunitarias (p. ej., macrófagos, etc.). Con la adición de inmunomoduladores, la activación de las células T y las células citolíticas naturales puede provocar la liberación de valores elevados de citocinas, daño posterior y posible muerte. Si bien la función de la activación de células T ha recibido mucha atención debido al ensayo clínico con TGN1412, también se ha demostrado que la activación de linfocitos NK es una fuente del síndrome de liberación de citocinas en respuesta a ciertos inmunomoduladores. Por ejemplo, se demostró que el tratamiento con CAMPATH 1-H, un anticuerpo anti CD52, implicaba células NK, con la liberación de valores elevados de TNF, IFN- γ e IL-6 *in vivo* (Wing M.G. *et al.* (1995) *Ther. Immunol.* 2:183-190), y se demostró que la toxicidad resultante del tratamiento con la combinación de IL-2 e IL-12 era el resultado de la activación de células citolíticas naturales, pero no células B o T (Carson W.E., (1999) *J Immunol* 162:4943-4951). Con diferentes inmunomoduladores y la activación de diversas poblaciones de células inmunitarias, el síndrome de liberación de citocinas se puede manifestar con valores elevados de liberación de citocinas que puede variar con las diversas poblaciones de células inmunitarias activadas.

Los presentes inventores se dieron cuenta de que, en este sistema biológico complejo, muchas variables tendrían que elegirse y optimizarse con cuidado antes de que un modelo de ratón pueda proporcionar una predicción precisa del CRS inducido por fármacos. Desgraciadamente, en el presente hay pocas guías en la técnica en cuanto a qué variables se deberían seleccionar o cómo se deberían optimizar. Dada la naturaleza altamente intrincada y compleja del sistema, se requiere de un equilibrio delicado entre estas variables con el fin de que un modelo de ratón proporcione una predicción precisa y útil del CRS inducido por fármacos.

Los presentes inventores descubrieron que el número de células humanas (es decir, el número de PBMC administradas al ratón) y la distribución de los tipos de células humanas presentes en el ratón (que cambia con el tiempo después del injerto) son variables críticas en el sistema. Se descubre que, cuando las PBMC se inyectan en un ratón, solo las células T humanas pueden expandirse; los otros tipos de células humanas, p. ej., células NK y células B, comenzarán a extinguirse. Se descubre además que, cuando la cifra de células T humanas se eleva demasiado en el ratón, ellas causarán la GVHD que se manifiesta mediante pérdida de peso corporal, postura encorvada, pérdida de pelo, movilidad reducida, taquipnea y muerte posterior. Cuando un ratón exhibe una GVHD grave, la precisión de los resultados de pruebas se ve gravemente afectada.

Sin estar ligado a ninguna teoría, se descubre de manera inesperada que las células T del ser humano adulto en las PBMC reconocen al ratón como un extraño y empiezan a atacar al ratón, lo que causa problemas de salud para el ratón y una posible muerte, con la liberación de citocinas concomitante. Cuando esto sucede, el ratón empieza a padecer una pérdida de peso significativa y exhibe síntomas de enfermedad que vuelven el modelo de ratón impreciso para determinar el CRS.

Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que el injerto de demasiadas PBMC aumenta el perfil de liberación de citocinas en el ratón, de manera tal que el método proporciona una predicción imprecisa (es decir, es propenso a proporcionar un falso positivo). Se observa que, cuando el número de PBMC injertadas excede 5×10^7 PBMC/ratón, algunos ratones padecen una pérdida de peso significativa, probablemente debido a la GVHD (enfermedad del injerto contra el hospedador), muy rápidamente después del injerto. Cuando los ratones tienen la GVHD, la respuesta de liberación de citocinas en estos ratones, inducida por un fármaco inmunomodulador, no puede determinar de manera precisa la respuesta del sujeto humano al fármaco inmunomodulador. Alternativamente, cuando el número de PBMC injertadas está por debajo de cierto umbral (p. ej., $<1 \times 10^7$ /ratón), el método tampoco puede determinar la respuesta del sujeto humano a un fármaco inmunomodulador con sensibilidad óptima y proporcionará un falso negativo. Asimismo, los ratones son irradiados mediante rayos X para destruir el sistema inmunitario del ratón antes del injerto para minimizar el rechazo y maximizar la supervivencia de las PBMC humanas inyectadas.

Por consiguiente, los presentes inventores han determinado que el número de PBMC injertadas y el tiempo de injerto de PBMC antes de la administración del fármaco inmunomodulador son críticos para la precisión óptima de la valoración al equilibrar la presencia de una población suficiente y la distribución de células inmunitarias humanas en el ratón frente al inicio de la GVHD en el ratón.

El modelo de ratón humanizado con PBMC, a diferencia de los modelos más precoces de ratón humanizado con BLT (médula ósea/hígado/timo) o células precursoras, se ha considerado en la técnica para que sea un modelo de células T solamente, puesto que, cuando las PBMC humanas se inyectan en el organismo del ratón, solo la población de células T puede expandirse, mientras que los otros tipos de células humanas se extinguen con el tiempo. En la técnica, los ratones humanizados con PBMC normalmente se han usado después de 10 días del injerto con PBMC, con un número de injerto de PBMC de normalmente 1 a 10 millones de células por ratón, lo que requirió que en la investigación se esperara a que la población de células T se expandiera a una cantidad suficientemente grande para hacer el experimento. Normalmente,

el 10 % de las células CD45 humanas o CD3 humanas presentes en la población de células del ratón se ha usado como el patrón para el número mínimo de células humanas. No obstante, los presentes inventores han determinado que, con el fin de que el modelo de ratón humanizado con PBMC proporcionara pruebas óptimas de toxicidad farmacológica, no solo las células T no necesarias en el ratón, sino también otros tipos de células, especialmente células NK y monocitos.

Por consiguiente, la presente divulgación satisface una necesidad insatisfecha sentida desde hace tiempo y está dirigida a un método *in vivo* para determinar si un fármaco inmunomodulador desencadena una respuesta de tormenta de citocinas (es decir, un síndrome de liberación de citocinas grave) en un individuo, tal como un ser humano, que comprende los pasos de: (a) recolectar o aislar PBMC de un humano individual que se está considerando para recibir un fármaco inmunomodulador; (b) injertar $1,5 \times 10^7$ - $3,0 \times 10^7$ PBMC recolectadas/aisladas en un ratón inmunodeficiente (NSG, NSG-IL-6 o NSG-CSF-1) que ha recibido irradiación (p. ej., para inhibir funcionalmente las células inmunitarias del ratón para atacar las PBMC injertadas); (c) administrar al ratón inmunodeficiente injertado el fármaco inmunomodulador 5-7 días, preferentemente 6, después del injerto; (d) detectar la presencia de una o más citocinas liberadas después de la administración; y (e) evaluar si la respuesta de citocina al fármaco inmunomodulador en comparación con un agente de control (p. ej., mAb de control) para determinar si la liberación de citocinas en el ratón al determinar la concentración sanguínea en el ratón de una pluralidad de citocinas que comprende IFN- γ e IL-10 es de un valor que indica un síndrome de liberación de citocinas grave.

El método puede comprender injertar $1,5 \times 10^7$ - $3,0 \times 10^7$ PBMC aisladas de un ser humano en un ratón inmunodeficiente irradiado (p. ej., NSG, NSG-IL-6 o NSG-CSF-1); administrar un fármaco inmunomodulador al ratón inmunodeficiente injertado 5-7 días, preferentemente 6, después del injerto; detectar la cantidad de una o más citocinas liberadas después de la administración; y determinar que el fármaco inmunomodulador probablemente desencadene un síndrome de liberación de citocinas grave en el ser humano en donde la presencia de un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ratón es indicativa de que la administración de dicho fármaco inmunomodulador probablemente desencadene un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ser humano. El presente método puede comprender además proporcionar el ratón inmunodeficiente irradiado, dicho ratón se irradia con 75-125 cGy de rayos X, o aislar las PBMC del ser humano o comparar las cantidades de citocinas liberadas después de la administración del fármaco con la cantidad liberada después de la administración de un agente de control negativo. Los ejemplos de un agente de control negativo adecuado incluyen un tampón o un mAb de control de isotipo. La citocina detectada puede ser IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-2, IL-4, TNF, o una combinación de lo anterior, preferentemente la citocina es IFN- γ o IL-10. La presente valoración posibilita que un facultativo diferencie (o identifique) qué paciente(s) humano(s) padecerían probablemente un CRS grave en comparación otros que no padecerían un CRS grave.

Antes del injerto, el ratón deficiente inmunitario puede ser irradiado con 75-125 cGy de rayos X o 100 cGy de rayos X. La irradiación puede tener lugar al menos cuatro horas antes del injerto.

Los presentes inventores han establecido que las PBMC se pueden recolectar de un individuo (supuesto para recibir un fármaco inmunomodulador) y se pueden usar para injertar en un ratón inmunodeficiente (p. ej., NSG, NSG-IL-6 o NSG-CSF-1) para obtener un ratón humanizado para someter a prueba la toxicidad inmunitaria (es decir, liberación de citocinas) inducida por uno o más fármacos mediante la valoración divulgada en el presente documento. De manera ventajosa, el presente inventor ha encontrado sorpresivamente que este sistema de valoración es predictivo de las respuestas *in vivo* en un paciente humano que recibiría la administración de un fármaco inmunomodulador.

Hay una variedad de citocinas humanas que se pueden usar en los descritos en el presente documento. Se conocen muchas citocinas inflamatorias que se liberan durante el síndrome de liberación de citocinas, incluidas IFN- γ , IL-1 β , TNF, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12. Se cree que algunas citocinas tienen más importancia significativa que otras en la determinación del síndrome de liberación de citocinas. Puede resultar especialmente apropiado incluir IFN- γ y/o IL-10 como citocinas predictivas para determinar una respuesta de CRS (Teachey DT, *et al.* Cancer Discov. 2016 Jun;6(6):664-79. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0040. Epub 13 de abril del 2016).

Los presentes inventores descubrieron que la IFN- γ y/o IL-10 en la sangre del ratón humanizado se puede usar para predecir de manera confiable la gravedad del CRS que puede esperarse en un sujeto. Los valores de IFN- γ y los valores de IL-10 en ratones humanizados con PBMC son elevados en comparación con otros valores de citocinas después de la inducción mediante un fármaco inmunomodulador y en comparación con seres humanos. Está contemplado que se pueden usar otros anticuerpos para ayudar a determinar la gravedad de la respuesta potencial.

Los presentes inventores han descubierto que los donantes cuyo valor de IFN- γ en la sangre del ratón humanizado era de o superior a 1800 pg/ml y/o el valor de IL-10 era de o superior a 120 pg/ml, 6 horas después de la administración de un fármaco inmunomodulador al ratón, tal como anti-CD28 (ANC28.1/5D10), probablemente desarrollaran un CRS grave (p. ej., grado 4-5) si el fármaco debía administrarse a aquel sujeto humano. Los donantes cuyo valor de IFN- γ estaba entre 300 pg/ml y 1800 pg/ml, y/o cuyo valor de IL-10 estaba entre 25 pg/ml y 120 pg/ml en la sangre del ratón humanizado, probablemente desarrollaran un CRS modesto (CRS de grado 1-3 de desarrollo) (pero no CRS grave) después de recibir el fármaco inmunomodulador. Los donantes cuyo valor de IFN- γ era inferior a 300 pg/ml y/o el valor de IL-10 era inferior a 25 pg/ml en la sangre del ratón humanizado probablemente no desarrollaran el CRS después de recibir el fármaco inmunomodulador (Teachey DT, *et al.* 2016; Weißmüller et al., PLoS One DOI:10.1371/journal.pone.0149093 Marzo del 2016).

Los métodos pueden usar de 15 millones a 30 millones de PBMC humanas recolectadas/aisladas por ratón a partir de un donante/sujeto e injertar las PBMC en el ratón deficiente inmunitario para obtener un ratón inmunodeficiente humano, como se discute a continuación. En ciertas formas de realización preferidas, se usaron de 15 millones a 25 millones de PBMC humanas recolectadas/aisladas por ratón. En ciertas formas de realización preferidas, se usaron 20 millones de PBMC humanas recolectadas/aisladas por ratón. De 5 a 7 días después del injerto, se administra un fármaco inmunomodulador al ratón y se mide la concentración de citocinas humanas en el ratón para determinar si la liberación de citocinas de IFN- γ e IL-10 es la de una "respuesta intensa o elevada", "respuesta media o baja" o "ninguna respuesta", como predictor o determinante de si el donante/sujeto en particular exhibirá el síndrome de liberación de citocinas (CRS) después de la administración del fármaco inmunomodulador. La "respuesta intensa/elevada" se mide como un valor de IFN- γ igual a o superior a 1800 pg/ml y un valor de IL-10 igual a o superior a 120 pg/ml a las 6 horas después de administrar el fármaco inmunomodulador al ratón humanizado. La IFN- γ y la IL-10 se miden porque se han identificado como las más predictivas de si ocurrirá el síndrome de liberación de citocinas o la tormenta de citocinas. Los inventores demostraron que, al usar el presente sistema de valoración *in vivo*, diferentes PBMC de donantes humanos injertadas en ratones inmunodeficientes responden de manera diferente a los agentes que inducen el CRS.

En los presentes métodos, si el sujeto es un "respondedor bajo/no respondedor" en el método de modelo de ratón humanizado, probablemente no desencadenará una respuesta de citocinas tras la administración del fármaco inmunomodulador, en cuyo caso es seguro administrar el fármaco inmunomodulador al individuo. Por lo tanto, los fármacos inmunomoduladores que anteriormente no estaban disponibles para el uso en el tratamiento, debido a la posibilidad de tener efectos extremadamente adversos de la tormenta de citocinas, de hecho, se pueden usar en un individuo en particular, si aquel individuo está determinado a ser un "respondedor bajo/no respondedor" usando los presentes métodos. Si aquel individuo está determinado, mediante los presentes métodos, a tener una respuesta de IFN- γ e IL-10 intensa/elevada a un fármaco inmunomodulador usando los ratones humanizados con las PBMC del individuo, aquel individuo probablemente desencadene una respuesta de tormenta de citocinas y a continuación no es seguro administrar el fármaco inmunomodulador al individuo.

En los presentes métodos, se usan ratones deficientes inmunitarios (también conocidos como ratones inmunodeficientes). Los ratones NSG son una cepa de ratones de laboratorio endogámicos que son inmunodeficientes. Los ratones NSG carecen de células T, células B y células citolíticas naturales (NK) maduras, o una combinación de las mismas. Los ratones NSG también son deficientes en múltiples vías de señalización de citocinas y tienen muchos defectos en la inmunidad innata. Las inmunodeficiencias compuestas en los ratones NSG permite el injerto de un amplio rango de células humanas primarias para obtener ratones humanizados y posibilita el modelado sofisticado de muchas áreas de la biología y enfermedad humanas. Los presentes inventores descubrieron que los ratones NSG tienen respuestas similares que las de los ratones NSG-CSF-1 y NSG-IL-6. Como se usa en el presente documento, las expresiones "ratón humanizado", "ratón deficiente inmunitario humanizado", "ratón inmunodeficiente humanizado", y las versiones en plural de las mismas se usan de manera indistinta. Por consiguiente, el uso de una de estas expresiones debería interpretarse que abarca a todas.

En ciertas opciones, el mamífero no humano es un ratón genéticamente modificado que carece de un sistema inmunitario (es decir, un ratón inmunodeficiente humanizado). Los ejemplos de un ratón inmunodeficiente incluyen, entre otros, NSG (es decir, NOD scid gamma (ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wj1}/SzJ), NSG-CSF-1, NSG-IL-6, y similares. La presente invención pretende abarcar otros ejemplos específicos de ratones inmunodeficientes. El ratón inmunodeficiente preferentemente carece de sus propias células T, células B, células NK o una combinación de las mismas. Como resultado, se espera que el ratón inmunodeficiente permita el injerto de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas sin un rechazo inmediato del injerto contra el hospedador.

Aunque se puede usar una valoración *in vivo* anterior para demostrar una señal de citocina inducida por fármacos, los presentes inventores hipotetizaron que, debido a que las valoraciones anteriores no consideran la criticidad de los números de células del donante, así como tampoco sus cambios inmunológicos dinámicos (p. ej., suficientes células CD3 y células NK circulantes, así como también la presencia de GVHD) en los animales examinados, las valoraciones de la técnica anterior son susceptibles de producir respuestas de falsos positivos y falsos negativos. Lo anterior puede ser debido a muchas células del donante (es decir, células CD3 y células NK), y por consiguiente vuelve la valoración demasiado sensible -y no se rinde una predicción precisa de liberación de citocinas. Lo último puede ser debido a muy pocas células del donante (es decir, células CD3 y células NK), que también vuelve la valoración demasiado sensible -y no se rinde una predicción precisa de liberación de citocinas. Para complicar el asunto, demasiadas células CD3 pueden causar el mecanismo de defensa de injerto contra el hospedador que funciona en los animales sometidos a prueba, lo que hace que el modelo de ratón sea inadecuado para cribar la liberación de citocinas.

La presente divulgación cura la necesidad insatisfecha sentida desde hace tiempo de proporcionar una valoración de cribado *in vivo* que determine de manera precisa el CRS grave en sujetos humanos. Esto se logra al ajustar las cantidades de PBMC injertadas y el tiempo de administrar un fármaco después del injerto de PBMC.

Como es apreciado por los expertos en la técnica, hay muchas maneras adecuadas de recolectar y aislar PBMC. También hay muchas maneras adecuadas de introducir las PBMC en un ratón inmunodeficiente, que incluye a modo de ejemplo no limitativo, por vía intravenosa y por vía intracardíaca.

Los presentes inventores han establecido que las PBMC se pueden recolectar de un humano individual (supuesto para recibir un fármaco inmunomodulador) y a continuación se pueden usar para injertar en un ratón inmunodeficiente (p. ej., NSG, NSG-IL-6 o NSG-CSF-1) para someter a prueba la toxicidad (es decir, liberación de citocinas) mediante la valoración divulgada en el presente documento. De manera ventajosa, los presentes inventores han encontrado que este sistema de valoración es predictivo de las respuestas *in vivo* en el paciente humano que proporciona las PBMC, quien recibiría la administración de un fármaco inmunomodulador.

Sin estar comprometidos con una teoría, se cree que demasiadas PBMC pueden mejorar la sensibilidad del perfil de liberación de citocinas, de manera que se sobrepasa para proporcionar una predicción imprecisa (es decir, proporciona muchos falsos positivos). Se observa que, cuando el número de PBMC excede 5×10^7 PBMC/ratón, algunos ratones padecen una pérdida de peso significativa, probablemente debido a la GVHD (enfermedad del injerto contra el hospedador). Cuando esto sucede, la respuesta de liberación de citocinas en estos ratones, inducida por el fármaco inmunomodulador, no puede determinar de manera precisa el CRS en el sujeto humano. Alternativamente, cuando el número de PBMC administradas está por debajo de cierto umbral (p. ej., $<1 \times 10^7$ /ratón), el método tampoco puede determinar un CRS con una sensibilidad óptima (es decir, proporciona muchos falsos negativos).

En las opciones de ejemplo de los métodos divulgados actualmente, al menos cuatro horas antes de injertar las PBMC aisladas al ratón deficiente inmunitario, el ratón se irradia con 100 cGy de rayos X (o 75 cGy de rayos X - 125 cGy de rayos X). La irradiación puede ocurrir después, antes o en simultáneo con el paso de recolectar y aislar las PBMC de un ser humano. Se cree que, al usar la irradiación, las células T se expandirán más rápido en ratones NSG. Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que la irradiación mejora el injerto de células humanas. Aunque el mecanismo exacto no es aún claro, la irradiación puede provocar mieloablación, que destruye las células inmunitarias del ratón, aumenta los factores de supervivencia de la PBMC humana y acelera la expansión de células T humanas. La irradiación también induce la muerte celular (apoptosis) de las células inmunitarias del ratón en la sangre periférica, bazo y médula ósea, lo que permite que las células inmunitarias humanas aumentadas vayan a la médula ósea. Sin irradiación, llevaría más tiempo conseguir suficientes células inmunitarias humanas para realizar los presentes métodos. No obstante, con el tiempo, las PBMC humanas perderán algunos tipos de células, por ejemplo, células NK y monocitos, porque estos tipos de células no pueden crecer en ratones, y solo sobreviven durante algunos días y se extinguen. Las células NK y mieloides se recambian más rápidamente que las células CD3 en general; no obstante, la corta supervivencia de células NK y células mieloides en los ratones se debe a la falta de factores, tales como la IL-15, que estimula su supervivencia. Con o sin irradiación, las células K deberían perderse el día 10 después del injerto de PBMC debido a la corta supervivencia de células NK (y células mieloides). Solo las células T se pueden expandir en ratones NSG. La valoración necesita tantos tipos de células inmunitarias humanas para someter a prueba la toxicidad como sea posible. Por lo tanto, el período de tiempo con la población óptima de células inmunitarias humanas injertadas y antes del inicio de la GVHD grave, p. ej., 5-7 días para el presente método con injerto de $1,5 \times 10^7$ a $3,0 \times 10^7$ PBMC, es importante de manera crítica para lograr una sensibilidad óptima mientras se minimizan los falsos negativos.

En ciertas opciones, la presente divulgación se refiere a injertar un rango específico de PBMC humanas (de $1,5$ a $3,0 \times 10^7$ /ratón) a un ratón inmunodeficiente. En ciertas opciones preferidas, el número de PBMC humanas injertadas es 2×10^7 /ratón.

Los presentes inventores también descubrieron que, cuando una PBMC de un individuo en particular se injerta en un ratón inmunodeprimido irradiado, y a continuación se administra un fármaco inmunomodulador al ratón durante un período de tiempo crítico después de dicho injerto (p. ej., 5-7 días más tarde) (preferentemente, 6 días más tarde), a continuación la respuesta de citocinas se puede medir usando IFN- γ y/o IL-10 para determinar si aquel ser humano en particular es un "respondedor elevado" o "intenso", que significa que el sujeto probablemente desencadenará una respuesta masiva de liberación de citocinas, tal como un síndrome de liberación de citocinas, que puede ser potencialmente letal para el ser humano y, por lo tanto, no debería administrarse el fármaco inmunomodulador.

Ciertos agentes de activación de células T, en particular anticuerpos monoclonales (mAb) que se ocupan del receptor de antígeno de células T (TCR), tal como ORTHOCLONE OKT@3 ("OKT3"), un anticuerpo monoclonal (mAb) murino que fue el primer mAb usado en la consulta para inmunodepresión, pueden inducir la liberación sistémica de citocinas proinflamatorias (Abramowicz D. *et al.*, Transplantation, 1989 Apr;47(4):606-8). Los más peligrosos de estos son TNF, interferón γ (IFN- γ) e IL-2. En pacientes que reciben terapias con mAb, el control de dicho síndrome de liberación de citocinas o "tormenta de citocinas" se logra de manera rutinaria mediante un tratamiento con corticoesteroides de dosis altas. ORTHOCLONE OKT@3 es una marca registrada para muromonab-CD3, un fármaco inmunodepresor que se da por vía intravenosa para revertir el rechazo agudo de órganos trasplantados, incluidos el corazón, los riñones y el hígado. OKT3 actúa al bloquear la función de las células T que desempeñan una tarea importante en el rechazo agudo del injerto. OKT3 reacciona con y bloquea la función de una molécula denominada CD3 en la membrana de la célula T. La unión de OKT3 al linfocito T da por resultado su pronta activación, provoca la liberación de citocinas, seguido del bloqueo de las funciones de las células T. Es un fármaco inmunodepresor que es un inductor potente del CRS. El anticuerpo anti-CD28, ANC28.1/5D10, es un inductor débil del CRS. Otros anticuerpos y agentes inmunomoduladores se pueden usar en los presentes métodos, incluidos los candidatos farmacológicos en desarrollo.

Los ejemplos de fármacos inmunomoduladores incluyen, entre otros, un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD28, un mAb anti-CD3, un mAb anti-CD20, un mAb anti-CD52; factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); un interferón; imiquimod; talidomida y sus derivados o análogos, tales como lenalidomida (REVLIMID®), pomalidomida (IMNOVID®) y apremilast; azatioprina, cladribina, ciclofosfamida, inmunoglobulina intravenosa, metotrexato, mitoxantrona; IMLYGIC™ (talimogeno laherparepvec); adalimumab (HUMIRA®), catumaxomab (REMOVAB®), ibritumomab tiuxetano (ZEVALIN®), tositumomab-¹³¹I (BEXXAR®), brentuximab vedotina (ADCETRIS®), betuximab (ERBITUX®), rituximab (MABTHERA® o RITUXAN®), alemtuzumab (CAMPATH-1H®, CAMPATH® o LEMTRADA®), bevacizumab (AVASTIN®), pertuzumab (PERJETA®), trastuzumab (HERCEPTIN®), trastuzumab emtansinen (KADCYLA™), denosumab (PROLIA® o XGEVA®), ofatumumab (ARZERRA®), panitumumab (VECTIBIX®), pembrolizumab (KEYTRUDA®), nivolumab (OPDIVO®), ipilimumab (YERVOY®), atezolizumab (TECENTRIQ®), avelumab (BAVENCIO®), durvalumab (IMFINZI®), daratumumab (DARZALEX®), ceritinib (ZYKADIA®) e inmunoglobulinas antitímocíticas (THYMOGLOBULIN® (de conejo) o ATGAM® (equina)).

Por consiguiente, en ciertas opciones, el fármaco inmunomodulador es un anticuerpo terapéutico. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Los anticuerpos monoclonales (mAb) pueden incluir, entre otros, TGN1412 (mAb anti-CD28) (TAB08), OKT3 (mAb anti-CD3), RITUXAN® (rituximab) (mAb anti-CD20), LEMTRADA® (alemtuzumab, también comercializado como CAMPATH®) (mAb anti-CD52), KEYTRUDA® (pembrolizumab), OPDIVO® (nivolumab), YERVOY® (ipilimumab), ZYKADIA® (ceritinib), TECENTRIQ® (atezolizumab), BAVENCIO® (avelumab), IMFINZI® (durvalumab), y similares. En otras formas de realización, el fármaco inmunomodulador puede ser un fármaco de molécula de bajo peso molecular, tal como REVLIMID® (lenalidomida); un anticuerpo policlonal, tal como inmunoglobulinas antitímocíticas; o un fármaco biológico, tal como una proteína, tal como un interferón.

Como será apreciado por los expertos en la técnica, el fármaco inmunomodulador se puede administrar al mamífero inmunodeficiente no humano usando una variedad de vías de administración. Las vías de administración ejemplares incluyen, entre otros, vías de administración intravenosa, intrafemoral, intraventricular, intracardiaca, intraperitoneal, y similares. La vía de administración preferida es la infusión intravenosa.

Sin comprometerse con una teoría en particular, se cree que las células predominantes presentes en un ratón inmunodeficiente humanizado el día 5-7 después de injertar el ratón con PBMC humanas se pueden someter a prueba para toxicidad del síndrome de liberación de citocinas o tormenta de citocinas tras la administración de un fármaco inmunomodulador. La prueba depende de factores que incluyen el número de células PBMC y la proporción de PBMC humanas después de la inyección. Se cree que el equilibrio de tipos de células y número (cantidad) de células de las células administradas es importante para determinar el síndrome de liberación de citocinas. Por ejemplo, como se muestra en la FIG. 2B, las células NK (CD56) eran aproximadamente un 20-30 % de las células CD45 presentes y disminuyeron al 1-5 % el día 10 después del injerto. Por lo tanto, el día 10, los tipos de células predominantes en estos ratones humanizados con PBMC son las células T, y los ratones humanizados con PBMC no tienen muchos otros tipos de células humanas y no son un buen modelo para la prueba de toxicidad.

Se divulga un método para determinar si un fármaco inmunomodulador probablemente desencadene un síndrome de liberación de citocinas (CRS), un SIRS o una tormenta de citocinas (un caso grave de CRS) en un humano individual tras la administración de un fármaco inmunomodulador al individuo. De acuerdo con las formas de realización de ejemplo, el método incluye los pasos siguientes:

- (a) proporcionar un ratón inmunodeficiente, dicho ratón se irradia con 75-125 cGy de rayos X;
- (b) injertar $1,5-3,0 \times 10^6$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un ser humano a dicho ratón;
- (c) administrar a dicho ratón un fármaco inmunomodulador 5-7 días después de injertar;
- (d) determinar la concentración sanguínea en dicho ratón de una pluralidad de citocinas que comprenden IFN- γ e IL-10, en donde la concentración sanguínea de IFN- $\gamma \geq 1800$ pg/ml e IL-10 ≥ 120 pg/ml es indicativa de un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ratón; y
- (e) determinar que dicho fármaco inmunomodulador probablemente desencadene un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ser humano, en donde la presencia de un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ratón es indicativa de que la administración de dicho fármaco inmunomodulador probablemente desencadene un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ser humano.

También se divulga un método para determinar si un fármaco inmunomodulador probablemente desencadene un síndrome de liberación de citocinas (CRS), un SIRS o una tormenta de citocinas (un caso grave de CRS) en un humano individual tras la administración de un fármaco inmunomodulador al individuo. De acuerdo con las formas de realización de ejemplo, el método incluye los pasos siguientes:

- (a) aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un ser humano;
- (b) injertar 2×10^7 de dichas PBMC aisladas a un ratón inmunodeficiente irradiado;
- (c) administrar a dicho ratón un fármaco inmunomodulador 5-7 días después de injertar;
- (d) determinar la concentración sanguínea en dicho ratón de una pluralidad de citocinas que comprenden IFN- γ e IL-10,

en donde la concentración sanguínea de IFN- γ ≥ 1800 pg/ml e IL-10 ≥ 120 pg/ml es indicativa de un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ratón, y

en donde la presencia de un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ratón es indicativa de que la administración de dicho fármaco inmunomodulador probablemente desencadene un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ser humano.

De acuerdo con algunas opciones, el método puede incluir además

(e) determinar si el ser humano es apto para una terapia con el fármaco inmunomodulador,

en donde el síndrome de liberación de citocinas grave desencadenado en el ratón es indicativo de que el ser humano no es apto para una terapia con el fármaco inmunomodulador.

Si las concentraciones de las citocinas IFN- γ e IL-10 en respuesta al fármaco inmunomodulador en el modelo de ratón se miden como "intensas/elevadas", el fármaco inmunomodulador probablemente desencadene un síndrome de liberación de citocinas grave o una tormenta de citocinas, y el ser humano no es apto para terapia. Si un ser humano no se considera apto para terapia con aquel fármaco inmunomodulador en particular, se pueden tratar otro anticuerpo o quimioterapia u otras drogas para el tratamiento del individuo/paciente.

Si las concentraciones de IFN- γ e IL-10 exhiben "respuesta baja /ninguna respuesta" o "respuesta baja", entonces el ser humano individual es apto para terapia con el fármaco inmunomodulador. La determinación de "ninguna respuesta" frente al extremo bajo de "respuesta baja" puede ser difícil de discernir y puede depender de la sensibilidad de la valoración, pero puede no ser necesario establecer una línea divisora en este extremo del espectro de respuesta, dado que ambos "ninguna respuesta" y "respuesta baja" indican que el ser humano es apto para terapia.

Como se describe en el presente documento, los ratones injertados humanizados se inyectaron con diferentes fármacos inmunomoduladores, tales como diversos anticuerpos terapéuticos que incluyen, p. ej., mAb anti-CD28, OKT3 (mAb anti-CD3), y se observaron los efectos de los anticuerpos en los ratones humanizados. Los ratones tratados con ambos anti-CD28 y OKT3 mostraron un aumento significativo de las citocinas inflamatorias principales con respecto a ciertos individuos/muestras. La administración a ratones no humanizados no indujo las respuestas de citocina. Estos hallazgos muestran que los ratones humanizados injertados con PBMC pueden determinar la toxicidad inmunitaria de ciertos fármacos para un sujeto/individuo en particular.

El presente método comprende administrar un fármaco inmunomodulador a un mamífero no humano que se ha injertado con PBMC humanas y determinar si el fármaco inmunomodulador causa toxicidad en el mamífero no humano, en donde si el agente causa toxicidad en el mamífero no humano, entonces se cree que el agente causa toxicidad inmunitaria en un ser humano.

La toxicidad inmunitaria se refiere al efecto indeseable/involuntario de un agente en el funcionamiento del sistema inmunitario de un individuo. Véase, por ejemplo, Weir, A, *Journal of Immunotoxicology*, 5:3-10 (2008); Gribble, E J., *et al.*, *Expert Opinion Drug Metab Toxicol*, 3(2) (2007).

En algunos ejemplos, la toxicidad inmunitaria puede producir una tormenta de citocinas en un ser humano. La tormenta de citocinas, el síndrome de liberación de citocinas o la reacción a la infusión es un evento adverso que normalmente se ve tras la primera exposición a un agente (p. ej., un mAb terapéutico). Se caracteriza por la liberación sistémica de varias citocinas inflamatorias. Los síntomas varían de leves a graves, que incluyen fatiga, cefalea, urticaria, prurito, broncoespasmo, disnea, sensación de hinchazón de lengua o garganta, rinitis, náuseas, vómitos, rubor, fiebre, escalofríos, hipotensión, taquicardia y astenia. Véase, por ejemplo, Wing, M., *et al.* *Journal of Immunotoxicology*, 5:11-15 (2008) y Wang, H., *et al.*, *American Journal of Emergency Medicine*, 26:711-715 (2008).

Se describe un método para determinar si la administración de un (uno o más) agente causará el síndrome de liberación de citocinas en un individuo (p. ej., ser humano) que necesita del mismo. El método comprende administrar el agente a un mamífero no humano que se ha injertado con un cierto número de PBMC después de un cierto número de días y determinar el valor de una o más citocinas humanas en el mamífero inmunodeficiente no humano inducidas por el agente; y determinar si el agente causa el síndrome de liberación de citocinas en el mamífero no humano, en donde si el agente causa el síndrome de liberación de citocinas en el mamífero no humano, entonces el agente causará el síndrome de liberación de citocinas en el ser humano.

Los presentes inventores descubrieron que el número de días de someter a prueba un fármaco inmunomodulador después del injerto de PBMC en un ratón NSG, NSG-IL-6 o NSG-CSF-1 es esencial, en tanto que el número de días da por resultado una composición de células adecuada. El número de días puede variar en cierto modo en función de cuántas PBMC se injertan inicialmente en el ratón. Es decir, si se injertan más PBMC (dentro del presente rango), entonces el número de días antes de someter a prueba un fármaco inmunomodulador puede ser un poco más corto (nuevamente, dentro del presente rango) que si se injertan menos PBMC (dentro del presente rango). Se cree que los ratones sufren la enfermedad del injerto contra el hospedador (GVHD) puesto que las PBMC injertadas empiezan a matar a las células del ratón debido al reconocimiento alógeno de células inmunitarias de las células T del ser humano adulto en el ratón. Cuando esto sucede, el ratón empieza a padecer una pérdida de peso significativa y exhibe síntomas de enfermedad que vuelven

el modelo de ratón impreciso para determinar el CRS. En ciertas opciones, la presente invención proporciona la administración de un fármaco inmunomodulador 4-7 días o 5-7 días después del injerto de PBMC. En ciertas opciones preferidas, la presente invención proporciona la administración de un fármaco inmunomodulador 6 días después del injerto de PBMC.

Los presentes inventores compararon los grados de respuesta de IFN- γ e IL-10 en función del número de células inyectadas en cada ratón (20 millones de células por ratón frente a 50 millones de células por ratón) (véase las FIG. 9A-9B). El número de PBMC inyectadas en los ratones constituye un factor determinativo. Cuando se inyectó con un número elevado de PBMC (p. ej., 50 millones de PBMC por ratón), el ratón mostró muchas citocinas liberadas, la IFN- γ y la IL-10 aumentaron ≥ 1800 pg/ml y ≥ 120 pg/ml, respectivamente. Pero este donante (213) (usado en la FIG. 9) tuvo pocas citocinas liberadas cuando se inyectó con 20 millones de PBMC por ratón antes. Estos datos muestran que 20 millones de PBMC por ratón (o un rango de 15-30 millones de PBMC por ratón) se encuentra en un rango preferido para el cribado de pacientes. En conformidad con la presente invención, el rango de PBMC usado para detectar una tormenta de citocinas para un individuo en respuesta a un fármaco inmunomodulador se encuentra entre 15 millones y 30 millones de PBMC. Preferentemente, el rango de PBMC se encuentra entre 20 millones y 25 millones de PBMC. Más preferentemente, la concentración es de 20 millones de PBMC por ratón.

La presente divulgación proporciona un método *in vivo* mejorado para determinar la posibilidad de un fármaco inmunomodulador de causar un síndrome de liberación de citocinas (CRS) adverso en pacientes humanos.

De manera ventajosa, como se discute adicionalmente en el presente documento, los presentes inventores también encontraron que este sistema de valoración es determinativo de las respuestas *in vivo* y representa una herramienta poderosa en investigación y evaluaciones de seguridad farmacéutica. Las pruebas clínicas actuales de nuevos candidatos farmacológicos en sujetos humanos voluntarios suelen dar por resultado el fracaso de fármacos. El fracaso se debe a las toxicidades que no se expusieron en los estudios preclínicos en gran medida debido a la escasez de modelos animales *in vivo* existentes. Hay una necesidad insatisfecha sentida desde hace tiempo de un modelo animal *in vivo* que pueda predecir de manera precisa los efectos adversos de un candidato farmacológico potencial. El cribado de candidatos farmacológicos para convertirse en un candidato farmacológico terapéutico debe pasar tanto las pruebas preclínicas *in vitro* como *in vivo*.

Como también será apreciado por los expertos en la técnica, hay una variedad de maneras de introducir las PBMC en un mamífero no humano. Los ejemplos no limitativos de dichos métodos pueden incluir las vías de administración intravenosa, intrafemoral, intraventricular, intracardiaca. Preferentemente, las PBMC se introducen por vía intravenosa.

Los presentes inventores han descubierto que el tiempo de injerto de PBMC es crítico. En particular, se observó que el fármaco inmunomodulador se puede administrar en un marco de tiempo específico después del injerto del ratón con las PBMC del sujeto.

El día 3 después del injerto, hay número de células insuficientes. Los presentes inventores encontraron que el día 5 hay suficientes tipos de células humanas y el número de estas células humanas es óptimo para someter a prueba (% de CD45 humano >10 %). Pero el día 10, el número de células de muchos tipos de células (porcentaje de células totales viables) disminuye. Por ejemplo, las células NK disminuyeron del 20-30 % el día 5 al 1-5 % el día 10 (FIG. 2B y 2C). Por consiguiente, el presente método incluye administrar el fármaco al ratón humanizado entre los días 4 y 7, o entre los días 5 y 7, o el día 6 después del injerto.

Se cree que muchos tipos de célula linfóide, mieloide y potencialmente de otras células inmunitarias humanas son requeridas para participar en una respuesta de toxicidad inmunitaria, y esto incluye células T y células NK, que desempeñan una tarea importante. En el presente modelo de ratón humanizado con PBMC, los inventores encontraron que hay diferentes tipos de células humanas presentes en ratones en un punto temporal temprano. Las células T y las células NK humanas son una población de células predominantes en esos ratones el día 5 del injerto (FIG. 2 y FIG. 4A).

También se cree que, para una prueba de toxicidad óptima, se requiere de un valor crítico de células humanas en el ratón. Cuando las PBMC humanas se inyectan en un ratón, solo las células T pueden expandirse; otros tipos de células comenzarán a extinguirse con el tiempo. Se necesita un equilibrio intrincado entre el número de células (es decir, el número de PBMC administradas al ratón) y los tipos de células con el tiempo.

Adicionalmente, los presentes inventores descubrieron que los experimentos necesitan realizarse antes que los ratones desarrollen la enfermedad del injerto contra el hospedador (GVHD), que se manifiesta mediante la pérdida de peso corporal. Como se discute adicionalmente a continuación, después de 8 días, los inventores observaron una pérdida de peso significativa de muchos ratones humanizados, injertados con PBMC, que es indicativa de una enfermedad del injerto contra el hospedador (GVHD) grave. Generalmente se cree que las células T humanas en el ratón no pueden crecer siempre; ellas atacarán al ratón cuando el número de células T sea elevado, con la liberación de citocinas, y causarán la GVHD. Si los ratones tienen GVHD, esta afectará la precisión de los resultados de las pruebas, puesto que las citocinas se liberan cuando las células T humanas atacan las células del ratón (Ju XP *et al.* Transplantation. 1997;63(9):1307-1313.). Finalmente, los ratones morirán debido a la GVHD.

Los datos de los ejemplos de GVHD se representan en las FIG. 3A-3D. En la FIG. 3A y 3B, el injerto de PBMC de los donantes 4629 y 362 en un ratón causó una pérdida de peso corporal significativa tan pronto como el día 6 después de un injerto de 5×10^7 PBMC. La FIG. 3C muestra que para el donante 309, los ratones que recibieron 2×10^7 PBMC empezaron la pérdida de peso corporal después del día 8, mientras que la FIG. 3D muestra que los ratones que recibieron 3×10^7 PBMC del donante 358 empezaron la pérdida de peso corporal después del día 7.

Asimismo, estos ratones con GVHD se enfermaron después de 8 días y, por lo tanto, ya no fueron aptos para el estudio. Los presentes inventores no solo observaron pérdida de peso, también exhibieron postura encorvada, pérdida de pelo, movilidad reducida y taquipnea. Después de una pérdida de peso del 20 %, hubo que practicar la eutanasia en los ratones.

Por consiguiente, para garantizar que el ratón no padece la GVHD o está enfermo de otro modo, resulta crítico que el fármaco inmunomodulador se administre antes de los 8 días después de injertar con PBMC. Además, el fármaco no puede administrarse demasiado pronto porque pueden no ser suficientes células tan pronto como, p. ej., el día 3. Se necesita que haya suficientes células circulantes para que las pruebas sean precisas.

Por consiguiente, en vista de los factores anteriores, en ciertas opciones, el fármaco inmunomodulador se administra a los ratones 5-7 días después de injertar los ratones con PBMC. En algunas opciones preferidas, el fármaco inmunomodulador se administra a los ratones 6 días después de injertar con PBMC. Durante este periodo de tiempo, el ratón debería mantenerse en condiciones adecuadas, que incluyen satisfacer las necesidades básicas (p. ej., alimentos, agua, luz) del mamífero, como es conocido por los expertos en la técnica.

En los ejemplos expuestos a continuación, los inventores eligieron el día 6 para los experimentos de 10 donantes. Los métodos para medir la expresión aumentada de una o más citocinas proinflamatorias (humanas o del ratón) también son conocidos por los expertos en la técnica. Las citocinas proinflamatorias humanas incluyen IL-2, IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-4, interferón γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral α (TNF- α o "TNF"), IL-10, o una combinación de las mismas. La expresión aumentada de citocinas proinflamatorias se puede determinar según se describe en el presente documento mediante citometría de flujo.

Se divulga un método para determinar si una combinación de fármacos inmunomoduladores probablemente desencadene un síndrome de liberación de citocinas grave (CRS) en un ser humano tras la administración de la combinación de fármacos inmunomoduladores. En una opción, la combinación incluye un primer fármaco inmunomodulador y un segundo fármaco inmunomodulador. En otra opción, el método comprende proporcionar un ratón inmunodeficiente, dicho ratón se irradia con 75-125 cGy de rayos X; injertar $1,5-3,0 \times 10^7$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un ser humano al ratón inmunodeficiente para producir un ratón humanizado; administrar al ratón humanizado un primer fármaco inmunomodulador y un segundo fármaco inmunomodulador 5-7 días después de injertar con PBMC; determinar la concentración sanguínea en el ratón humanizado de una pluralidad de citocinas que comprenden IFN- γ e IL-10, en donde la concentración sanguínea de IFN- $\gamma \geq 1800$ pg/ml e IL-10 ≥ 120 pg/ml es indicativa de un síndrome de liberación de citocinas grave en dicho ratón; y determinar que la combinación de fármacos inmunomoduladores probablemente desencadene un síndrome de liberación de citocinas grave en el ser humano, en donde la presencia de un síndrome de liberación de citocinas grave en el ratón es indicativa de que la administración de la combinación de fármacos inmunomoduladores probablemente desencadene un síndrome de liberación de citocinas grave en el ser humano.

El número de PBMC injertadas por ratón puede ser 2×10^7 PBMC. El ratón inmunodeficiente puede ser un ratón NSG, un ratón NSG-IL-6 o un ratón NSG-CSF-1, preferentemente un ratón NSG. El ratón inmunodeficiente se puede irradiar antes del injerto con 100 cGy de rayos X. La administración de los fármacos se puede realizar 6 días después del injerto. La pluralidad de citocinas puede comprender además IL-2, IL-4, IL-6 o TNF. La concentración de citocinas se puede determinar para cada una de IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-2, IL-4 y TNF. La concentración sanguínea de la pluralidad de citocinas se determina de 2 a 6 horas, preferentemente 6 horas, tras la administración de dicha combinación de fármacos inmunomoduladores.

En una combinación ejemplar de múltiples fármacos inmunomoduladores, los fármacos inmunomoduladores se pueden seleccionar de manera independiente de entre un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD28, un mAb anti-CD3, un mAb anti-CD20, un mAb anti-CD52; factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); un interferón; imiquimod; talidomida y sus derivados o análogos, tales como lenalidomida (REVLIMID®), pomalidomida (IMNOVID®) y apremilast; azatioprina, cladribina, ciclofosfamida, inmunoglobulina intravenosa, metotrexato, mitoxantrona; IMLYGIC™ (talimogeno laherparepvec); adalimumab (HUMIRA®), catumaxomab (REMOVAB®), ibritumomab tiuxetano (ZEVALIN®), tositumomab-I¹³¹ (BEXXAR®), brentuximab vedotina (ADCETRIS®), betuximab (ERBITUX®), rituximab (MABTHERA® o RITUXAN®), alemtuzumab (CAMPATH-1H®, CAMPATH® o LEMTRADA®), bevacizumab (AVASTIN®), pertuzumab (PERJETA®), trastuzumab (HERCEPTIN®), trastuzumab emtansinen (KADCYLA™), denosumab (PROLIA® o XGEVA®), ofatumumab (ARZERRA®), panitumumab (VECTIBIX®), pembrolizumab (KEYTRUDA®), nivolumab (OPDIVO®), ipilimumab (YERVOY®), atezolizumab (TECENTRIQ®), avelumab (BAVENCIO®), durvalumab (IMFINZI®), daratumumab (DARZALEX®), ceritinib (ZYKADIA®) e inmunoglobulinas antitumorales (THYMOGLOBULIN® (de conejo) o ATGAM® (equina)).

En otra combinación ejemplar, el primer fármaco inmunomodulador y el segundo fármaco inmunomodulador se seleccionan de manera independiente del grupo que consiste en mAb anti-CD28, mAb anti-CD3, mAb anti-CD20, mAb

- anti-CD52; factor estimulante de colonias de granulocitos; un interferón; imiquimod; talidomida, lenalidomida, pomalidomida, apremilast; azatioprina, cladribina, ciclofosfamida, inmunoglobulina intravenosa, metotrexato, mitoxantrona; talimogeno laherparepvec; adalimumab, catumaxomab, ibritumomab tiuxetano, tositumomab-¹³¹I, brentuximab vedotina, betuximab, rituximab, alemtuzumab, bevacizumab, pertuzumab, trastuzumab, trastuzumab emtansinen, denosumab, ofatumumab, panitumumab, pembrolizumab, nivolumab, ipilimumab, atezolizumab, avelumab, durvalumab, daratumumab, ceritinib, elotuzumab, e inmunoglobulinas antitumorales. El mAb anti-CD52 puede ser alemtuzumab, el mAb anti-C20 puede ser rituximab, el mAb anti-CD3 puede ser OKT3 y el mAb anti-CD28 puede ser TGN1412.
- En una opción preferida, el primer fármaco inmunomodulador es pembrolizumab o nivolumab y el segundo fármaco inmunomodulador es lenalidomida, pomalidomida, epacadostat, talimogeno laherparepvec, ipilimumab, atezolizumab, avelumab, rituximab, alemtuzumab, ceritinib, daratumumab, elotuzumab o durvalumab. En otra opción preferida, el primer fármaco inmunomodulador es pembrolizumab y el segundo fármaco inmunomodulador es lenalidomida. En otra opción preferida, el primer fármaco inmunomodulador es pembrolizumab y el segundo fármaco inmunomodulador es pomalidomida.
- En una opción preferida, el primer fármaco inmunomodulador es nivolumab y el segundo fármaco inmunomodulador es lenalidomida. En otra opción preferida, el primer fármaco inmunomodulador es nivolumab y el segundo fármaco inmunomodulador es pomalidomida. En otra opción preferida, el primer fármaco inmunomodulador es nivolumab y el segundo fármaco inmunomodulador es elotuzumab. En una opción preferida, el primer fármaco inmunomodulador es nivolumab y el segundo fármaco inmunomodulador es ipilimumab.
- En otra opción preferida, el primer fármaco inmunomodulador es ipilimumab y el segundo fármaco inmunomodulador es lenalidomida, pomalidomida, pembrolizumab, atezolizumab, avelumab, rituximab, alemtuzumab, ceritinib, daratumumab o durvalumab.
- En otra opción preferida, el primer fármaco inmunomodulador es atezolizumab, avelumab o durvalumab y el segundo fármaco inmunomodulador es lenalidomida, pomalidomida, pembrolizumab, ipilimumab, rituximab, ceritinib, daratumumab o alemtuzumab. En otra opción preferida, el primer fármaco inmunomodulador es durvalumab y el segundo fármaco inmunomodulador es lenalidomida. En otra opción preferida, el primer fármaco inmunomodulador es durvalumab y el segundo fármaco inmunomodulador es rituximab. En otra opción preferida, el primer fármaco inmunomodulador es durvalumab y el segundo fármaco inmunomodulador es pomalidomida. En otra opción preferida, el primer fármaco inmunomodulador es durvalumab y el segundo fármaco inmunomodulador es daratumumab. En aún otra opción preferida, el primer fármaco inmunomodulador es durvalumab y el segundo fármaco inmunomodulador es ibrutinib.
- En una opción preferida, el primer fármaco inmunomodulador es elotuzumab y el segundo fármaco inmunomodulador es pomalidomida. En otra opción preferida, el primer fármaco inmunomodulador es atezolizumab y el segundo fármaco inmunomodulador es pomalidomida. En otra opción preferida, el primer fármaco inmunomodulador es atezolizumab y el segundo fármaco inmunomodulador es lenalidomida.
- Se divulga un método de determinación de una dosificación segura de un fármaco inmunomodulador que no desencadena un síndrome de liberación de citocinas en un ser humano tras la administración del fármaco inmunomodulador. El presente método puede comprender proporcionar un fármaco inmunomodulador con una primera dosificación, dicha primera dosificación del fármaco inmunomodulador se determina para desencadenar un síndrome de liberación de citocinas leve o grave en un primer ratón inmunodeficiente, irradiado y humanizado tras su administración; proporcionar un segundo ratón inmunodeficiente, dicho segundo ratón se irradia con 75-125 cGy de rayos X; injertar $1,5-3,0 \times 10^7$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un ser humano a dicho segundo ratón; administrar a dicho segundo ratón un fármaco inmunomodulador 5-7 días después de injertar con PBMC, dicho fármaco inmunomodulador se administra con una segunda dosificación que es menor que dicha primera dosificación; determinar la concentración sanguínea en dicho segundo ratón de una pluralidad de citocinas que comprenden IFN- γ e IL-10; y determinar una dosificación segura de dicho fármaco inmunomodulador para la administración en dicho ser humano, dicha dosificación segura es una dosificación que produce una concentración sanguínea de IFN- γ es <300 pg/ml e IL-10 es <25 pg/ml tras la administración de dicho fármaco inmunomodulador a dicho segundo ratón, en donde la concentración sanguínea de IFN- γ <300 pg/ml e IL-10 <25 pg/ml en dicho segundo ratón es indicativa de que la administración de dicha dosificación segura de dicho fármaco inmunomodulador probablemente no desencadene un síndrome de liberación de citocinas en dicho ser humano.
- En otra opción, el presente método proporciona la optimización de una dosificación segura para un fármaco inmunomodulador que se sospecha que desencadena un síndrome de liberación de citocinas leve o grave en un ser humano. El presente método comprende: proporcionar un ratón inmunodeficiente, dicho ratón se irradia con 75-125 cGy de rayos X; injertar $1,5-3,0 \times 10^7$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un ser humano; administrar a dicho ratón un fármaco inmunomodulador 5-7 días después de injertar con PBMC, dicho fármaco inmunomodulador se administra con una dosificación que es menor que la que se sospecha que desencadena una liberación de citocinas leve o grave; determinar la concentración sanguínea en dicho ratón de una pluralidad de citocinas que comprenden IFN- γ e IL-10; y determinar una dosificación segura de dicho fármaco inmunomodulador para la administración en dicho ser humano, dicha dosificación segura es una dosificación que produce una concentración

sanguínea de IFN- γ es <300 pg/ml e IL-10 es <25 pg/ml tras la administración de dicho fármaco inmunomodulador a dicho ratón, en donde la concentración sanguínea de IFN- γ <300 pg/ml e IL-10 <25 pg/ml en dicho ratón es indicativa de que la administración de dicha dosificación segura de dicho fármaco inmunomodulador probablemente no desencadene un síndrome de liberación de citocinas en dicho ser humano.

El número de PBMC injertadas por ratón puede ser 2×10^7 PBMC. El ratón inmunodeficiente ejemplar incluye un ratón NSG, un ratón NSG-IL-6, un ratón NSG-CSF-1, y similares. Preferentemente, un ratón inmunodeficiente es un ratón NSG. En opciones preferidas, el ratón inmunodeficiente se irradia antes del injerto con 100 cGy de rayos X. La administración de los fármacos se puede realizar 6 días después del injerto. La pluralidad de citocinas puede comprender además IL-2, IL-4, IL-6 o TNF. La concentración sanguínea de la pluralidad de citocinas se puede determinar de 2 a 6 horas después de la administración del fármaco inmunomodulador, preferentemente 6 horas después de la administración del fármaco inmunomodulador. El fármaco inmunomodulador puede ser cualquiera de los divulgados en el presente documento. Por ejemplo, el fármaco inmunomodulador puede ser mAb anti-CD28, mAb anti-CD3, mAb anti-CD20, mAb anti-CD52, pembrolizumab, ipilimumab, atezolizumab, avelumab, durvalumab, epacadostat, talimogeno laherparepvec, nivolumab, lenalidomida, ceritinib o inmunoglobulinas antitumorales.

En el presente documento se divulga un método *in vitro* para determinar la probabilidad de que la administración de un fármaco inmunomodulador a un ser humano inducirá un síndrome de liberación de citocinas en el ser humano que comprende: proporcionar una muestra de sangre de un ratón inmunodeficiente, irradiado y humanizado, administrado con un fármaco inmunomodulador 5-7 días después del injerto con $1,5\text{-}3,0 \times 10^7$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un ser humano; y detectar *in vitro* la concentración de una pluralidad de citocinas que comprenden IFN- γ y/o IL-10 presente en la muestra de sangre del ratón, en donde una concentración de IFN- γ ≥ 1800 pg/ml o de IL-10 ≥ 120 pg/ml en la muestra de sangre del ratón es indicativa de que la administración del fármaco inmunomodulador al ser humano probablemente induzca un síndrome de liberación de citocinas grave.

Se divulga un método para determinar la probabilidad de que la administración de una combinación de un primer fármaco inmunomodulador y un segundo fármaco inmunomodulador a un ser humano inducirá un síndrome de liberación de citocinas grave en el ser humano. El presente método puede comprender proporcionar una muestra de sangre de un ratón inmunodeficiente, irradiado y humanizado, administrado con una combinación de un primer fármaco inmunomodulador y un segundo fármaco inmunomodulador 5-7 días después del injerto con $1,5\text{-}3,0 \times 10^7$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un ser humano; y detectar *in vitro* la concentración de una pluralidad de citocinas que comprenden IFN- γ y/o IL-10 presente en la muestra de sangre del ratón, en donde una concentración de IFN- γ ≥ 1800 pg/ml o de IL-10 ≥ 120 pg/ml es indicativa de que la administración de la combinación del primer fármaco inmunomodulador y el segundo fármaco inmunomodulador al ser humano probablemente induzca un síndrome de liberación de citocinas grave.

También se divulga un modelo de ratón humanizado como una plataforma de cribado de fármacos con una precisión para identificar a partir de un gran número de candidatos farmacológicos clínicamente relevantes para evaluación clínica. La presente valoración elimina los candidatos farmacológicos potenciales que desencadenan la liberación de citocinas en seres humanos y de ese modo representa una herramienta consistente de predicción para pruebas de inmunotoxicidad del fármaco.

La presente valoración representa una valoración de pruebas de fármacos para candidato(s) farmacológico(s) que puede(n) afectar de manera adversa el sistema inmunitario en seres humanos. La presente valoración también puede proporcionar pruebas de fármacos para un candidato farmacológico o una combinación de candidatos farmacológicos. El modelo proporciona el vínculo necesario entre pruebas preclínicas y clínicas. La integración de la presente valoración en programas de desarrollo de fármacos debería acelerar el procedimiento de aprobación por la FDA para el desarrollo de fármacos terapéuticos. El candidato farmacológico o las combinaciones de candidatos farmacológicos en estos métodos no se limitan a los fármacos inmunomoduladores mencionados con respecto a otras formas de realización en el presente documento, sino que pueden incluir cualquier candidato farmacológico que pueda tener un efecto terapéutico con respecto a tratar, aliviar y/o curar una enfermedad, afección, dolencia, herida u otro cuadro clínico.

Se divulga un método para determinar si un candidato farmacológico causa una toxicidad inmunitaria en un ser humano. El método comprende administrar el fármaco a un mamífero no humano inmunodeficiente (p. ej., un ratón NSG, NSG-CSF-1 o NSG-IL-6) que se ha injertado con células mononucleares de sangre periférica humanas (hPBMC) y determinar si el fármaco causa una toxicidad inmunitaria en seres humanos, al determinar si el fármaco causa una toxicidad inmunitaria en el mamífero no humano.

También se describe un método *in vivo* de determinación de la inmunotoxicidad de un candidato farmacológico para el uso en un humano que comprende los pasos de: (a) proporcionar un ratón inmunodeficiente, dicho ratón se irradia con 75-125 cGy de rayos X; (b) injertar $4,5\text{-}5,5 \times 10^7$ - $5,5 \times 10^7$ PBMC humanas, preferentemente $5,0 \times 10^7$ PBMC humanas, en el ratón (p. ej., NSG, NSG-IL-6, NSG-CSF-1); (c) administrar un candidato farmacológico al ratón 4-7 días después del injerto; (d) determinar la concentración de citocina en sangre de dicho ratón, en donde dicha citocina es al menos una citocina seleccionada del grupo que consiste en IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 y TNF; y (e) determinar la inmunotoxicidad de dicho candidato farmacológico, en donde la concentración sanguínea en dicho ratón de al menos una citocina seleccionada del grupo que consiste en IFN- γ ≥ 300 pg/ml, IL-2 ≥ 15 pg/ml, IL-4 ≥ 10 pg/ml, IL-6 ≥ 10 pg/ml, IL-10 ≥ 25 pg/ml

o TNF ≥ 5 pg/ml es indicativa de una inmunotoxicidad de dicho candidato farmacológico en un ser humano. El ratón inmunodeficiente puede ser un ratón NSG, un ratón NSG-IL-6 o un ratón NSG-CSF-1, preferentemente un ratón NSG. En una forma de realización preferida, el ratón inmunodeficiente se irradia con 100 cGy de rayos X. La liberación de citocinas se puede determinar en la sangre del ratón de 2 a 6 horas después de la administración del candidato farmacológico, preferentemente 6 horas después de la administración del candidato farmacológico.

También se describe un método de determinación de la inmunotoxicidad humana de un candidato farmacológico que comprende injertar $4,5 \times 10^7$ - $5,5 \times 10^7$ PBMC humanas a un ratón inmunodeficiente e irradiado; administrar a dicho ratón un candidato farmacológico 4-7 días, preferentemente 5-7 días después de injertar, más preferentemente 6 días, después de injertar; determinar la liberación de citocinas en la sangre de dicho ratón, en donde la citocina es al menos una citocina seleccionada del grupo que consiste en IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 y TNF; e identificar que el candidato farmacológico tenga una inmunotoxicidad baja en el ser humano cuando se detecta una liberación de citocina baja en la sangre de dicho ratón. En una forma de realización, un método de determinación de la inmunotoxicidad de un candidato farmacológico en el ser humano comprende proporcionar una muestra de sangre de un ratón inmunodeficiente, irradiado y humanizado, administrado con un candidato farmacológico 4-7 días, preferentemente 5-7 días después de injertar, más preferentemente 6 días, después del injerto con $4,5$ - $5,5 \times 10^7$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un ser humano; y detectar *in vitro* la concentración de al menos una citocina humana presente en la muestra de sangre del ratón para determinar la inmunotoxicidad del candidato farmacológico en el ser humano, en donde la al menos una citocina humana se selecciona del grupo que consiste en IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 y TNF α , y en donde el candidato farmacológico tiene una inmunotoxicidad baja en el ser humano cuando se detecta una concentración baja de citocina humana en la muestra de sangre del ratón. El ratón inmunodeficiente puede ser un ratón NSG, un ratón NSG-IL-6 o un ratón NSG-CSF-1, preferentemente dicho ratón inmunodeficiente es un ratón NSG. El ratón inmunodeficiente se puede irradiar con 75-125 cGy de rayos X, preferentemente el ratón inmunodeficiente se irradia con 100 cGy de rayos X. La liberación de citocinas se puede determinar en la sangre del ratón de 2 a 6 horas después de la administración del candidato farmacológico, preferentemente 6 horas después de la administración del candidato farmacológico. La liberación baja de citocinas en la sangre del ratón puede comprender IFN- γ < 300 pg/ml, IL-10 < 25 pg/ml, IL-2 < 15 pg/ml, IL-4 < 10 pg/ml, IL-6 < 10 pg/ml o TNF < 5 pg/ml. La liberación baja de citocinas en la sangre del ratón puede comprender una cantidad de citocina no mayor que la cantidad de citocina inducida por la administración de un control negativo.

Se describe además un paso para identificar si el (los) candidato(s) farmacológico(s) y/o las combinaciones de fármacos tienen un perfil de seguridad adecuado para la aprobación por la FDA, en donde una liberación baja de citocinas es indicativa de un perfil de seguridad adecuado para la aprobación por la FDA. De acuerdo con algunas opciones, $4,5 \times 10^7$ - $5,5 \times 10^7$ PBMC humanas se injertan en un ratón inmunodeficiente e irradiado. De acuerdo con otras opciones, $5,5 \times 10^7$ PBMC humanas se injertan en un ratón inmunodeficiente e irradiado. Las PBMC injertadas en el método de determinar el perfil de seguridad pueden ser de un individuo solo o de un grupo de seres humanos. De acuerdo con opciones preferidas, el ratón deficiente inmunitario se irradia con 75 cGy - 125 cGy de rayos X al menos cuatro horas antes de injertar las PBMC en el ratón inmunodeficiente. De acuerdo con otras opciones preferidas, el ratón deficiente inmunitario se irradia con 1100 cGy de rayos X al menos cuatro horas antes de injertar las PBMC en el ratón inmunodeficiente. La respuesta al fármaco se puede evaluar en comparación con un agente de control, por ejemplo. La presente valoración posibilita que la determinación de un candidato farmacológico apruebe la evaluación de seguridad farmacéutica.

También se describe un ratón inmunodeficiente, irradiado y humanizado, injertado con células mononucleares de sangre periférica humanas, siendo dicho ratón inmunodeficiente, irradiado y humanizado un ratón NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wj1}/SzJ (NSG). Preferentemente, el ratón se injerta con $1,5$ - $3,0 \times 10^7$ PBMC. El ratón NSG puede comprender además un gen del factor estimulante de colonias de macrófagos 1 (NSG-CSF-1) humano o un gen de la interleucina 6 (NSG-IL-6) humana. Más preferentemente, el ratón se injerta con 2×10^7 PBMC. De acuerdo con otras opciones, el ratón se injerta con $4,5$ - $5,5 \times 10^7$ PBMC.

También se divulga un ratón inmunodeficiente humanizado, injertado con células mononucleares de sangre periférica humanas, siendo dicho ratón inmunodeficiente humanizado un ratón NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wj1}/SzJ (NSG) que tiene un gen del factor estimulante de colonias de macrófagos 1 (NSG-CSF-1) humano. Preferentemente, el ratón se injerta con $1,5$ - $3,0 \times 10^7$ PBMC. Más preferentemente, el ratón se injerta con 2×10^7 PBMC. De acuerdo con otras opciones, el ratón se injerta con $4,5$ - $5,5 \times 10^7$ PBMC.

EJEMPLOS

Ejemplo. 1 Injerto de PBMC humanas en ratones humanizados

En este estudio, se usaron dos cepas de ratones inmunodeficientes humanizados: hembra de 6 semanas (i) ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wj1}/SzJ (NSG, JAX, número de reserva 005557) y ii) ratones NSG-CSF-1 (Jackson Laboratory, n.º de reserva: 028654). Los ratones se irradiaron con 100 cGy de rayos X al menos 4 horas antes del injerto con PBMC humanas. Las PBMC humanas purificadas/aisladas (Astarte Biologics o Allicells) del mismo donante se inyectaron por vía intravenosa (iv) en ratones NSG o NSG-CSF-1 con 1 - 5×10^7 células/ratón. Tras la inyección de hPBMC, los ratones se observaron a diario para determinar el peso corporal, el aspecto general del pelo y la movilidad.

La FIG. 1A muestra los cambios diarios de peso corporal en 10 ratones NSG o NSG-CSF-1 después del injerto de hPBMC con 2×10^7 hPBMC/ratón, presentados como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM). La FIG. 1B representa las mediciones del peso corporal de cinco ratones NSG individuales después del injerto de hPBMC (2×10^7 hPBMC/ratón). Cada línea representa un ratón. Se observó que la mayoría de los ratones exhibieron una pérdida de peso significativa que comenzó el día 8. Asimismo, además de la pérdida de peso corporal después del injerto, los ratones empezaron a mostrar la enfermedad del injerto contra el hospedador (GVHD), como se discute adicionalmente a continuación.

Ejemplo 2. Dinámica en tipos de células y números de células humanas injertadas en puntos temporales diferentes después del injerto

En este experimento, los tipos de células y números de células de células mononucleares humanas injertadas provenientes de diferentes donantes humanos se estudiaron después del injerto de hPBMC de tres cepas diferentes de ratones. A los ratones se les extrajo sangre el día 5 y/o el día 10 después del injerto, y las células humanas (tipos y porcentajes) se analizaron mediante citometría de flujo. Específicamente, las PBMC del ratón (en mezcla con hPBMC) se tiñeron con anticuerpo humanos: anti-CD45, anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19 y anti-CD56.

Se usaron ratones NSG, NSG-IL-6 (Jackson Laboratory, n.º de reserva: 028655) y NSG-CSF-1 para someter a prueba la reconstitución de células humanas (es decir, las células humanas mostraron un porcentaje diferente de células totales viables en puntos temporales diferentes después del injerto. La FIG. 2A muestra que la reconstitución en ratones NSG, NSG-IL-6 y NSG-CSF-1 exhibió células humanas comparables el día 5 después del injerto con hPBMC del donante 331. Los resultados indican que no hubo una diferencia significativa entre estas tres cepas de ratones. Las tres cepas de ratones tienen aproximadamente un 20 % de reconstitución de células CD45 humanas el día 5 del injerto. Entre las células CD45 humanas, la mayoría de ellas eran células T CD3 y células NK (FIG. 2A).

En otro estudio, las diferentes poblaciones de células se evaluaron en dos puntos temporales diferentes después del injerto en NSG de hPBMC provenientes de donantes diferentes (FIG. 2B, 2×10^7 PBMC/ratón) o del donante 358 (FIG. 2C, 3×10^7 PBMC/ratón). En estos experimentos, se usaron 2-5 ratones por grupo por cada punto temporal y los datos se presentaron como media $\pm$ SEM. Como se muestra en las FIG. 2B y 2C, hubo de ~10 al 15 % de CD45+ humanas el día 5 y del 35 a 50 % de CD45+ el día 10. Estos datos indican que las células CD45 humanas injertadas aumentaron en los ratones humanizados con el tiempo. Resulta de interés la observación de que el día 5, el 20-30 % de células CD56 (NK) estaba presente en la población de células CD45+ en los ratones humanizados. No obstante, el día 10, las células CD56 (NK) disminuyeron sustancialmente al 1-5 %. Estos datos sugieren que el aumento de CD45 en porcentaje se correlaciona con la desaparición de tipos específicos de células mononucleares (p. ej., células CD56 NK). En resumen, hay un cambio dinámico en el tipo de células y el número de células de células mononucleares injertadas en los ratones deficientes inmunitarios humanizados después del injerto de hPBMC. Las células T y las células NK son los tipos de células predominantes el día 5, pero el día 10, solo el tipo de células T es el tipo de células predominante, las células NK se extinguen con el tiempo. Para que los presentes métodos funcionen, debe haber un equilibrio de manera que no todas las células NK se extingan en el momento de las pruebas de fármacos (p. ej., el día 10).

El modelo de ratón humanizado con hPBMC se considera un modelo de células T, porque las células T humanas son la población de células predominantes junto con el tiempo después de la reconstitución de células humanas. Los resultados de este ejemplo lo confirmaron. Las FIG. 2B y 2C mostraron que, entre las células CD45 humanas que aumentaron desde el 10 al 15 % el día 5 después del injerto hasta del 35 al 50 % el día 10, el porcentaje de células T CD3 aumentó desde el 65 al 80 % el día 5 hasta del 90 al 95 % el día 10.

Hay un montón de tipos de células implicadas en la respuesta de la toxicidad inmunitaria. Las células T, las células NK y las células monocitos desempeñan tareas muy importantes. En el modelo de ratón humanizado con hPBMC, se encontró que aún hay diferentes tipos de células humanas en los ratones en un punto temporal temprano después del injerto. Las células T y las células NK son predominantes en la población de células en los ratones humanizados con hPBMC el día 5 del injerto, FIG. 2B y 2C. Este hallazgo les dio a los inventores una oportunidad de estudiar la respuesta de la toxicidad inmunitaria en los ratones humanizados con hPBMC. Se eligió un punto temporal temprano después del injerto, por ejemplo, el día 6, para hacer las pruebas para toxicidad inmunitaria y CRS.

Los ratones se irradiaron el día 0 y se injertaron con hPBMC el mismo día. El peso corporal de los ratones bajó del día 1 al día 3 debido a la irradiación. Después del día 4, los ratones empezaron a ganar peso. Aparentemente, como se muestra en la FIG. 1A, los ratones NSG tienen más peso en comparación con NSG-CSF-1. Los ratones NSG también parecían más sanos y más activos. Por lo tanto, los ratones NSG se usaron para pruebas posteriores.

Ejemplo 3. Criticalidad del tiempo de injerto

En este estudio, el fundamento para la pérdida de peso en algunos de los ratones humanizados se evaluó después del injerto de hPBMC. Se observó una pérdida de peso significativa en un número de ratones, indicativa de la enfermedad del injerto contra el hospedador (GVHD) en estos ratones. Los datos para ejemplos de GVHD se representan en las FIG. 3A, 3B, 3C y 3D.

Las FIG. 3A y 3B representan mediciones del peso corporal de 5 ratones NSG humanizados en función del tiempo después del injerto con 5×10^7 PBMC/ratón en un ratón NSG para el donante 4692 y el donante 362, respectivamente. Este contenido de células injertadas causó una pérdida de peso corporal significativa ($\sim 10\%$) después del día 7 posinjerto de PBMC de cualquier donante. Una pérdida de peso corporal de $\sim 20\%$ representa un estado grave de GVHD en el ratón y requiere la eutanasia del ratón.

La FIG. 3C representa mediciones del peso corporal de 5 ratones NSG humanizados en función del tiempo después del injerto del donante 309 (2×10^7 PBMC/ratón). Se observa una pérdida de peso corporal significativa ($\sim 10\%$) después del día 8 posinjerto de PBMC.

La FIG. 3D muestra mediciones del peso corporal de 4 ratones NSG humanizados en función del tiempo después del injerto del donante 358 (3×10^7 PBMC/ratón). Los ratones que recibieron PBMC del donante 358 empezaron con una pérdida de peso corporal significativa ($\sim 10\%$) el día 9 después del injerto.

Se cree que la GVHD explicó la pérdida de peso corporal observada. A medida que las células T injertadas en el ratón comenzaron a crecer, atacan las células del ratón. Como se discutió en el ejemplo 2 anteriormente, hubo un aumento en % de células CD45 con el tiempo después del injerto y cuando el número de células T es elevado, los ratones con GVHD se enfermaron después de 8 días y ya no fueron aptos para el estudio.

Los ratones con GVHD no solo exhibieron pérdida de peso, también mostraron signos de postura encorvada, pérdida de pelo, movilidad reducida y taquipnea. Después de una pérdida de peso del 20% , hubo que practicar la eutanasia en los ratones y los experimentos finalizaron. La ocurrencia frecuente de GVHD después de 8 días del injerto revela otro aspecto de la criticidad del tiempo de injerto de PBMC humanas antes de la administración de fármacos inmunomoduladores para las pruebas de toxicidad.

Los fármacos inmunomoduladores no se pueden administrar demasiado pronto después del injerto (p. ej., día 2-3) porque pueden no ser suficientes números y tipos de células circulantes en los ratones para producir resultados confiables y reproducibles.

No obstante, si los ratones tienen GVHD, esto afectará los resultados de las pruebas. Por lo tanto, en experimentos subsiguientes, se eligió el día 6 después del injerto de células para someter a prueba los efectos de la administración del fármaco en más donantes.

Se pueden liberar citocinas diferentes en puntos temporales diferentes después de la administración del fármaco. La citocina liberada en primer lugar debería ser TNF, que siempre alcanza el valor máximo antes de o en 1 hora después de la administración del fármaco. Adicionalmente, la mayoría de las citocinas volverían a valores normales después de 24 horas, si no hay insuficiencia orgánica. Por lo tanto, se eligieron las 2 y 6 horas después de la administración del fármaco como los tiempos para extraer la sangre del ratón y someter a prueba el suero para la concentración de citocina.

Ejemplo 4. Las células T y las células NK humanas representan las poblaciones de células predominantes en los ratones NSG humanizados con hPBMC el día 5 del injerto

En este estudio, se evaluó la reconstitución de células mononucleares de 10 donantes y se comparó en ratones humanizados. Cada ratón se injertó con 2×10^7 hPBMC de un donante. La información de pacientes anonimizados de siete de los 10 donantes se expone en la FIG. 4B.

Cinco ratones NSG humanizados se sometieron a prueba para la reconstitución del subgrupo de células inmunitarias indicadas mediante citometría de flujo. En los ratones NSG inyectados con hPBMC, el día 5 de la reconstitución, la sangre completa se analizó mediante citometría de flujo. Se midieron CD45, CD3, CD19, CD14 y CD56 humanas. Las células CD45+ humanas, como un porcentaje de las células totales, así como también CD3, CD19, CD14 y CD56, como un porcentaje de las células CD45+ (acotado en las células CD45+), se muestran para los 10 donantes en la FIG. 4A. Los donantes A4692, A4625 y A4668 solo mostraron CD45, CD3, CD19 y CD14. Los ratones humanizados mostraron un promedio del 10-25 % de células CD45+ humanas en sangre periférica (FIG. 4A). Entre las células CD45 humanas, hubo un 30-80 % de células T y un 10-40 % de células CD56 (NK), con una variación mostrada entre los diferentes donantes.

En experimentos subsiguientes, se eligió un día en el rango de los días 5-7 después del injerto como el tiempo óptimo para administrar fármacos inmunomoduladores al ratón para las pruebas de toxicidad.

Ejemplo 5. Liberación de citocinas inducida por fármacos inmunomoduladores en ratones humanizados

Para establecer un modelo de ratón humanizado para cribar y determinar la toxicidad inmunitaria del fármaco, el síndrome de liberación de citocinas (CRS), para pruebas preclínicas y ensayos clínicos, es necesario un control positivo para todos los pacientes. ORTHOCLONE OKT3, también denominado muromonab-CD3, es un anticuerpo monoclonal (mAb) murino (mAb anti-CD3) que se usó como un fármaco inmunodepresor para inmunodeprimir a receptores de trasplante. OKT3 se une al receptor CD3, que puede activar las células T para liberar citocinas, lo que causa el síndrome de liberación de citocinas (CRS). OKT3 se usó como control positivo para todos los pacientes. Para someter a prueba la especificidad y

sensibilidad del método, se necesita elegir una diana farmacológica que tenga pocos métodos para someter a prueba su toxicidad inmunitaria. Se eligió un mAb anti-CD28 como diana farmacológica para la evaluación de la especificidad y sensibilidad del presente método.

5 Se usaron PBMC de nueve (10) donantes diferentes para producir ratones NSG humanizados para estos experimentos. El día 6 del injerto de hPBMC (2×10^7 PBMC/ratón), los ratones se indujeron para la liberación de citocinas humanas mediante inyección iv con anticuerpos OKT3 (mAb anti-CD3; BioLegend, Cat. n.º 317302) o ANC28.1/5D10 (también denominado "ANC28", "mAb anti-CD28" o "anti-CD28"; Ancell, Cat. n.º 177-824). El tampón de PBS sirvió como control negativo. Se extrajo sangre a los ratones a las 2 y 6 horas, los sueros se recolectaron y se analizaron para las
10 concentraciones de citocina mediante el kit BD, matriz de perlas citométricas (CBA), de citocinas Th1/Th2 humanas II (BD, Cat. n.º 551809) (véase las FIG. 5A-5F).

Las FIG. 5A-5F representan múltiples gráficos de concentración de citocinas diferentes (es decir, IFN- γ , IL-6, IL-2, IL-10, IL-4 y TNF, respectivamente) medidas a las 2 y 6 horas después de la inyección de anticuerpos OKT3 (mAb anti-CD3) y
15 ANC28 (anti-CD28) en grupos de ratones humanizados para nueve (9) donantes diferentes. Los ratones se inyectaron iv con 0,5 mg/kg de OKT3 o 1 mg/kg de anti-CD28, y 5 ml/kg de PBS (como control negativo). Se extrajo sangre a los ratones a las 2 y 6 horas, y las concentraciones de citocina circulante se midieron mediante el kit BD CBA Th1/Th2 II. El número de ratones en cada grupo fue 2-5, y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

20 Ejemplo 6. Concentraciones de citocina circulante aumentadas después de la administración del fármaco

Para establecer si se indujo una tormenta de citocinas, las citocinas (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 y TNF humanas) se valoraron en los sueros de ratones después de 2 y 6 horas después de la inyección de anticuerpos (véase las FIG. 5A-5F). Se encontró una inducción significativa de IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-2, IL-4 y TNF humanas tras la inyección de OKT3 en
25 los 10 donantes a las 2 y 6 horas.

Pero con los ratones administrados con mAb anti-CD28, solo algunos donantes indujeron una liberación significativa de citocinas. No todos los donantes tuvieron una respuesta de liberación de citocinas tras la inyección de anti-CD28.

30 Como se muestra en la FIG. 5A, los 10 donantes mostraron diferentes perfiles de liberación respecto de la citocina IFN- γ a las 6 horas después de la inyección de anti-CD28:

Respuesta INTENSA/ELEVADA: donantes A4692, A4668 y 362 (IFN- γ ≥ 1800 pg/ml),
35 Respuesta MEDIA/DISCRETA: donantes A4625, 366, 345, 309 y 213 (de IFN- γ ≥ 300 pg/ml a IFN- γ < 1800 pg/ml), y
Respuesta BAJA / NINGUNA respuesta: donantes 364 y 353 (IFN- γ < 300 pg/ml).

La FIG. 5B muestra las respuestas de citocina IL-10 al mAb anti-CD28, observadas a las 2 o 6 horas en un ratón NSG que se había injertado con 2×10^7 (PBMC/ratón). Se representa una línea en el valor de IL-10 de 120 pg/ml, que es el
40 corte entre una respuesta intensa/elevada y una respuesta baja, de modo que es más fácil determinar si la respuesta es una respuesta intensa/elevada. Las respuestas a las 6 horas fueron de la siguiente forma:

Respuesta INTENSA/ELEVADA: donantes A4692, A4668 y 362 (IL-10 ≥ 120 pg/ml),
45 Respuesta MEDIA/DISCRETA: donantes A4625, 366, 345, 213 y 309 (IL-10 de ≥ 25 pg/ml a < 120 pg/ml), y
Respuesta BAJA / NINGUNA respuesta: donantes 364 y 353 (< 25 pg/ml).

Se observó que los donantes cuyo valor de IFN- γ es ≥ 1800 pg/ml (ya sea por OKT3 o mAb anti-CD28) también exhibieron un aumento del valor de IL-10 (es decir, ≥ 120 pg/ml). Cuando los valores de IFN- γ e IL-10 aumentan por encima de ≥ 1800 pg/ml y ≥ 120 pg/ml, respectivamente, el donante probablemente desarrolle CRS si se inyecta con el fármaco.

50 Las FIG. 5C-5F representan las liberaciones de citocina para IL-6, IL-2, IL-4 y TNF, respectivamente, a las 2 o 6 horas. La FIG. 5C muestra las respuestas de citocina IL-6 al mAb anti-CD28, observadas a las 2 o 6 horas en un ratón NSG que se había injertado con 2×10^7 (PBMC/ratón). Las respuestas a las 6 horas fueron de la siguiente forma:

Respuesta INTENSA/ELEVADA: donantes A4692, A4668 y 362 (IL-6 ≥ 25 pg/ml),
55 Respuesta MEDIA/DISCRETA: donantes A4625, 366, 345, 213 y 309 (IL-6 de ≥ 10 pg/ml a < 25 pg/ml), y
Respuesta BAJA / NINGUNA respuesta: donantes 364 y 353 (IL-6 < 10 pg/ml).

La FIG. 5D muestra las respuestas de citocina IL-2 al mAb anti-CD28, observadas a las 2 o 6 horas en un ratón NSG que se había injertado con 2×10^7 (PBMC/ratón). Las respuestas a las 6 horas fueron de la siguiente forma:

60 Respuesta INTENSA/ELEVADA: donantes A4692, A4668 y 362 (IL-2 ≥ 80 pg/ml),
Respuesta MEDIA/DISCRETA: donantes A4625, 366, 345, 213 y 309 (15 pg/ml $\leq$ IL-2 < 80 pg/ml), y
Respuesta BAJA / NINGUNA respuesta: donantes 364 y 353 (IL-2 < 15 pg/ml).

65 La FIG. 5E muestra las respuestas de citocina IL-4 al mAb anti-CD28, observadas a las 2 o 6 horas en un ratón NSG que se había injertado con 2×10^7 (PBMC/ratón). Las respuestas a las 6 horas fueron de la siguiente forma:

Respuesta INTENSA/ELEVADA: donantes A4692, A4668 y 362 (IL-4 ≥ 25 pg/ml),
 Respuesta MEDIA/DISCRETA: donantes A4625, 366, 345, 213 y 309 (10 pg/ml $\leq$ IL-4 < 25 pg/ml), y
 Respuesta BAJA / NINGUNA respuesta: donantes 364 y 353 (IL-4 < 10 pg/ml).

La FIG. 5F muestra las respuestas de citocina TNF al mAb anti-CD28, observadas a las 2 o 6 horas en un ratón NSG que se había injertado con 2×10^7 (PBMC/ratón). Las respuestas a las 6 horas fueron de la siguiente forma:

Respuesta INTENSA/ELEVADA: donantes A4692, A4668 y 362 (TNF ≥ 20 pg/ml),
 Respuesta MEDIA/DISCRETA: donantes A4625, 366, 345, 213 y 309 (5 pg/ml $\leq$ TNF < 20 pg/ml), y
 Respuesta BAJA / NINGUNA respuesta: donantes 364 y 353 (TNF < 5 pg/ml).

La FIG. 6 resume la respuesta de 10 donantes después de la administración de OKT3 o anti-CD28 en términos de su capacidad para inducir IFN- γ e IL-10. Nótese que después de la administración de mAb anti-CD28, los donantes A4692, A4668 y 362 son respondedores intensos/elevados; los donantes A4625, 366, 345, 309 y 213 son respondedores medios/discretos; y los donantes 364 y 353 son respondedores bajos / no son respondedores. Estos datos muestran claramente que el ratón NSG/NSG-CSF-1/NSG-IL-6 con modelo de injerto de PBMC es útil para diferenciar (o ser un predictor de) si un ser humano probablemente desencadene una respuesta de síndrome de liberación de citocinas grave tras la administración de un fármaco inmunomodulador al ser humano.

Como se muestra en las FIG. 5A-F y FIG. 6, los ratones injertados con PBMC de los diez donantes/pacientes mostraron una liberación sustancial de citocinas después de la inyección de OKT3. Pero con la administración de mAb anti-CD28, solo una parte de los ratones injertados con PBMC de donantes mostró una inducción significativa de aquellas citocinas. No todos los donantes tuvieron un valor elevado de liberación de citocinas en respuesta a la inyección de anti-CD28. Estos resultados son similares a la variación en seres humanos. Para un inductor potente de CRS, tal como OKT3, cada donante tuvo una respuesta, pero para un inductor débil, tal como de anti-CD28, ningún otro método puede detectar que hay una enorme variación entre donantes, como se observa en este método. La respuesta de IFN- γ se puede usar como un ejemplo: los ratones injertados con PBMC de tres donantes/pacientes mostraron una respuesta elevada al anti-CD28, los ratones injertados con PBMC de cinco donantes/pacientes mostraron una respuesta media al anti-CD28, los ratones injertados con PBMC de dos donantes/pacientes mostraron una respuesta baja / ninguna respuesta al anti-CD28. Los ratones también muestran caída de la temperatura corporal y aumentaron la puntuación clínica cuando hubo liberación de citocinas. Los presentes métodos se pueden usar para detectar toxicidad inmunitaria del nuevo fármaco y también para cribar la toxicidad del fármaco para un paciente individual.

Ejemplo 7. Cambios de temperatura corporal en ratones NSG después del tratamiento con fármaco inmunomodulador

La temperatura rectal de los ratones de los ejemplos 5 y 6 se midió antes del tratamiento y de nuevo inmediatamente después de cada punto temporal de extracción de sangre. Los datos de la temperatura se muestran en la FIG. 7. Los ratones NSG humanizados mostraron que una temperatura corporal un poco caída en algunos animales después del tratamiento con fármacos. Se notó que la temperatura corporal cayó más frecuentemente en los ratones que tuvieron una liberación elevada de IFN- γ (FIG. 7). Para los ratones en los grupos OKT3 y anti-CD28, la temperatura corporal cayó de 37-38 °C a por debajo de 36 °C en el punto temporal de 6 horas. La FIG. 7 muestra inducción de hipotermia después de la inyección de fármacos. La temperatura rectal se midió en ratones humanizados con hPMBC de 10 donantes inyectados con PBS de control, OKT3 y anti-CD28. El número de ratones en cada grupo fue 2-5, y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

Ejemplo 8. Evaluación de la puntuación clínica de ratones después de la inyección de fármacos

La puntuación clínica de los ratones se supervisó mediante la realización de los signos y la clasificación de las puntuaciones de la siguiente forma: Puntuación: 0=actividad normal; 1= actividad normal, piloerección, marcha de puntillas; 2=encorvado, actividad reducida pero aún móvil; 3=hipomotilidad pero móvil cuando es motivado; 4=moribundo (a punto de morir). En los ratones con una puntuación clínica de 4 hubo que practicar la eutanasia. El número de ratones en cada grupo fue 2-5, y los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La mayoría de los ratones con liberación de citocinas en los grupos tratados con OKT3 o mAb anti-CD28 tuvo una puntuación de 1 en el punto temporal de 6 horas. Los ratones sin o con baja liberación de citocinas no tuvieron puntuación clínica. La puntuación clínica de los ratones después de la inyección de fármacos se representa en la FIG. 8. La mayoría de los ratones tuvo una puntuación clínica de 1.

Ejemplo 9. El injerto de PBMC (5×10^7 /ratón) proporciona un modelo de ratón humanizado para el cribado de toxicidad del candidato farmacológico

Se ha desarrollado un modelo de ratón humanizado que es útil para las pruebas de toxicidad para cribar fármacos potenciales en descubrimiento. Durante la fase temprana de desarrollo del candidato farmacológico, se requiere cribar si un candidato farmacológico potencial puede poseer una actividad de toxicidad. En este modelo de ratón, la sensibilidad

de respuesta de la citocina se mejoró a propósito para detectar cualquier toxicidad (p. ej., síndrome de liberación de citocinas) asociada a los candidatos farmacológicos potenciales.

Para hacerlo, se injertó un número elevado de PBMC (es decir, 5×10^7 /ratón) en los ratones NSG humanizados. El día 6, los ratones recibieron el fármaco y se determinó el perfil de liberación de citocinas. Aquí, los valores de IFN- γ e IL-10 se evaluaron como en los experimentos mencionados anteriormente usando 2×10^7 PBMC/ratón.

Las FIG. 9A y 9B representan una comparación en el donante 213 de 2×10^7 frente a 5×10^7 PBMC/ratón para el valor de IFN- γ o IL-10 después de la inyección del fármaco. Se observó que el valor de IFN- γ o IL-10 aumentó con un injerto de mayores PBMC tras la administración de OKT3 y mAb anti-CD28 el día 6 usando las mismas cantidades del mAb (es decir, mAb OKT3 = 0,5 mg/kg y mAb anti-CD28 = 1 mg/kg). Se cree que esta liberación mejorada de citocinas con 5×10^7 PBMC/ratón es adecuada para una valoración de cribado en el desarrollo de fármacos preclínico. Las FIG. 9C-9F representan una comparación de la respuesta de citocinas (IL-6, IL-2, IL-4 y TNF, respectivamente) en el donante 213 con 2×10^7 PBMC/ratón y 5×10^7 PBMC/ratón. Estos datos indican que, para el cribado de toxicidad farmacológica, un número elevado de PBMC proporciona un método confiable y sensible para someter a prueba.

Ejemplo 10. Comparación de liberación de citocinas con concentraciones variadas del injerto de PBMC

En este experimento, se comparó la liberación de citocinas usando ratones humanizados que se injertaron con una de tres concentraciones de PBMC para determinar el efecto de la concentración de células. En particular, se compararon los valores de citocina generados en ratones NSG humanizados, injertados con 2×10^7 PBMC/ratón, 3×10^7 PBMC/ratón o 4×10^7 PBMC/ratón, después del tratamiento en dichos ratones con un fármaco inmunoterápico (es decir, mAbs OKT3, anti-CD28 o KEYTRUDA® (pembrolizumab)).

El día 6 después del injerto, los ratones recibieron el fármaco inmunoterápico (mAb) y se determinó el perfil de liberación de citocinas en los tres grupos de ratones. Se extrajo sangre a los ratones a las 2 y 6 horas, y las concentraciones de citocina circulante se midieron mediante el kit BD CBA Th1/Th2 II. Las FIG. 10A-F representan los valores de citocina después de la inyección del fármaco en ratones NSG humanizados del donante 309 con 2×10^7 , 3×10^7 y 4×10^7 PBMC/ratón. La FIG. 10A representa el valor de IFN- γ en cada grupo de ratones. La FIG. 10B representa el valor de IL-10 en cada grupo de ratones. La FIG. 10C representa el valor de IL-6 en cada grupo de ratones. La FIG. 10D representa el valor de IL-2 en cada grupo de ratones. La FIG. 10E representa el valor de IL-4 en cada grupo de ratones. La FIG. 10F representa el valor de TNF en cada grupo de ratones.

Se observó que, en estas condiciones experimentales, los valores de citocina exhibieron aumentos similares tras la administración de los mAb OKT3 y anti-CD28, y KEYTRUDA® (pembrolizumab) el día 6 usando las mismas cantidades de los mAb (es decir, mAb OKT3 = 0,5 mg/kg, mAb anti-CD28 = 1 mg/kg y KEYTRUDA® = 10 mg/kg) en los dos grupos de ratones con los valores de injerto más bajos (2×10^7 o 3×10^7 PBMC/ratón). No obstante, con el injerto de 4×10^7 PBMC/ratón, en estas condiciones experimentales, se encontró que la respuesta de citocina a cada una de las inyecciones del fármaco fue demasiado elevada para diferenciar una respuesta individual con sensibilidad óptima. Por el contrario, el injerto de PBMC con 2×10^7 y 3×10^7 células por ratón en estas condiciones proporciona una prueba sensible para el cribado para la ocurrencia de una tormenta de citocinas en respuesta a un fármaco en humanos individuales.

Ejemplo 11. Temperatura corporal y puntuación clínica en concentraciones diferentes de injerto de PBMC

En este estudio, se midieron los tipos diferentes de células, la temperatura corporal y la puntuación clínica en los ratones humanizados después del injerto con concentraciones diferentes de PBMC. Las PBMC usadas en este estudio se obtuvieron del donante 309. La FIG. 11A representa la población de células en el día 5 después del injerto de PBMC. El porcentaje de células CD45+ humanas totales aumentó con un valor creciente del injerto de PBMC en los ratones, aunque los porcentajes de los tipos diferentes de células en la población de CD45 fueron similares. La FIG. 11B representa la puntuación clínica de los ratones humanizados después de la administración con mAb OKT3 (0,5 mg/kg), anti-CD28 (1 mg/kg) y KEYTRUDA® (pembrolizumab; 10 mg/kg). Las FIG. 11C, 11D y 11E representan el cambio de temperatura corporal en el ratón. Como se muestra en las FIG. 11C y 11D, hubo una leve caída de la temperatura en el grupo de 3×10^7 PBMC/ratón, en comparación con aquella en el grupo de 2×10^7 PBMC/ratón.

Ejemplo 12. Aumento de valores de citocina con dosificación del fármaco aumentada

La tolerancia del fármaco suele ser diferente de una persona a la otra. El modelo de ratón inmunodeficiente humanizado se puede usar para someter a prueba la dependencia de la concentración del fármaco de la liberación de citocinas en pacientes individuales.

En este estudio, los inventores evaluaron concentraciones diferentes de KEYTRUDA® (pembrolizumab) para determinar si hay una dependencia de dosificación en el CRS en los ratones humanizados. Los ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wj1}/SzJ (NSG, JAX, número de reserva 005557) hembra de 6 semanas se irradiaron con 100 cGy de rayos X al menos 4 horas antes del injerto de PBMC humanas. En este experimento, las PBMC eran del donante 358. Las PBMC humanas purificadas/aisladas se inyectaron por vía intravenosa en los ratones con 3×10^7 células/ratón. Seis días después del injerto de PBMC, los ratones se inyectaron iv con PBS (control negativo), 0,5 mg/kg de OKT3 (control

positivo), 2,5 mg/kg, 5 mg/kg o 10 mg/kg de KEYTRUDA®. Hubo 5 ratones por grupo. Estas dosificaciones de KEYTRUDA® están en el rango de dosificaciones estudiadas en ensayos clínicos, discutidas en la información sobre el producto para KEYTRUDA® de EE. UU. Se han documentado pocos informes de efectos adversos del síndrome de liberación de citocinas grave después de la administración de KEYTRUDA®. Se extrajo sangre a los ratones a las 2 y 6 horas, y las concentraciones de citocina circulante se midieron mediante el kit BD CBA Th1/Th2 II. Como se muestra en las FIG. 12A-F, el valor medido después de la inyección del control positivo OKT3 fue muy elevado para cada una de IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-2, IL-4 y TNF. Como se muestra en las FIG. 12A-F, los valores de citocina aumentaron junto con la dosificación creciente de KEYTRUDA®. Con 2,5 mg/kg de KEYTRUDA®, los valores de citocina fueron similares al grupo de control negativo (es decir, grupo de control de PBS) y casi no hubo liberación de citocinas. Por el contrario, los valores de citocina aumentaron con las dosificaciones crecientes de KEYTRUDA®, con una respuesta elevada de citocina cuando se usaron 10 mg/kg de KEYTRUDA®.

Como se puede ver en las FIG. de 12A a 12F, seis horas después de la administración de dosis, los valores de citocina mostraron una respuesta dependiente de la dosis sobre la cantidad de KEYTRUDA® (pembrolizumab), que aumentaba con la dosis creciente. Con una concentración de KEYTRUDA® de 2,5 mg/kg, el valor de cada citocina estuvo dentro del rango de error del valor medido para el grupo de control de PBS, lo que indica que casi no hubo liberación de citocinas. Con 10 mg/kg de KEYTRUDA®, el valor de cada citocina estuvo en el rango medio para predecir el CRS. De este modo, para el donante 358, la administración de 2,5 mg/kg de KEYTRUDA® tendría un riesgo menor de producir CRS que la administración de 10 mg/kg KEYTRUDA® (pembrolizumab).

La dependencia de dosis de la liberación de citocinas muestra que el modelo *in vivo* de ratón humanizado se puede usar para detectar la mejor concentración del fármaco, con respecto a evitar la toxicidad inmunitaria, para un paciente individual. Dicha información se puede usar entonces en conjunto con otros conocimientos sobre el rango de administración de dosis eficaz para el tratamiento del trastorno que aflige al paciente para determinar una dosis eficaz, pero segura, del fármaco.

Ejemplo 13. Temperatura corporal y puntuación clínica para dosis diferentes de KEYTRUDA® (pembrolizumab)

En este estudio, los inventores midieron los diversos tipos de células, la temperatura corporal y la puntuación clínica en los ratones humanizados descritos en el ejemplo 12. La FIG. 13A representa la población de células en el día 5 después del injerto de células. Los inventores observaron que las células T y las células NK representan los tipos de células predominantes en estos ratones. La FIG. 13B representa la puntuación clínica después de la administración del fármaco inmunoterapéutico (KEYTRUDA® (pembrolizumab)) con dosis diferentes de KEYTRUDA®. Seis horas después de la administración de dosis, la puntuación clínica fue la misma que el control positivo (administración de OKT) cuando se dosificó con 5 mg/kg y 10 mg/kg de KEYTRUDA®. La FIG. 13C representa los cambios de temperatura corporal en el ratón con dosis diferentes de KEYTRUDA®.

Ejemplo 14. Comparación – Método *in vivo* de ratón humanizado frente a valoración *in vitro*

Actualmente, las valoraciones *in vitro* de sangre completa o PBMC constituyen las principales valoraciones para someter a prueba la liberación de citocinas para el cribado de fármacos. En este ejemplo, la liberación de citocinas en respuesta a un tratamiento farmacológico se determinó mediante dos métodos para el mismo donante de PBMC, una valoración *in vitro* de PBMC y un método *in vivo* de ratón humanizado.

Método *in vivo*

Día 0: Los ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wj1}/SzJ (NSG, JAX, número de reserva 005557) hembra de 6 semanas se irradiaron con 100 cGy de rayos X al menos 4 horas antes del injerto de PBMC humanas. Las PBMC humanas purificadas/aisladas se inyectaron por vía intravenosa en los ratones con 3×10^7 células/ratón. Las PBMC eran del donante 213, 309, 345 o 366. Día 5, se extrajo sangre a los ratones para someter a prueba el injerto de células humanas. Día 6, se administró el fármaco al ratón; se determinaron los valores de citocina en el suero del ratón 6 horas después de administrar el fármaco mediante el kit BD CBA Th1/Th2 II. En estos experimentos, se usaron 5 ratones por grupo.

Método *in vitro*

Día -1: Se recubrió la placa con fármacos: diluir el fármaco (p. ej., un anticuerpo) en PBS; dejar la placa abierta debajo de la campana.

Día 0: Procesar las PBMC de cada donante. Las PBMC eran del donante 213, 309, 345 o 366. Derretir las PBMC en RPMI complementado y lavar una vez. Contar las células y volver a suspender en RPMI complementado con 1×10^6 células/ml. Lavar los pocillos recubiertos dos veces con 200 μ l de PBS y a continuación, una vez con 200 μ l de RPMI complementado. Sembrar 200 μ l de células en cada pocillo (para a un total de 1×10^5 células por pocillo).

Día 2: Recolectar el sobrenadante de cada pocillo y medir el valor de citocina mediante el kit BD CBA Th1/Th2 II.

Resultados

Los dos métodos para determinar los valores de liberación de citocina después de un tratamiento farmacológico se compararon para el tratamiento de PBMC de cuatro donantes diferentes con un anticuerpo anti-CD28 (Ancell, Cat. n.º 177-824). Para la valoración *in vitro*, el anti-CD28 se dosificó a 10 µg/pocillo en las 96 placas de pocillo. Para el método *in vivo*, el anti-CD28 se dosificó a 1 mg/kg. Se recolectaron los sobrenadantes de los pocillos de cultivo de PBMC *in vitro* y del suero de los ratones, y se midieron los valores de citocinas. El anticuerpo OKT3 (0,5 mg/kg para la valoración *in vivo* o 1mg/ml para la valoración *in vitro*) se usó como un control positivo y ya sea el PBS o los anticuerpos de isotipo se usaron como controles negativos en la valoración *in vivo* o en la valoración *in vitro*, respectivamente. Los valores de citocina determinados están presentes en las FIG. 14A (IFN-γ e IL-10) y 14B (IL-6 e IL-4), como valores medio ± error estándar de la media (SEM). Las FIG. 14A y 14B muestran que, para cada uno de los cuatro donantes de PBMC, para cualquier citocina dada, se determinaron diferentes valores mediante las dos valoraciones.

La FIG. 15 vuelve a trazar los datos sobre valores de citocina de la FIG. 14A y la FIG. 14B del donante 213 para permitir una comparación más fácil de las diferencias en los valores de citocina determinados en las dos pruebas. Para cada una de las cuatro citocinas, IFN-γ, IL-10, IL-6 e IL-4, la prueba *in vitro* mostró que una liberación de citocinas relativamente escasa se produjo en las células del donante 213 después de dosificar con anti-CD-28. En la valoración *in vitro*, los valores de citocina medidos después de dosificar con anti-CD-28 fueron apenas diferentes de aquellos determinados después de dosificar con el anticuerpo de isotipo de control ("vehículo 2") para anti-CD-28, mientras que los valores de citocina después de dosificar con el anticuerpo OKT3 de control fueron muchos más elevados que los valores determinados después de dosificar con el anticuerpo de isotipo de control para OKT3 ("vehículo 1"). Por el contrario, mediante el método de prueba *in vivo*, para cada una de las cuatro citocinas, IFN-γ, IL-10, IL-6 e IL-4, el valor de citocina producido en las células del donante 213 después de dosificar con anti-CD-28 u OKT3 fue mucho más elevado que el valor medido en el control negativo.

Estos resultados muestran que, para algunos seres humanos, la prueba *in vitro* puede no mostrar que ellos reaccionarán con una tormenta de citocinas tras la dosificación con un fármaco inmunoactivo, aunque la prueba *in vivo* muestra que aquellos individuos pueden reaccionar con una tormenta de citocinas tras la dosificación con un fármaco inmunoactivo. El método *in vivo* de ratón humanizado es más sensible que la valoración *in vitro* y puede predecir la posibilidad de una tormenta de citocinas en un ser humano que la prueba *in vitro* puede fallar.

Ejemplo 15. Liberación de citocinas después del tratamiento con combinaciones de fármacos

El modelo de ratón humanizado con PBMC puede probar de manera eficaz si los fármacos solos pueden inducir una tormenta de citocinas en un individuo. No obstante, para el cribado de fármacos y la terapia clínica, a veces se deben usar combinaciones de fármacos. Este ejemplo muestra que el modelo de ratón humanizado con PBMC se puede usar para someter a prueba combinaciones de fármacos para la liberación de citocinas. Los resultados obtenidos con el modelo se muestran que son específicos del donante.

Los ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wj1}/SzJ (NSG, JAX, número de reserva 005557) hembra de 6 semanas se irradiaron con 100 cGy de rayos X al menos 4 horas antes del injerto con PBMC humanas. Las PBMC humanas aisladas de los respectivos donantes se inyectaron por vía intravenosa en los ratones con 3×10^7 células/ratón. Las PBMC eran del donante 213 o donante 364. Día 6 después del injerto de PBMC, se administró una combinación de fármacos al ratón y se determinaron los valores de citocina en el suero del ratón 6 horas después de administrar los fármacos mediante el kit BD CBA Th1/Th2 II. Se usaron 5 ratones en cada grupo experimental.

Las combinaciones de fármacos sometidas a prueba fueron: KEYTRUDA® (pembrolizumab) y REVLIMID® (lenalidomida); KEYTRUDA® e inmunoglobulinas antitímocíticas (ATG) (THYMOGLOBULIN® (de conejo)); y anti-CD28 y ATG.

El pembrolizumab (KEYTRUDA®) es un anticuerpo humanizado usado en la inmunoterapia del cáncer. La lenalidomida (REVLIMID®) es un derivado de la talidomida, que es un fármaco inmunomodulador de bajo peso molecular para uso oral usado en el tratamiento del cáncer. Las inmunoglobulinas antitímocíticas (ATG), comercializadas como THYMOGLOBULIN® (de conejo), son inmunodepresores usados para reducir la inmunidad natural del organismo en pacientes que reciben trasplantes, tales como trasplantes de riñón.

En los experimentos con KEYTRUDA® (pembrolizumab) y REVLIMID® (lenalidomida), los ratones NSG humanizados se inyectaron por vía intravenosa (iv) con 5 mg/kg de KEYTRUDA®, se administraron por vía oral con 100 mg/kg de lenalidomida o recibieron ambos fármacos. El tratamiento con 5 ml/kg de PBS iv se usó como el control.

En los experimentos con KEYTRUDA® (pembrolizumab) y ATG, los ratones NSG humanizados se inyectaron por vía intravenosa con 5 mg/kg de KEYTRUDA®, 1 mg/kg de ATG o recibieron ambos fármacos. El tratamiento con 5 ml/kg de PBS iv se usó como el control.

En los experimentos con anti-CD28 y ATG, los ratones NSG humanizados se inyectaron por vía intravenosa con 1 mg/kg de anti-CD28, 1 mg/kg de ATG o recibieron ambos fármacos. El tratamiento con 5 ml/kg de PBS iv se usó como el control negativo.

Los valores de citocina determinados en los experimentos con KEYTRUDA® (pembrolizumab) y REVLIMID® (lenalidomida) se muestran en la FIG. 16 para ambos donantes. Las citocinas, cuyos valores se midieron, eran IFN-γ (panel a); IL-10 (panel b); IL-6 (panel c); IL-2 (panel d); IL-4 (panel e); y TNF (panel f).

5 Basándose en los datos de dos ensayos clínicos interrumpidos que evaluaron KEYTRUDA® (pembrolizumab) en combinación con dexametasona y el agente inmunomodulador REVLIMID® (lenalidomida) para tratar el mieloma múltiple, la FDA emitió una declaración en el 2017 de que el tratamiento con la combinación de KEYTRUDA y lenalidomida dio por resultado un riesgo aumentado de toxicidad grave y muerte.

10 Como se muestra en la FIG. 16, cada una de IFN-γ, IL-6, IL-2 y TNF mostró un aumento significativo de la liberación de citocinas cuando KEYTRUDA® (pembrolizumab) y REVLIMID® (lenalidomida) se usaron en combinación por encima del valor producido por el tratamiento con cada fármaco solo para el donante 213, pero no para el donante 364.

15 Las inmunoglobulinas antitumorales (ATG) se usan en la prevención y el tratamiento del rechazo agudo en el trasplante de órganos y en la terapia de la anemia aplásica. Las ATG han demostrado anteriormente que estimula la toxicidad clínica. La FIG. 17 muestra los resultados de citocina después del tratamiento con KEYTRUDA® (pembrolizumab) solo, ATG solas y la combinación de KEYTRUDA® y ATG. Los valores de IFN-γ, IL-6, IL-10 y TNF fueron mayores después del tratamiento con la combinación de KEYTRUDA® y ATG que después del tratamiento con cualquiera de los fármacos solos para el donante 213, pero no para el donante 364.

20 La FIG. 18 muestra los resultados de citocina después del tratamiento con anti-CD28 solo, ATG solas y la combinación de anti-CD28 y ATG. Los valores de IFN-γ, IL-6, IL-2 y TNF fueron mayores después del tratamiento con la combinación de fármacos en comparación con después del tratamiento con cualquiera de los fármacos solos para el donante 213, pero solo IL-2 y TNF aumentaron después del tratamiento con la combinación de fármacos en comparación con después del tratamiento con cualquiera de los fármacos solos para el donante 364.

25 Estos resultados indican que el modelo *in vivo* de ratón humanizado puede predecir la probabilidad de una liberación elevada de citocinas por un fármaco solo y también para combinaciones de fármacos. Asimismo, donantes diferentes de PBMC mostraron respuestas diferentes de liberación de citocinas a las terapias de combinación.

30 Este estudio demuestra la ventaja de usar las PBMC propias de un paciente en un método *in vivo* para detectar, antes de la administración clínica, si una combinación de fármacos específica para un paciente puede probablemente inducir una liberación de citocinas grave. De manera similar, el presente método resulta útil para detectar una posible toxicidad relacionada con el fármaco, asociada a la administración de una combinación de fármacos.

35 Ejemplo 16. Población de células inmunitarias humanas y distribución de los tipos de células en ratones humanizados irradiados

40 En este ejemplo, se evaluaron la población de células inmunitarias humanas y la distribución de los tipos de células en ratones humanizados irradiados. Se demuestran los efectos de la irradiación con rayos X antes del injerto de PBMC humanas en ratones inmunodeficientes y el tiempo después del injerto en la población de células humanas en los ratones.

45 Los ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wj1}/SzJ (NSG, JAX, número de reserva 005557) hembra de 6 semanas se usaron para un injerto con PBMC humanas. Para los ratones sujetos al tratamiento de irradiación, los ratones se irradiaron con 100 cGy de rayos X al menos 4 horas antes del injerto con PBMC humanas. Las PBMC humanas purificadas/aisladas del donante se inyectaron por vía intravenosa en los ratones con 2×10^7 células/ratón. Las PBMC eran de uno de seis donantes diferentes: 362, 345, 2785, 213, 364 o 3251. Se extrajo sangre a los ratones el día 5 y el día 10 después del injerto, y las células humanas en la sangre del ratón se analizaron mediante citometría de flujo para determinar los tipos de células humanas presentes y los porcentajes de cada tipo. Específicamente, las PBMC del ratón en mezcla con las PBMC humanas se tiñeron con anticuerpos humanos: mAbs anti-CD45, anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19 y anti-CD56. Los resultados se muestran en la Figura 19, que ilustra que la población de células humanas es diferente entre los ratones con y sin irradiación el día 5 y el día 10.

50 Como se muestra en la FIG. 19, el día 5, la población de células de leucocitos humanos totales (CD45+) fue aproximadamente un 8-15 % en los ratones irradiados, pero solo un 1-3 % en los ratones no irradiados, con una variación entre los donantes en cuanto a la población total. La FIG. 19 muestra además que el día 5, la distribución de los tipos de células de leucocitos en la población de células humanas totales (CD45+) para ratones irradiados y no irradiados fue casi idéntica, siendo los tipos de células predominantes en cada uno células CD3+ (células T) y CD56+ (células NK), con porcentajes pequeños de células CD19+ (células B) y células CD14+ (monocitos).

60 La FIG. 19 muestra que el día 10, la población de células humanas totales (CD45+) ha crecido hasta aproximadamente un 30-85 % de las células viables en los ratones irradiados, pero hasta solo el 8-17 % de las células viables en los ratones no irradiados, con una variación entre los donantes individuales.

65 La FIG. 19 muestra además que el día 10, la distribución de los tipos de células de leucocitos en la población de células humanas totales (CD45+) fue nuevamente similar para ratones irradiados y no irradiados. Tanto en los ratones irradiados

como no irradiados, el tipo de células predominante fueron las células CD3+ (células T), que crecieron y expandieron su población en los ratones. Solo porcentajes pequeños o negligibles de las células CD56+ (células NK), células CD19+ (células B) y células CD14+ (monocitos) supervivientes estuvieron presentes en los ratones irradiados o no irradiados; es decir, estas células no crecieron y expandieron su población en los ratones.

Debido a que el número absoluto de células humanas presentes el día 5 o el día 10 en los ratones irradiados fue aproximadamente de 3 a 15 veces mayor que el número absoluto de células humanas presentes el mismo día en los ratones no irradiados, los ratones irradiados exhibieron números mayores de cada uno de los tipos de leucocitos humanos presentes. De manera importante, el día 5, los ratones irradiados tuvieron mayores números absolutos de las células CD56+ (células NK), células CD19+ (células B) y células CD14+ (monocitos) supervivientes en la población de células humanas CD45+, lo que proporcionó un modelado superior del sistema inmunitario humano que mejora la sensibilidad y la precisión de las pruebas para el síndrome de liberación de citocinas.

Ejemplo 17. Pérdida de peso corporal como indicador de GVHD en ratones humanizados irradiados o no irradiados

En este estudio, se usó la pérdida de peso corporal como indicador de la GVHD en ratones humanizados. Las mediciones de peso corporal se hicieron a diario en ratones humanizados injertados con 20 millones de PBMC de cada uno de seis donantes humanos diferentes (362, 345, 2785, 213, 364 o 3251). Los ratones se irradiaron o no se irradiaron antes del injerto con PBMC del donante, en conformidad con los procedimientos del ejemplo 16. Las mediciones de peso corporal para los grupos irradiados y no irradiados para cada donante se muestran en la FIG. 20, panel a (donantes 362, 345 y 2785); panel b (donantes 213, 364 y 3251). La FIG. 20 muestra que, para todos los donantes, la pérdida de peso corporal ocurre más temprano para los ratones irradiados que para los ratones no irradiados, lo que demuestra que la GVHD se desarrolla más rápido para los ratones humanizados irradiados que para los ratones humanizados no irradiados. Para los seis donantes humanos, la pérdida de peso corporal para los ratones humanizados irradiados después del día 8 es significativa (al menos aproximadamente un 10 %), lo que indica una GVHD significativa después del día 8. Los ratones no irradiados no mostraron una pérdida de peso corporal significativa incluso los días 12-14 después del injerto de PBMC, lo que indica un inicio de GVHD significativa mucho más lento.

Ejemplo 18. La GVHD causa la liberación de citocinas humanas en ratones humanizados solos (en ausencia de un tratamiento farmacológico)

Este ejemplo demuestra que los ratones que experimentaron una GVHD significativa segregaron citocinas humanas como resultado de la GVHD. La GVHD se desarrolló más rápido para los ratones humanizados irradiados que para los ratones humanizados no irradiados.

La FIG. 21 muestra los valores de citocina humana presente en ratones humanizados el día 10 después del injerto de PBMC en ausencia de cualquier tratamiento farmacológico. Las mediciones de citocina se muestran para IFN- γ (panel a), IL-10 (panel b) e IL-6 (panel c) para ratones humanizados de los seis donantes (362, 345, 2785, 213, 364 y 3251), con o sin irradiación antes del injerto de PBMC. Para cada donante, el día 10 después del injerto, más de cada una de las tres citocinas estuvo presente en la sangre de los ratones irradiados que en los ratones no irradiados. El día 10, sobre la base de las mediciones de peso corporal divulgadas en el ejemplo 17, los ratones irradiados tuvieron más GVHD grave, con la consiguiente secreción asociada a GVHD de citocinas humanas a partir de leucocitos humanos presentes, que los ratones no irradiados.

Ejemplo 19. Liberación de citocinas en ratones humanizados irradiados y no irradiados

Este ejemplo evalúa el efecto de la irradiación con rayos X (antes del injerto de PBMC) de ratones en la liberación de citocinas humanas inducida por fármacos.

Los ratones se injertaron con 20 millones de PBMC del donante 362 (un respondedor elevado), o el donante 21 (un respondedor medio). Los ratones se irradiaron o no se irradiaron antes del injerto con hPBMC del donante. Seis días después del injerto, los ratones se trataron con un fármaco inmunomodulador (inyección iv con 0,5 mg/kg de OKT3, 10 mg/kg de KEYTRUDA, 1 mg/kg de ATG o 5 ml/kg de PBS (control negativo)). Los valores de citocina se determinaron en la sangre del ratón, obtenida seis horas después del tratamiento farmacológico. Los resultados que comparan el valor de citocina inducida por fármacos en los ratones humanizados irradiados y no irradiados se muestran en las FIG. 22A-22B. La FIG. 22A presenta los datos para IFN- γ (panel a), IL-10 (panel b) e IL-6 (panel c), mientras que la FIG. 22B presenta los datos para IL-2 (panel d), IL-4 (panel e) y TNF (panel f). Las FIG. 22A-22B muestran que, para cada citocina, en cualquier donante, los valores de citocina en los ratones no irradiados son consistentemente menores después de un tratamiento farmacológico dado, en comparación con aquellos determinados en los ratones irradiados después del mismo tratamiento farmacológico.

Los valores mayores de citocina producidos en los ratones irradiados probablemente se deban al número mayor de células inmunitarias humanas (células T y células NK) presentes en aquellos ratones, como se divulga en el ejemplo 16. Por consiguiente, el modelo de ratón humanizado irradiado proporciona mayor sensibilidad para la detección de una variación individual en inmunoestimulación, en respuesta a un fármaco dado.

Materiales y métodos

1. Reconstitución de ratones humanizados con PBMC

5 Los ratones NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wj1}/SzJ (NSG, JAX, número de reserva 005557) hembra de 6 semanas y sus derivados, ratones NSG-CSF-1, NSG-IL-6, se irradiaron con 100 cGy de rayos X al menos 4 horas antes del injerto de PBMC humanas. Las PBMC humanas purificadas se adquirieron en el mercado (tecnologías Astarte Biologics o Allcells). Las PBMC se lavaron dos veces con PBS después del derretimiento, a continuación se inyectaron por vía intravenosa (iv) a ratones NSG con 10-50 millones de células/ratón. Tras la inyección de hPBMC, los ratones se observaron a diario para determinar el aspecto general del pelo y la movilidad. En un día diferente después del injerto de hPBMC, se extrajo sangre a los ratones para evaluar el porcentaje de células humanas mediante citometría de flujo. Las PBMC del ratón se tiñeron con anti-CD45, anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD56 humanas.

2. Inducción y medición de la liberación de citocinas en ratones humanizados

15 El día 6 del injerto de hPBMC, los ratones se indujeron para la liberación de citocinas humanas mediante inyección iv con anticuerpos OKT3 (mAb anti-CD3) y ANC28 (mAb anti-CD28), KEYTRUDA® (pembrolizumab) (anti-PD-1), ATG, REVLIMID® (lenalidomida) y tampón de PBS como control basal. Se extrajo sangre a los ratones a las 2 y/o 6 horas, el suero se recolectó y se analizó para la concentración de citocinas mediante el kit BD, matriz de perlas citométricas (CBA), de citocinas Th1/Th2 humanas II (BD, Cat. n.º 551809). Los límites de detección de las presentes valoraciones para las diversas citocinas son de la siguiente manera: IFN-γ, 7 pg/ml; IL-2, 2,6 pg/ml; IL-4, 2,6 pg/ml; IL-6, 3,0 pg/ml; IL-10, 2,8 pg/ml; y TNF, 2,8 pg/ml.

3. Medición de la temperatura corporal

25 La temperatura rectal de los ratones se midió antes del tratamiento y de nuevo inmediatamente antes de cada punto temporal de extracción de sangre. La temperatura se midió mediante la inserción de una termosonda rectal y se esperó hasta que se obtuvo una lectura estable.

4. Evaluación de la puntuación clínica

30 Como en una cita bibliográfica por Brady *et al.*, Clinical & Translational Immunology, 2014, los inventores realizaron los signos y la clasificación de las puntuaciones de la siguiente manera: Puntuación 0 = actividad normal; 1 = actividad normal, piloerección, marcha de puntillas; 2 = encorvado, actividad reducida pero aún móvil; 3 = hipomotilidad pero móvil cuando es motivado; 4 = moribundo (a punto de morir). En los ratones con una puntuación clínica de 4 hubo que practicar la eutanasia.

5. Análisis estadístico

40 Los resultados se analizaron usando GraphPad Prism 5.0.

Si bien las formas de realización se describen en el presente documento con respecto a usar ratones inmunodeprimidos humanizados para determinar si los fármacos inmunomoduladores se pueden administrar a un ser humano sin desencadenar una respuesta de citocinas elevada de manera inaceptable en el ser humano, debería entenderse que los presentes métodos se pueden usar con diversos mamíferos y/o fármacos, y/o se pueden usar para tratar mamíferos distintos de los seres humanos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar el síndrome de liberación de citocinas que comprende:
 - (a) injertar un ratón inmunodeficiente irradiado con $1,5 \times 10^7 - 3,0 \times 10^7$ células mononucleares humanas de sangre periférica (PBMC), en donde el ratón irradiado ha recibido irradiación para suprimir funcionalmente las células inmunitarias del ratón;
 - (b) administrar al ratón inmunodeficiente irradiado uno o más fármacos inmunomoduladores 5-7 días después del injerto de las PBMC humanas;
 - (c) detectar una o más citocinas en una muestra del ratón después de la administración de uno o más fármacos inmunomoduladores; y
 - (d) determinar si el fármaco inmunomodulador causa el síndrome de liberación de citocinas.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el ratón inmunodeficiente tiene un fondo genético NOD *scid* gamma.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el injerto comprende injertar el ratón inmunodeficiente con $2,0 \times 10^7$ de las PBMC humanas.
4. El método de la reivindicación 1-3, en donde la administración del uno o más fármacos inmunomoduladores es 6 días después del injerto de las PBMC humanas.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la detección comprende determinar la concentración en sangre de la una o más citocinas en la muestra.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la una o más citocinas se selecciona de IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL 10 y TNF.
7. El método de la reivindicación 6, en donde la una o más citocinas se selecciona de IFN- γ e IL-10.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la detección es de 2 a 6 horas después de la administración de uno o más fármacos inmunomoduladores.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el uno o más fármacos inmunomoduladores se seleccionan de fármacos inmunoestimulantes.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el uno o más fármacos inmunomoduladores se seleccionan de anticuerpos, opcionalmente anticuerpos monoclonales.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el uno o más fármacos inmunomoduladores se seleccionan de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interferones, imiquimod, talidomida y sus derivados o análogos, lenalidomida, pomalidomida, apremilast; azatioprina, cladribina, ciclofosfamida, inmunoglobulina intravenosa, metotrexato, mitoxantrona, talimogeno laherparepvec, una terapia vírica oncolítica modificada genéticamente, daratumumab, un anticuerpo anti-CD38, adalimumab, elotuzumab, epacadostat, una hidroxiamidina disponible por vía oral e inhibidora de la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO1), catumaxomab, ibritumomab tiuxetano, tositumomab-1131, brentuximab vedotin, betuximab, rituximab, alemtuzumab, bevacizumab, pertuzumab, trastuzumab, trastuzumab emtansinen, denosumab, ipilimumab, ofatumumab y panitumumab.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde uno o más fármacos inmunomoduladores se seleccionan de inhibidores del punto de control, opcionalmente seleccionados de inhibidores de CTLA-4, inhibidores de PD-1 e inhibidores de PD-L1, y opcionalmente en donde los inhibidores del punto de control se seleccionan de ipilimumab, pembrolizumab, nivolumab, atezolizumab, avelumab y durvalumab.

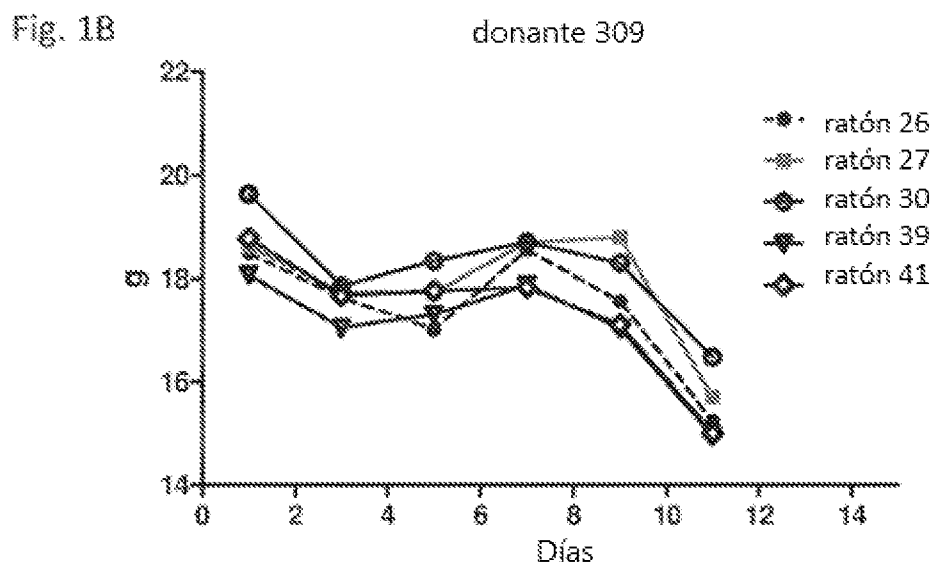
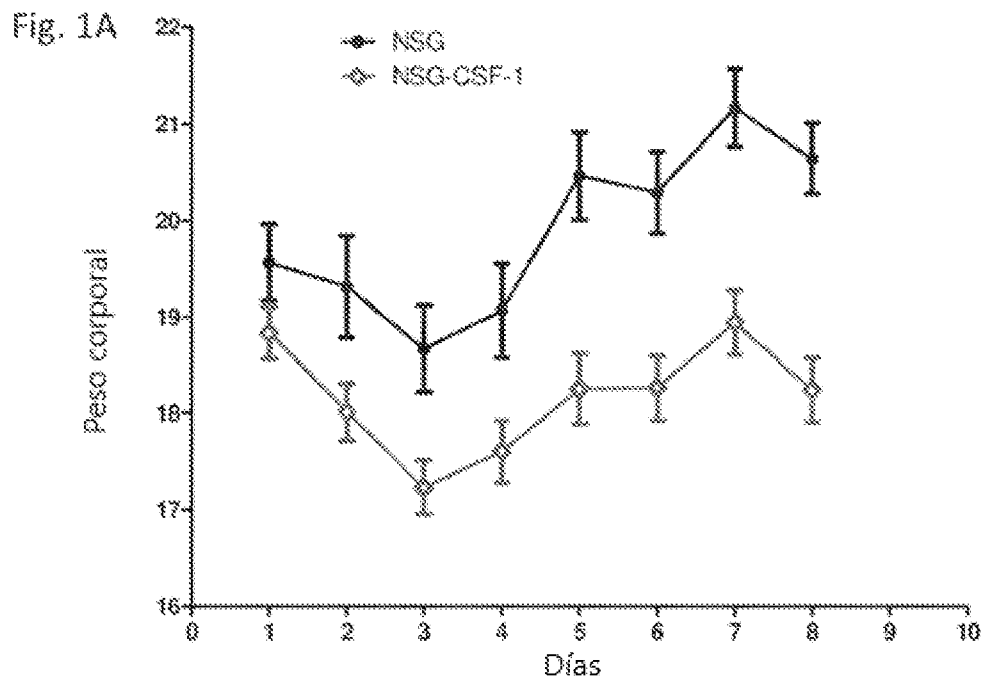


FIG. 2A

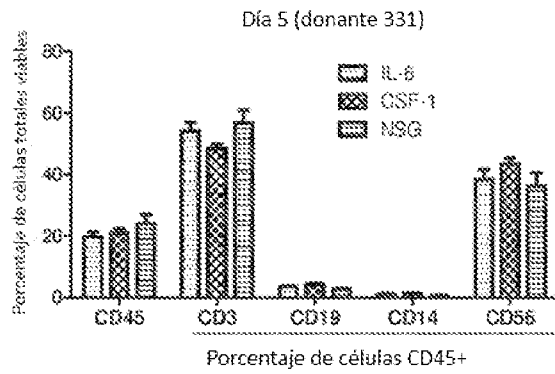


FIG. 2C

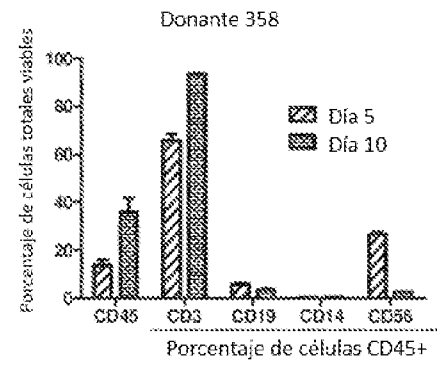


FIG. 2B

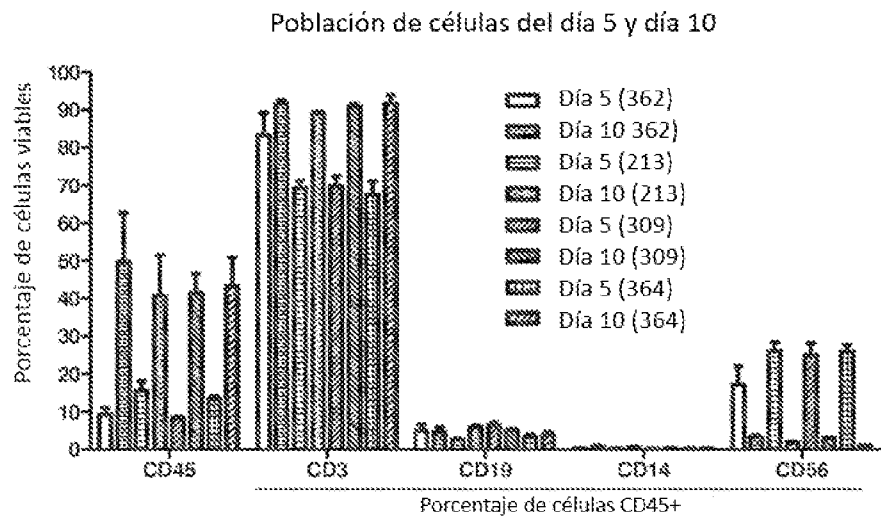


Fig. 3A

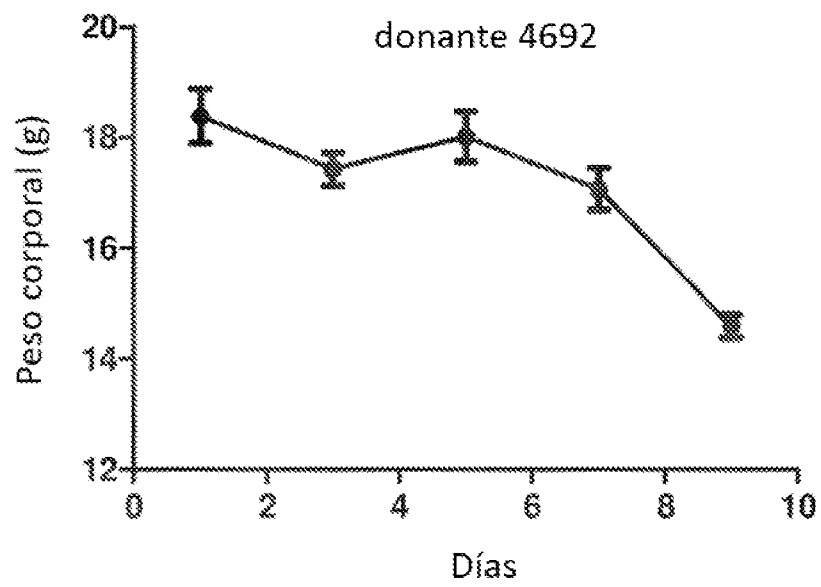


Fig. 3B

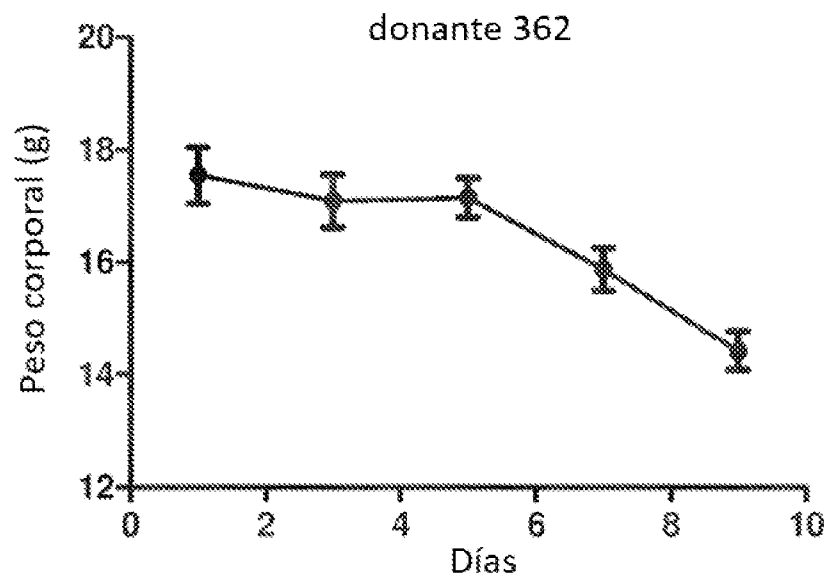


Fig. 3C

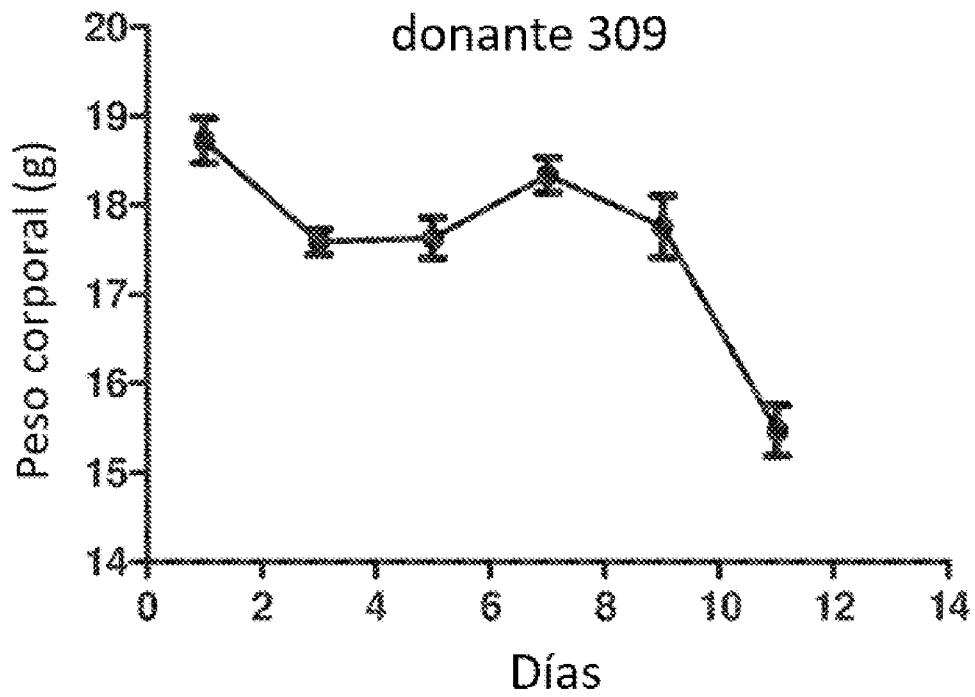


Fig. 3D

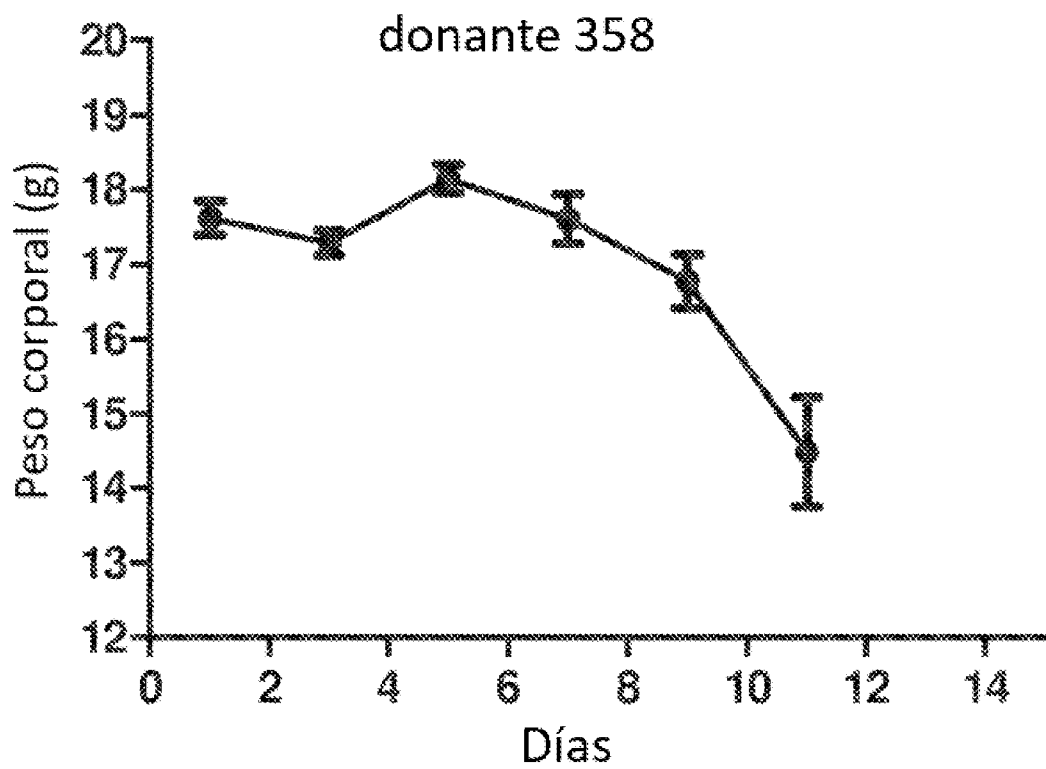


FIG. 4A

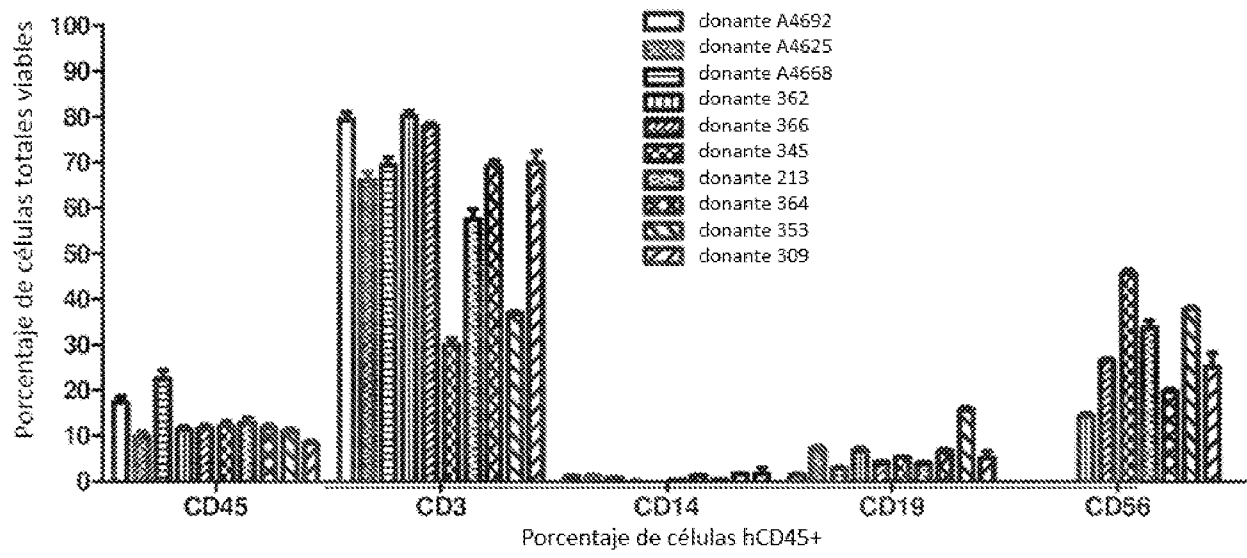


FIG. 4B

ID	Edad	Género	Raza	Peso (libras)	Grupo sanguíneo A0B	% de CD3	% de CD19	% de CD14	% de CD11C	% de CD16	% de CD56	Alelo HLA- A	Alelo HLA-B	Alelo HLA-C	Alelo HLA- DRB1
362	20	M	Caucásica	120	B	74,3	4,8	15,4	19,7	5,8	4,5	01 23	40 49	03 07	03 11
366	49	M	Caucásica	176	A	83,3	8,5	5,7	9,0	3,9	6,9	0201 6801	35 40	03 04	04 15
345	39	M	Caucásica	250	0	49,9	3,3	28,2	39,8	16,5	6,5	31 32	07 40	03 07	04 15
213	25	F	Caucásica	210	0	66,3	10,4	26,7	34,5	11,5	10,5	02 02	35 56	01 04	11 01
364	65	F	Caucásica	189	0	63,3	8,1	18,4	23,2	10,4	6,5	11 26	35 45	04 17	11 103
353	21	M	Estadounidense de raza negra	285	0	32,5	14,4	33	51	15,5	9	0201 23	5802	06 07	09 13
309	22	F	Caucásica	145	A	65	14,4	12,9	20,2	6,7	7,4	01 24	07 15	04 07	1501 1502
A4692						59,3	6,7				26,5	0207 2901	5701	1505	0701 1001

FIG.5A

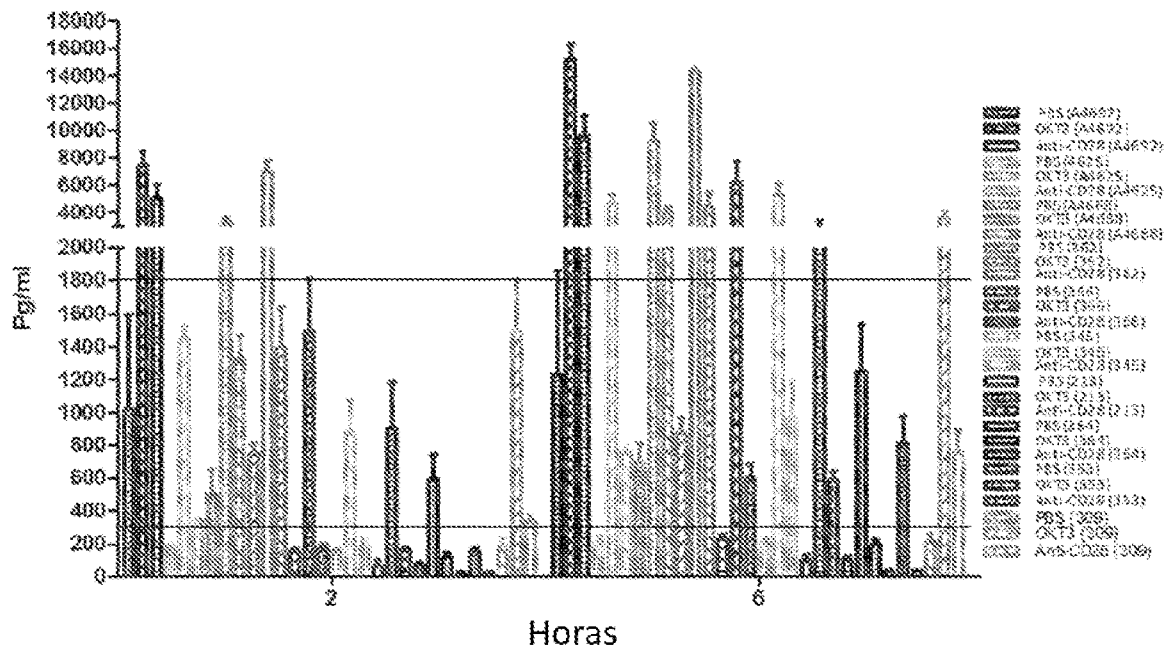


FIG.5B

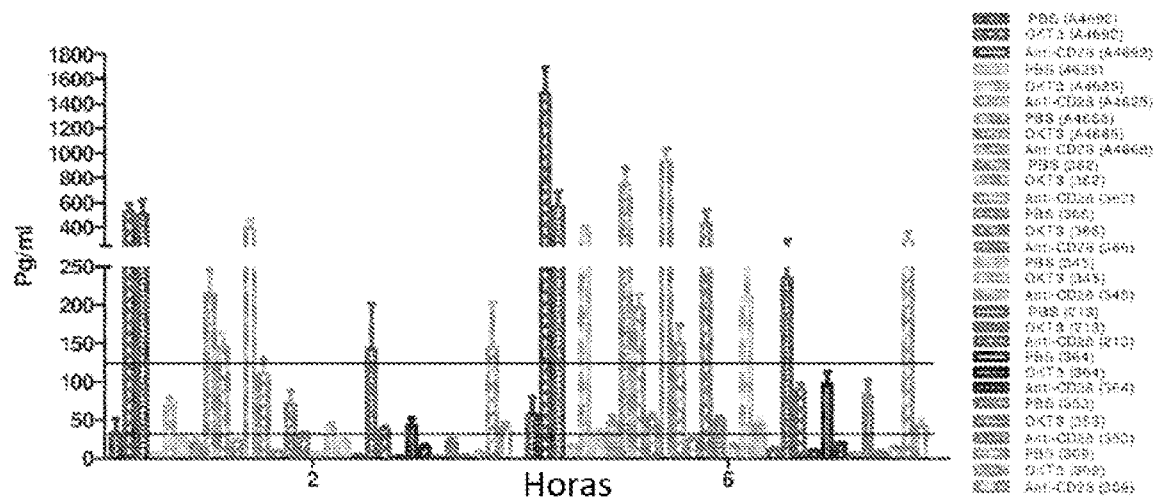


FIG. 5C

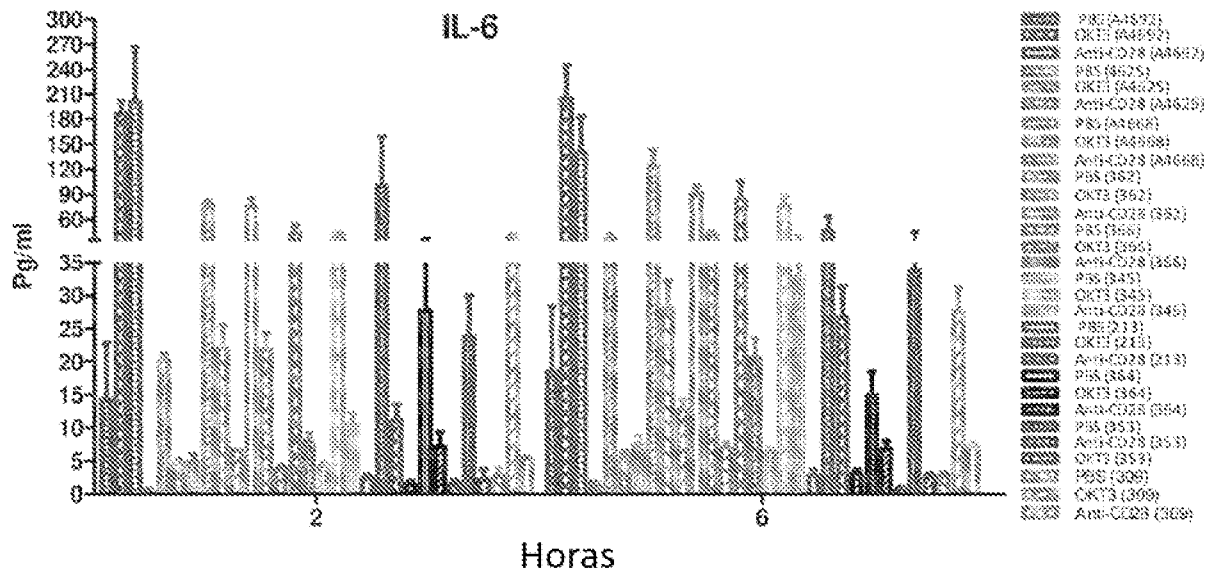


FIG. 5D

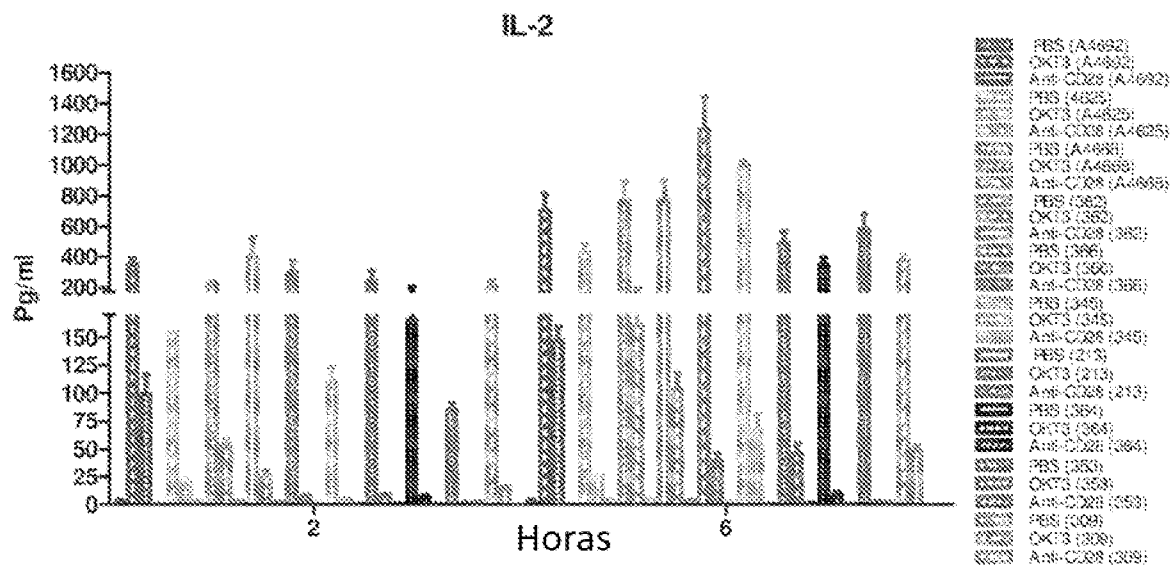


FIG. 5E

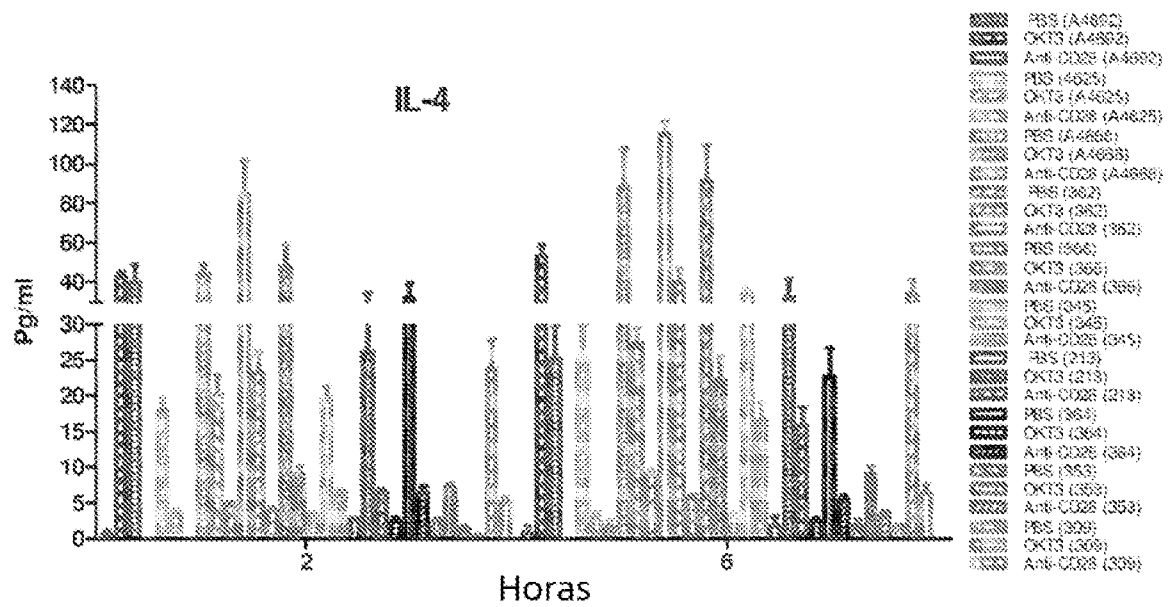


FIG. 5F

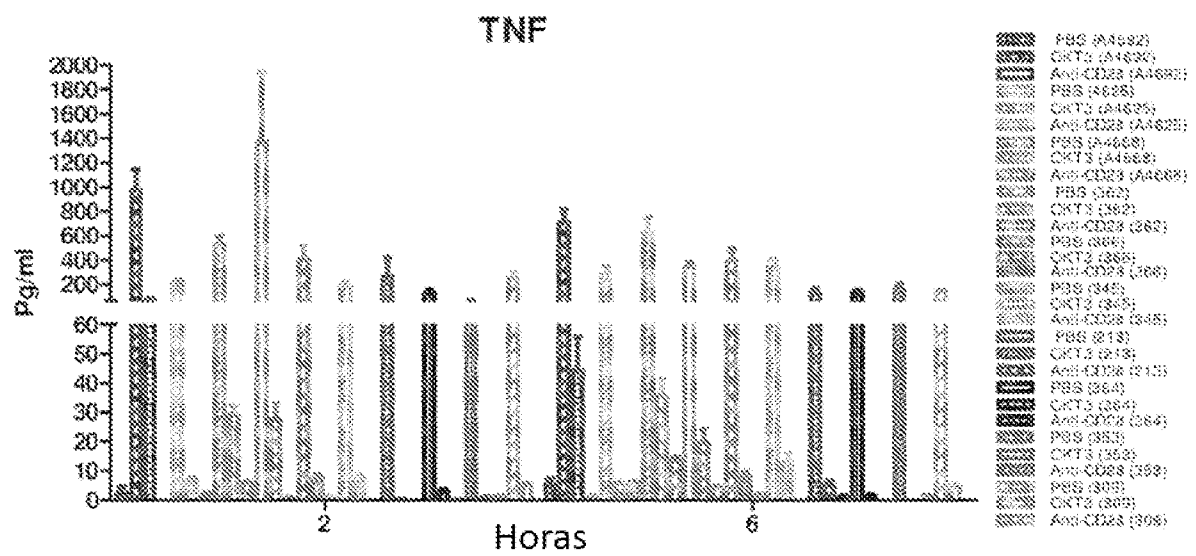


FIG. 6

Donante	IFN- γ		IL-10	
	OKT3	Anti-CD28	OKT3	Anti-CD28
A4692	>	>	>	>
A4625	>	+	>	+
A4668	>	>	>	>
362	>	>	>	>
366	>	+	>	+
345	>	+	>	+
213	>	+	>	+
364	+	-	+	-
353	+	-	+	-
309	>	+	>	+

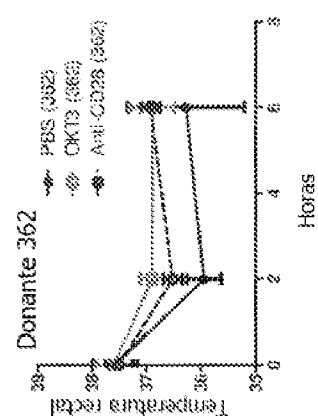
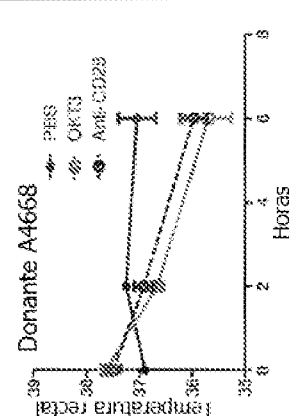
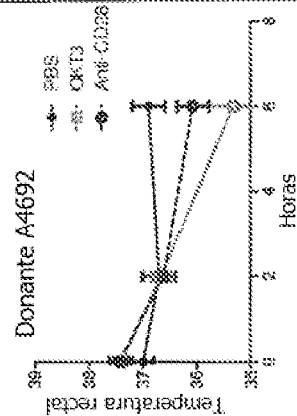
>: IFN- γ $\geq$ 1800 pg/ml o IL-10 $\geq$ 120 pg/ml

+: 300 pg/ml $\leq$ IFN- γ <1800 pg/ml o 25 pg/ml $\leq$ IL-10 <120 pg/ml

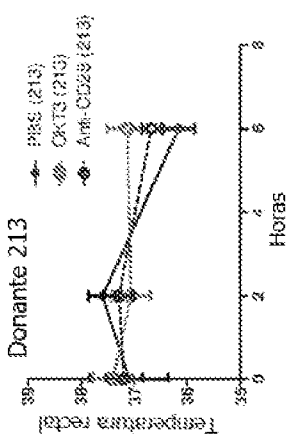
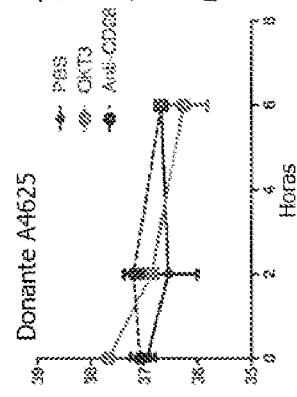
-: IFN- γ <300 pg/ml o IL-10 <25 pg/ml

FIG. 7

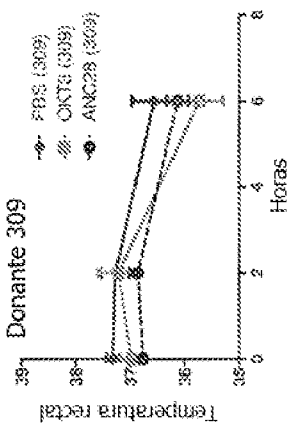
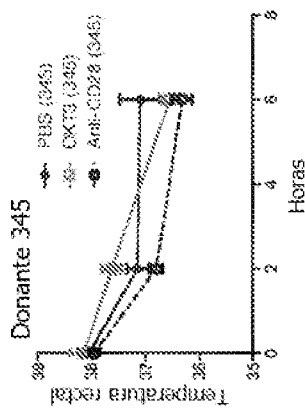
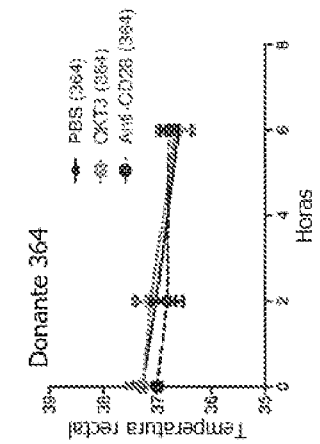
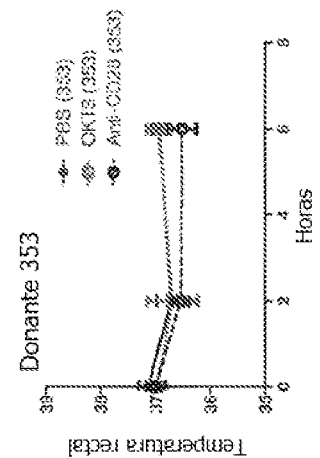
IFN- γ intensa/elevada



IFN- γ media/discreta



IFN- γ baja / ninguna respuesta



MC, 80

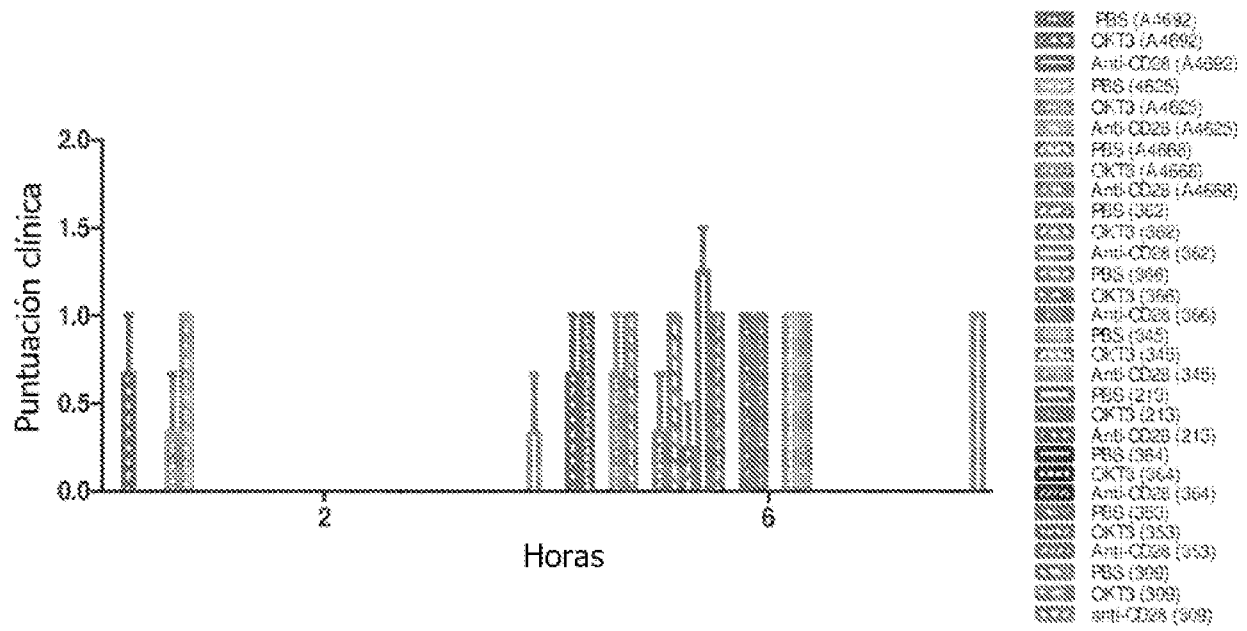


FIG.9A

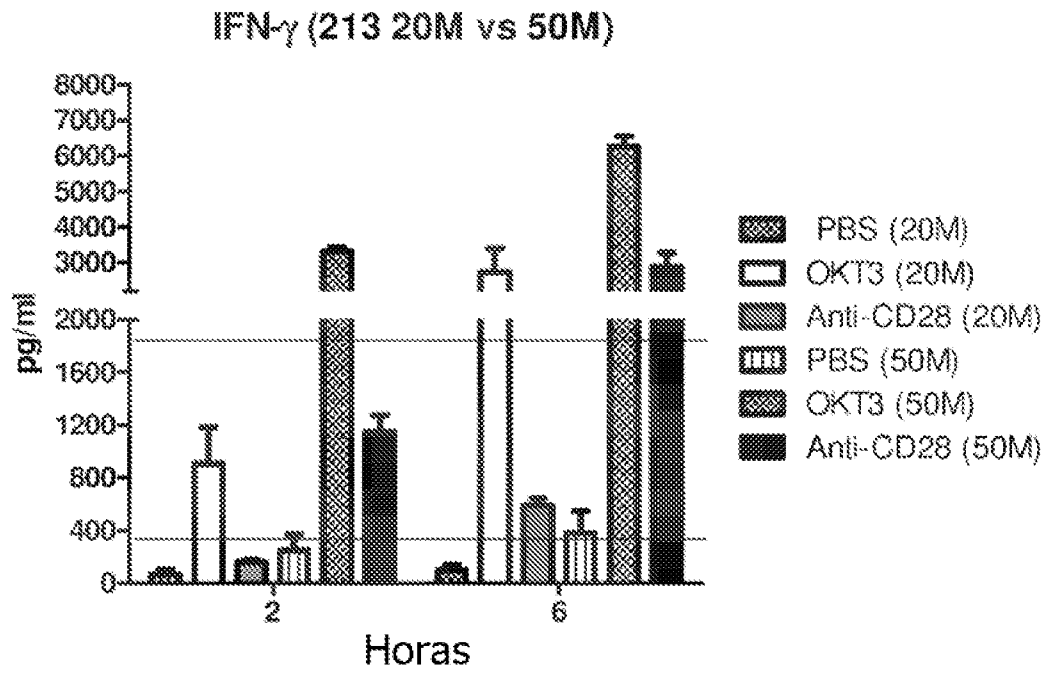


FIG.9B

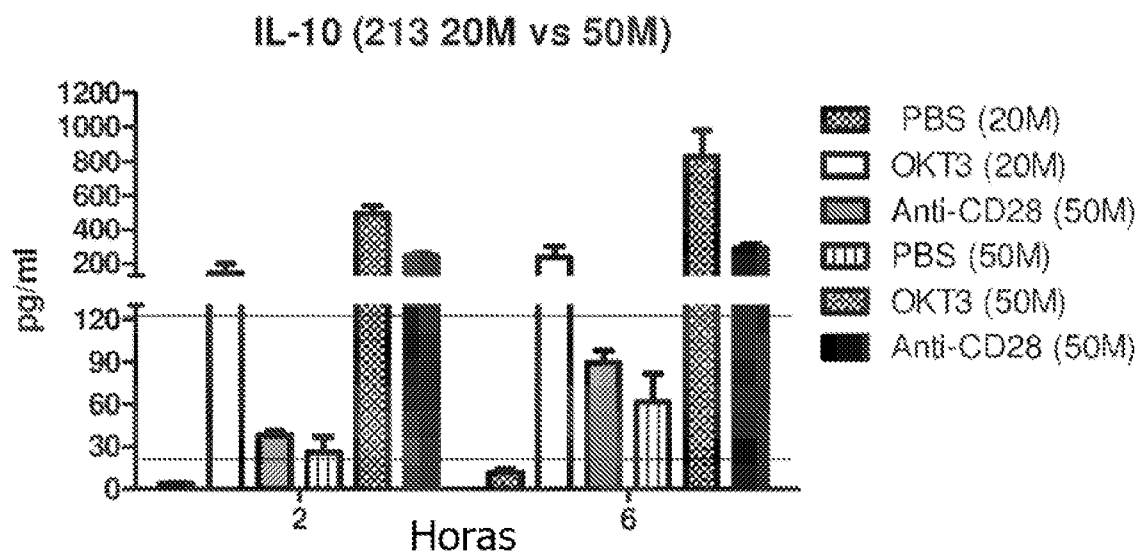


FIG.9C

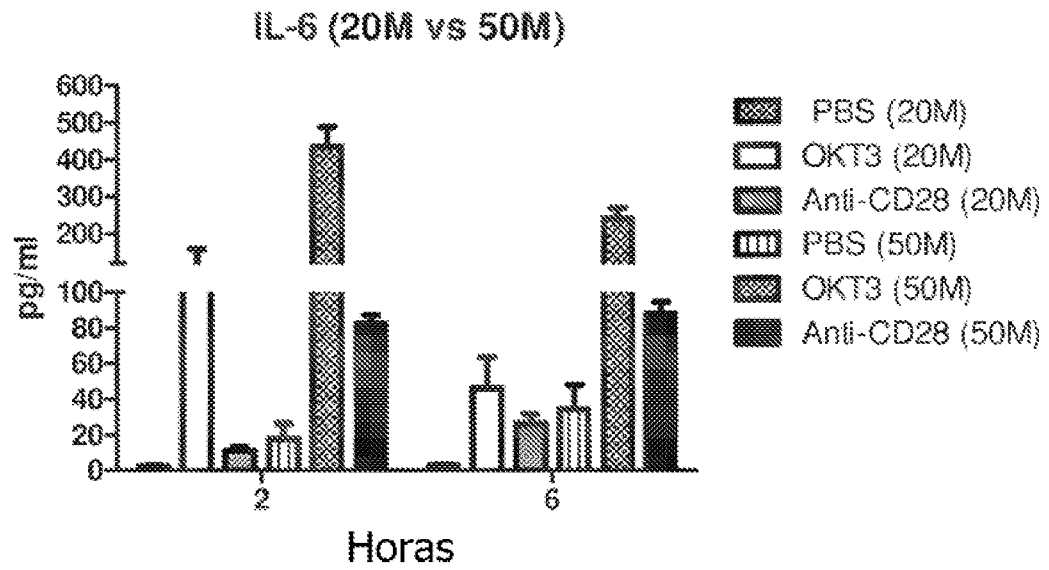


FIG.9D

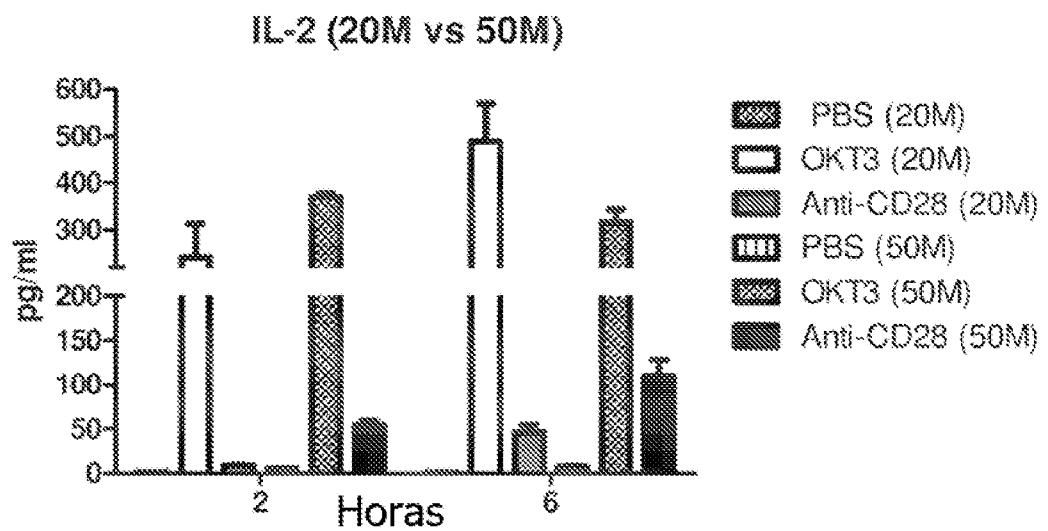


FIG.9E

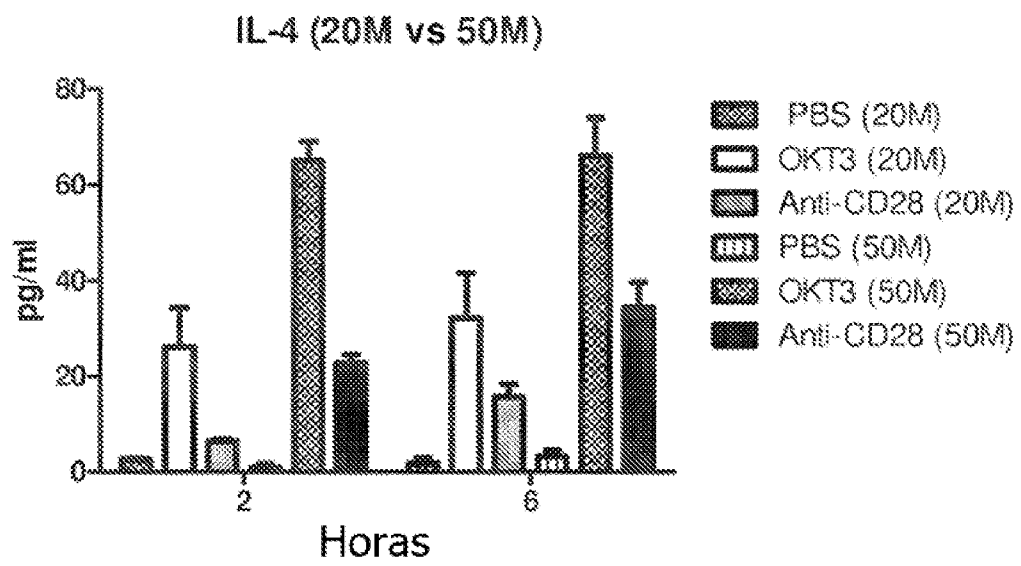


FIG.9F

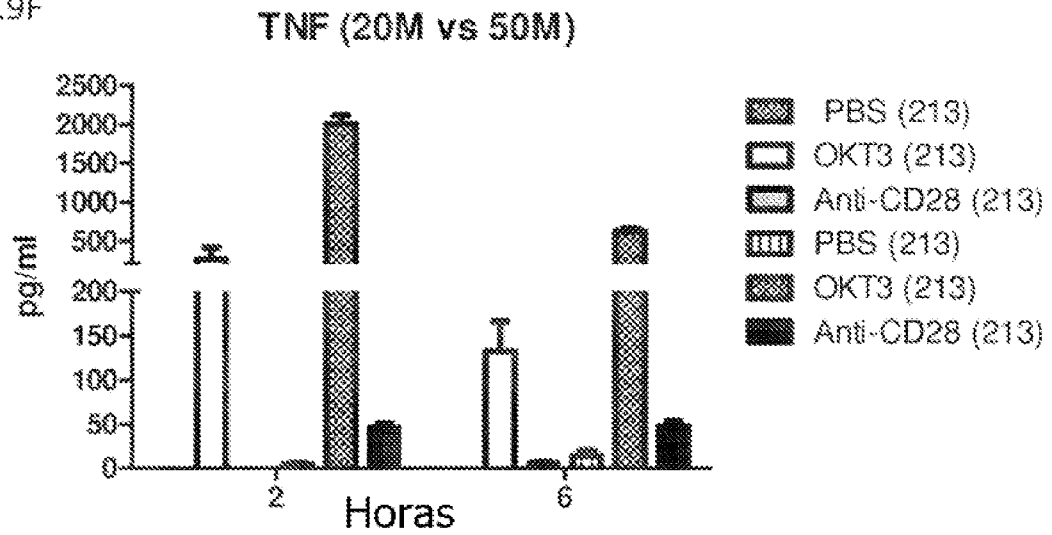


FIG.10A

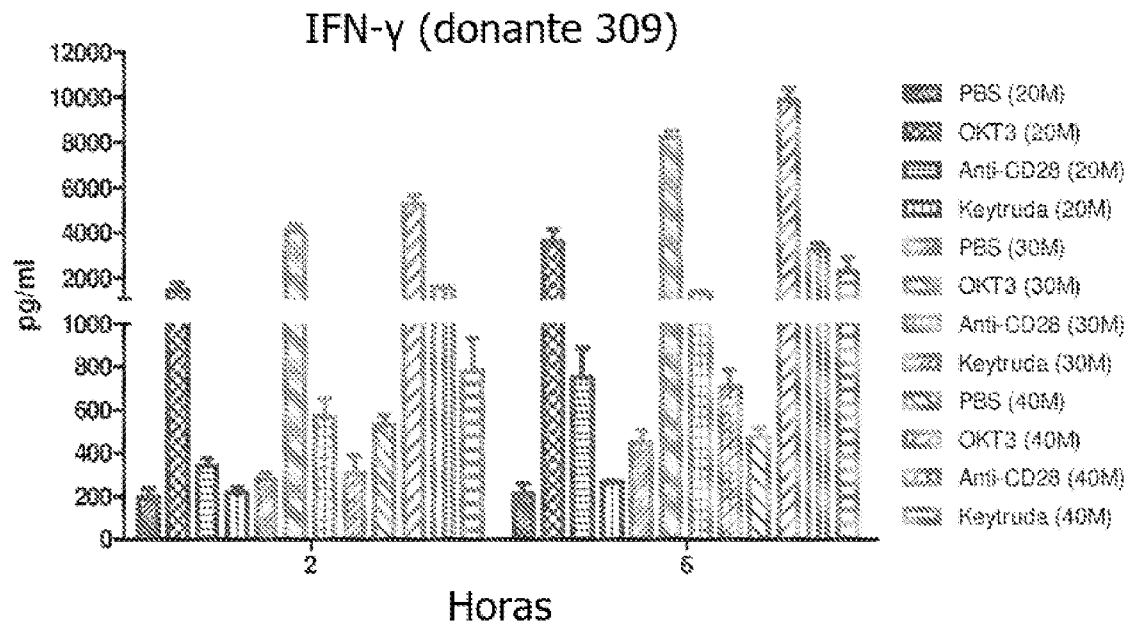


FIG.10B

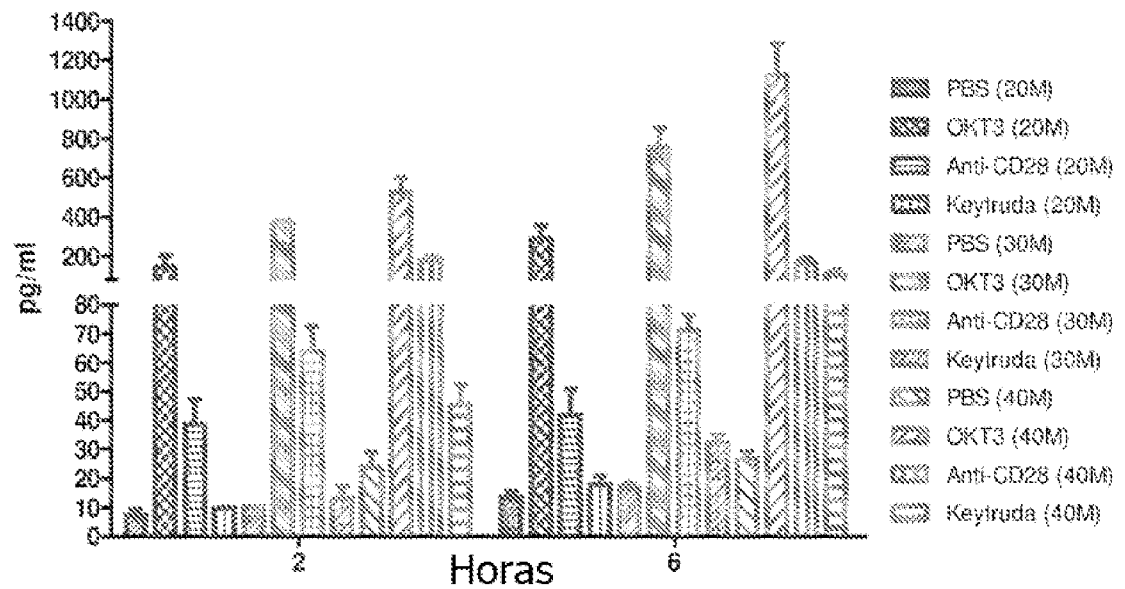


FIG.10C

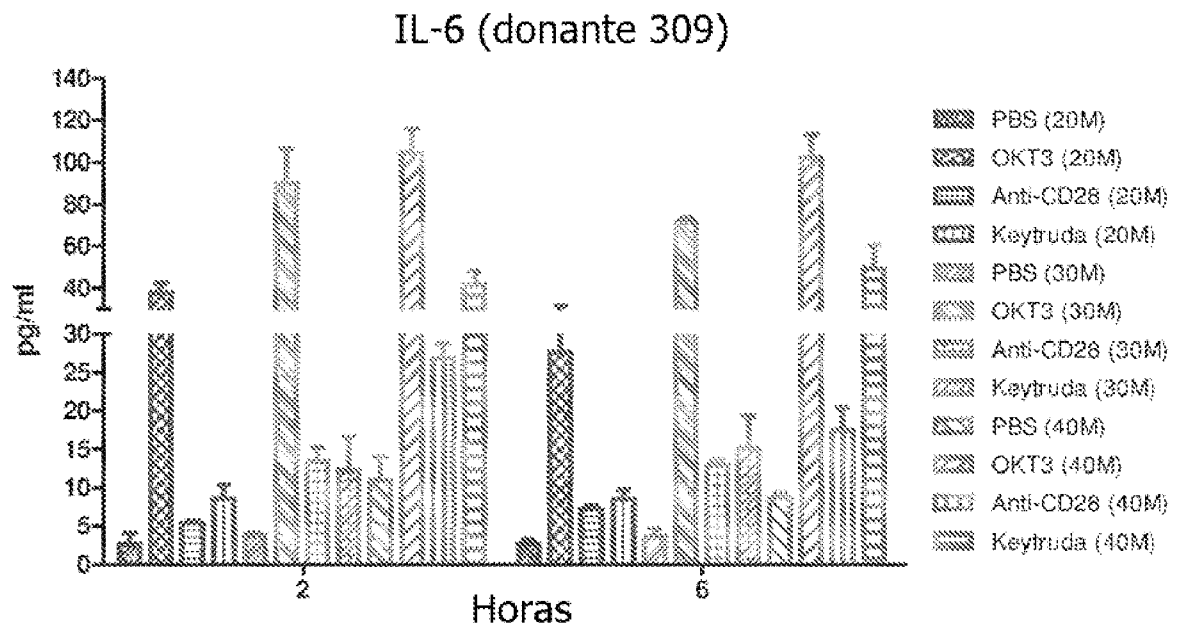


FIG.10D

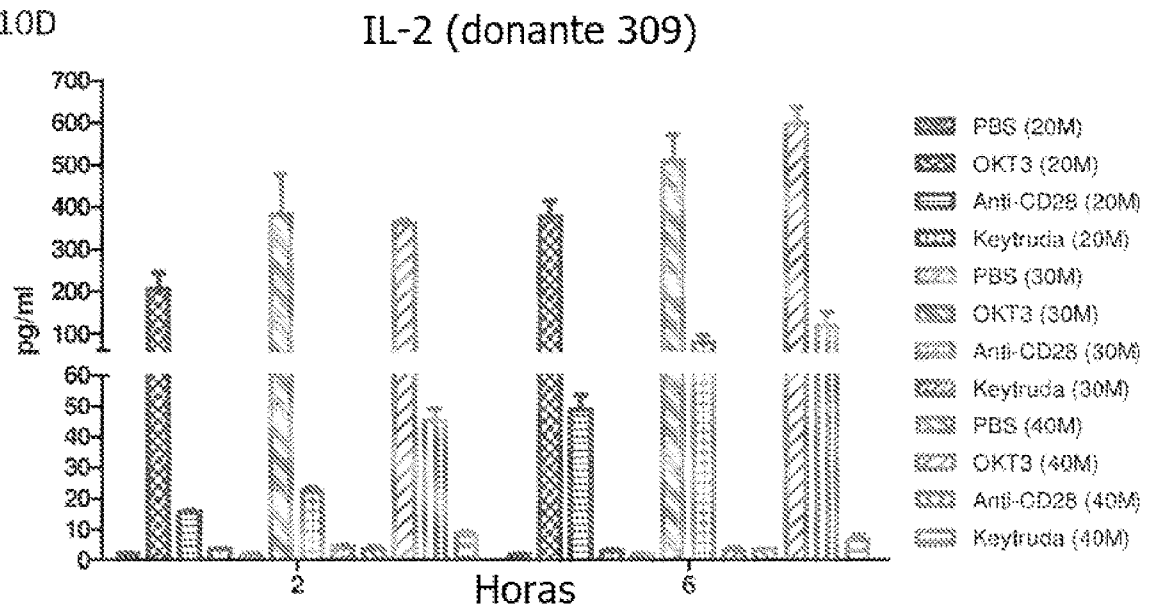


FIG.10E

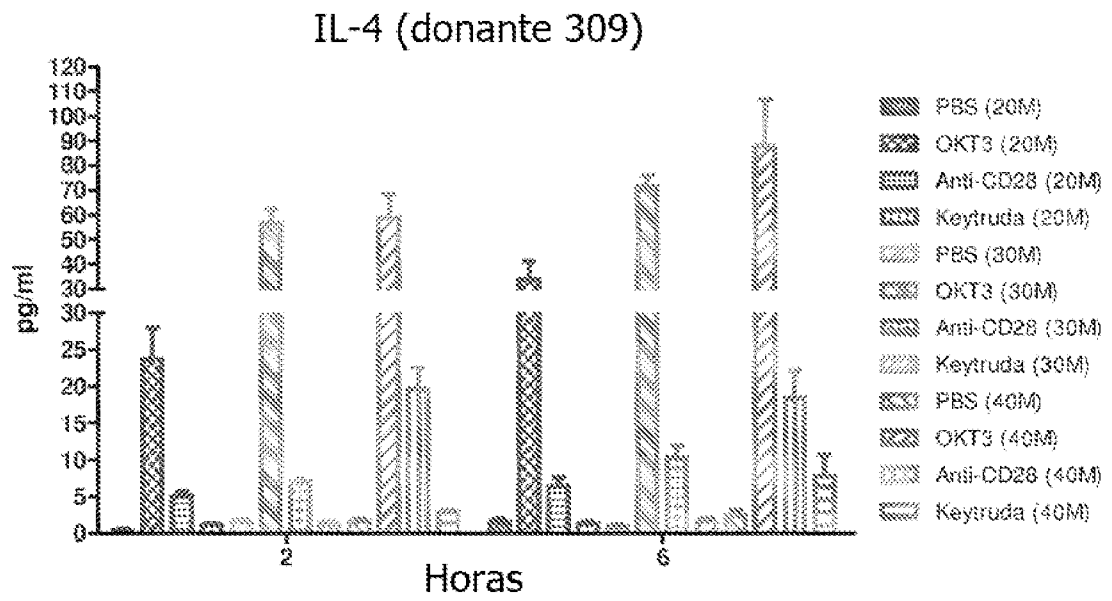


FIG.10F

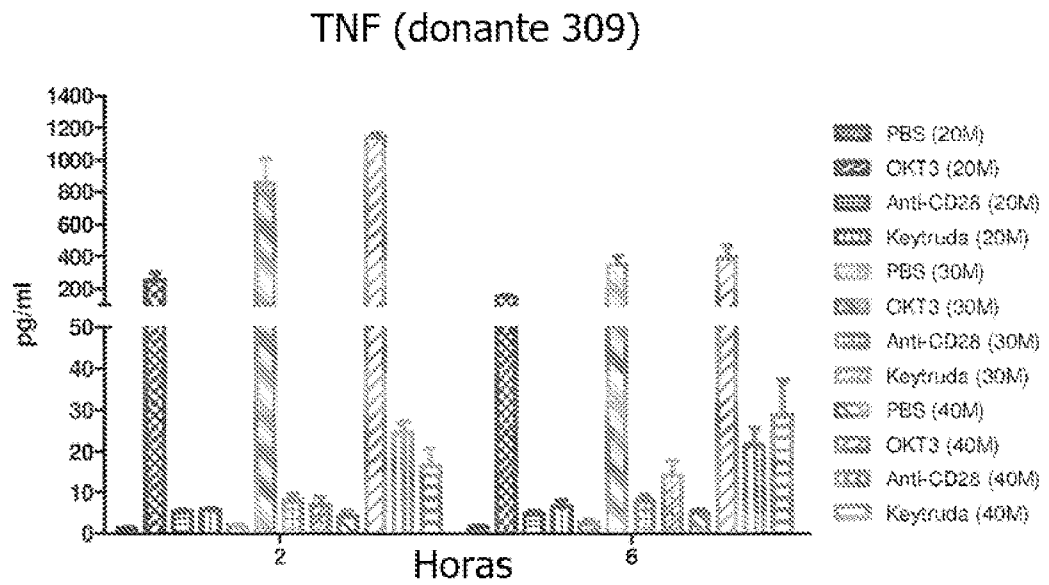


FIG.11A

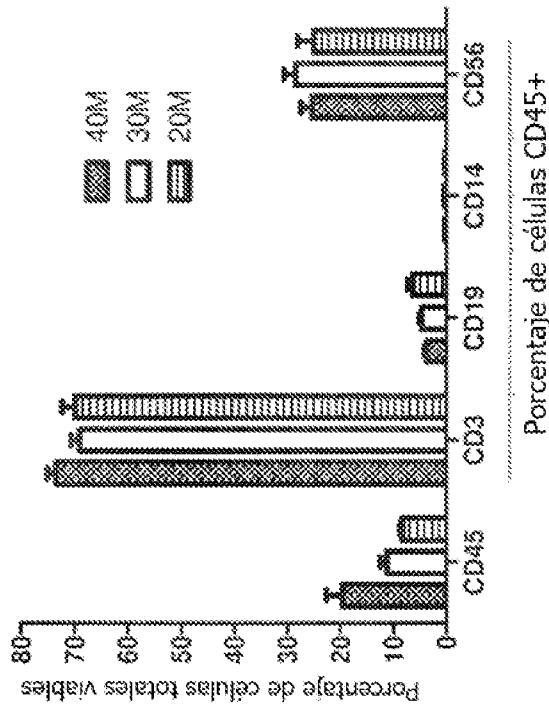


FIG.11B

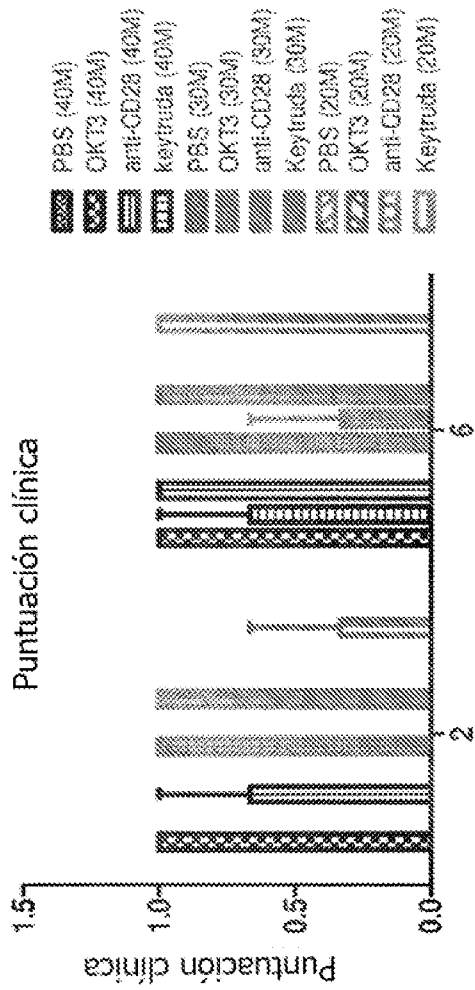


FIG.11C

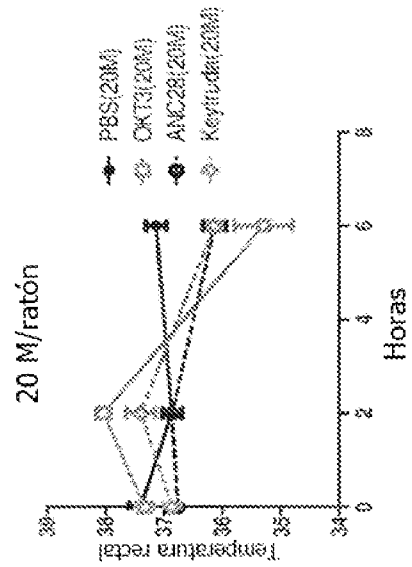


FIG.11D

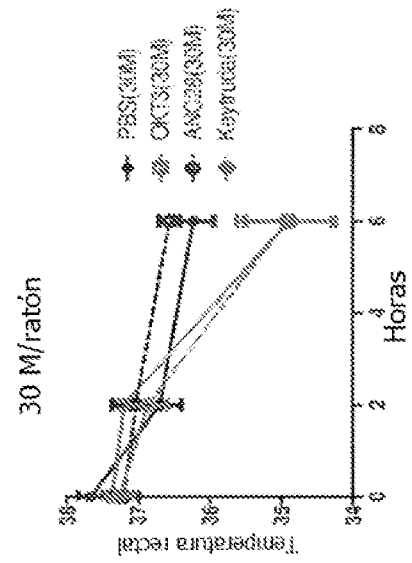


FIG.11E

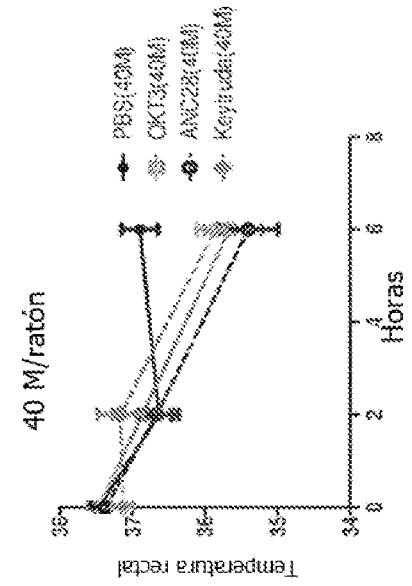


FIG.12A

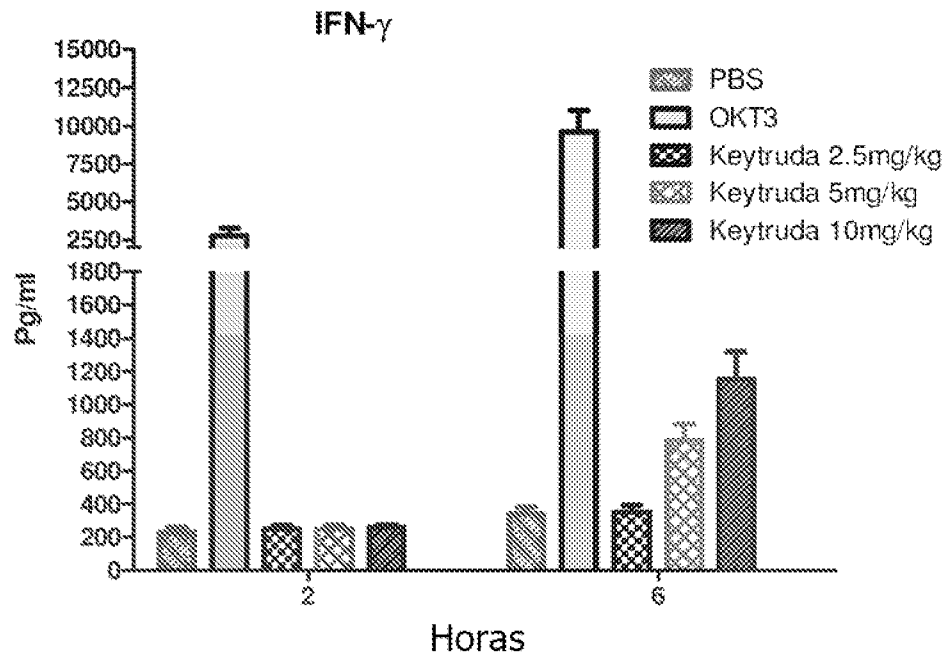


FIG.12B

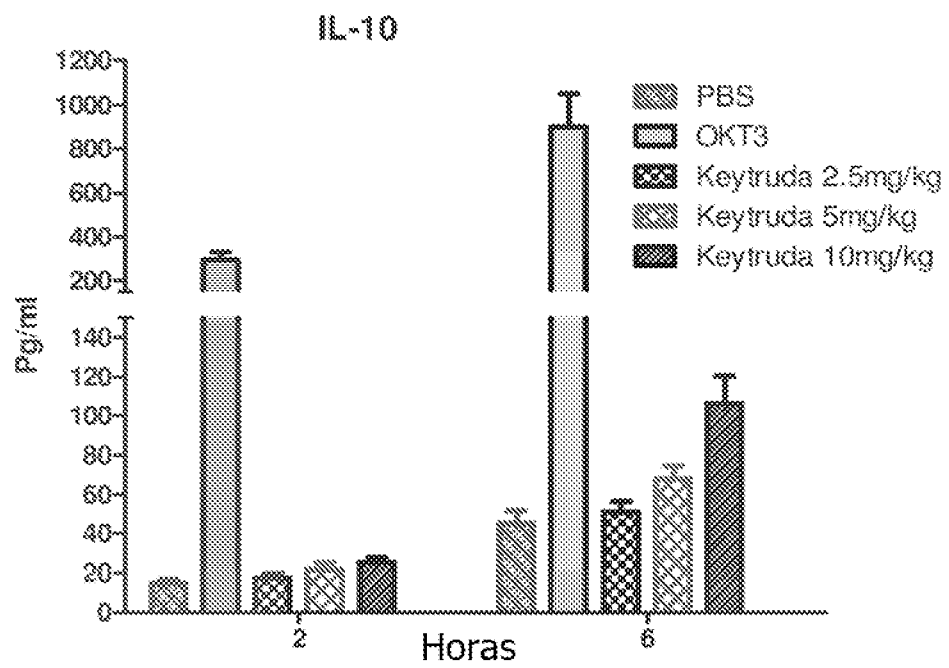


FIG.12C

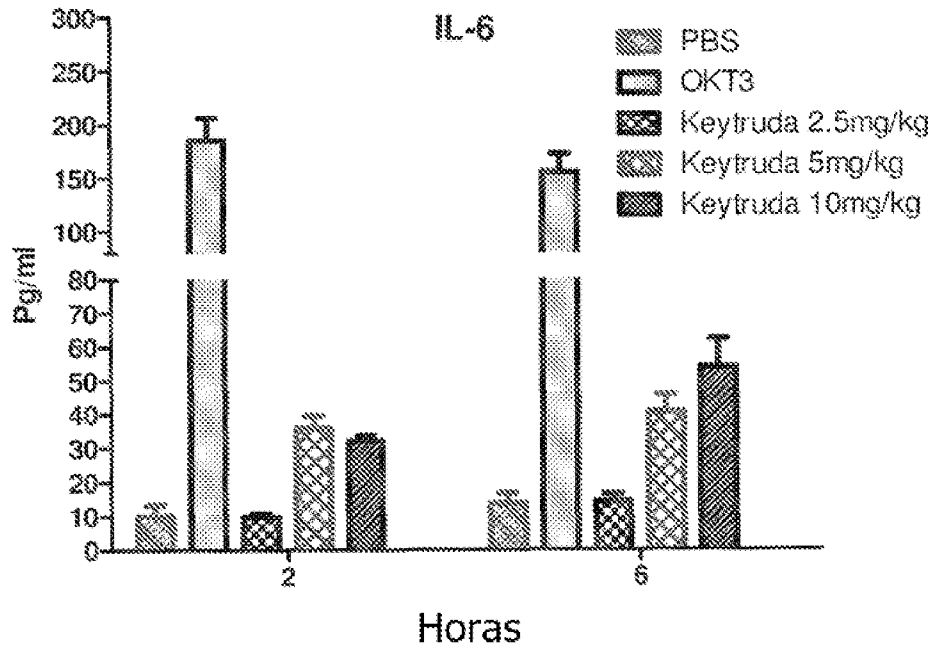


FIG.12D

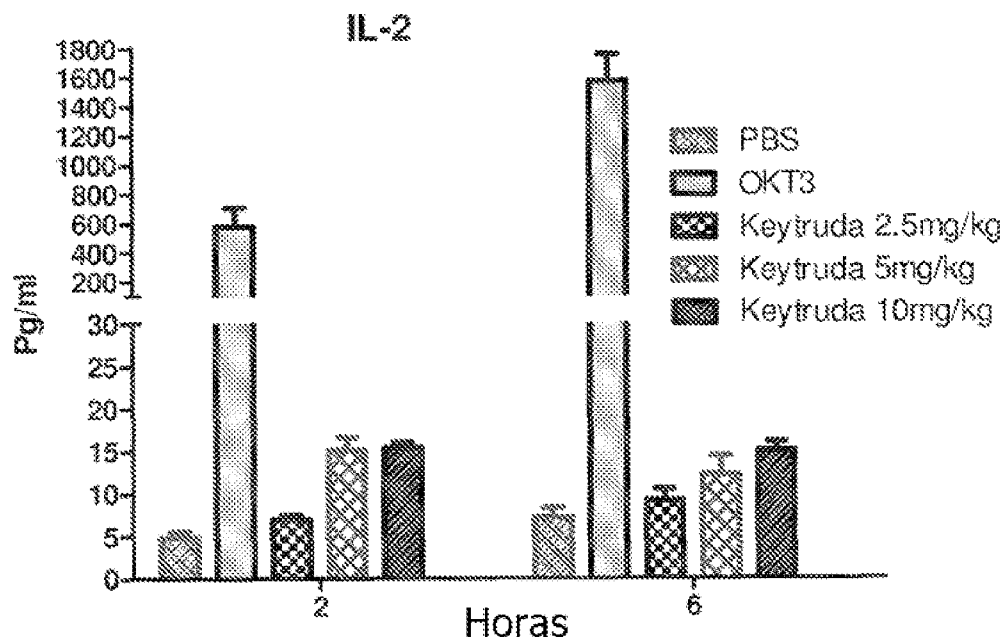


FIG.12C

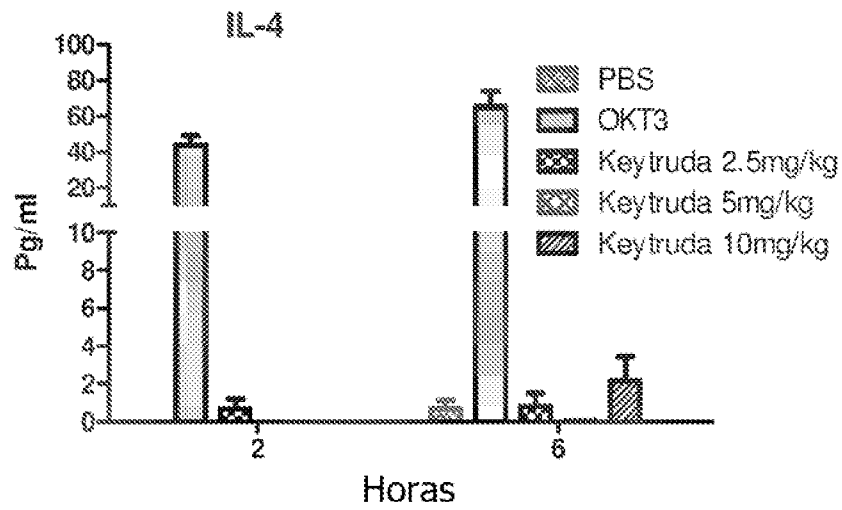


FIG.12F

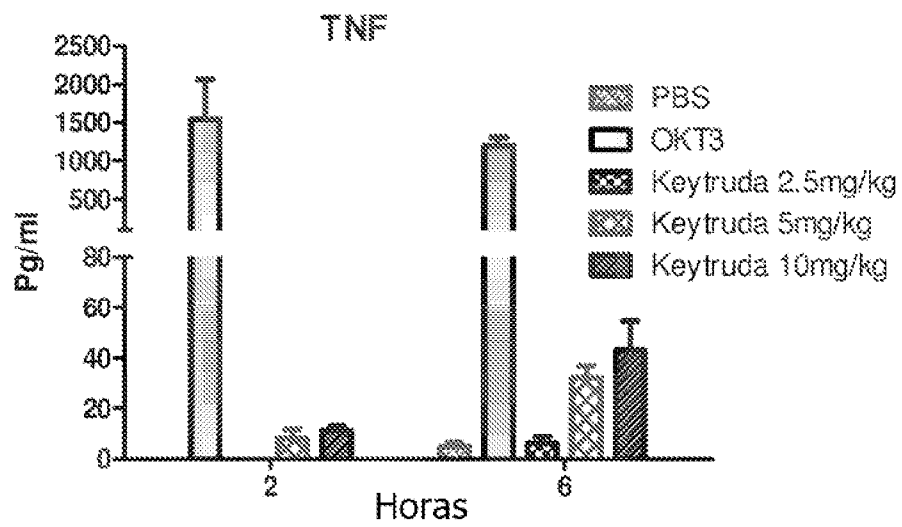


FIG. 13A

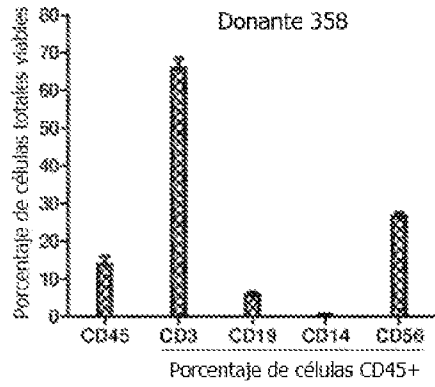


FIG. 13B

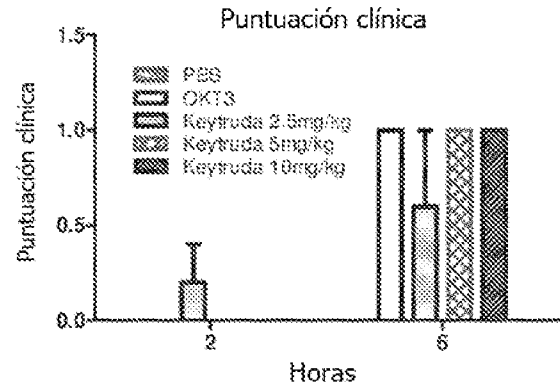


FIG. 13C

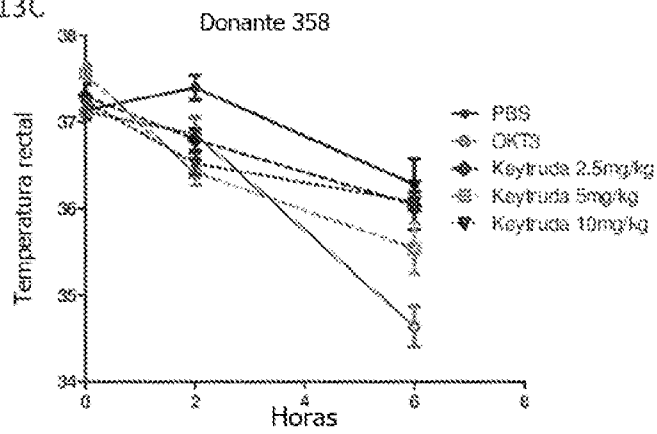


FIG. 14A

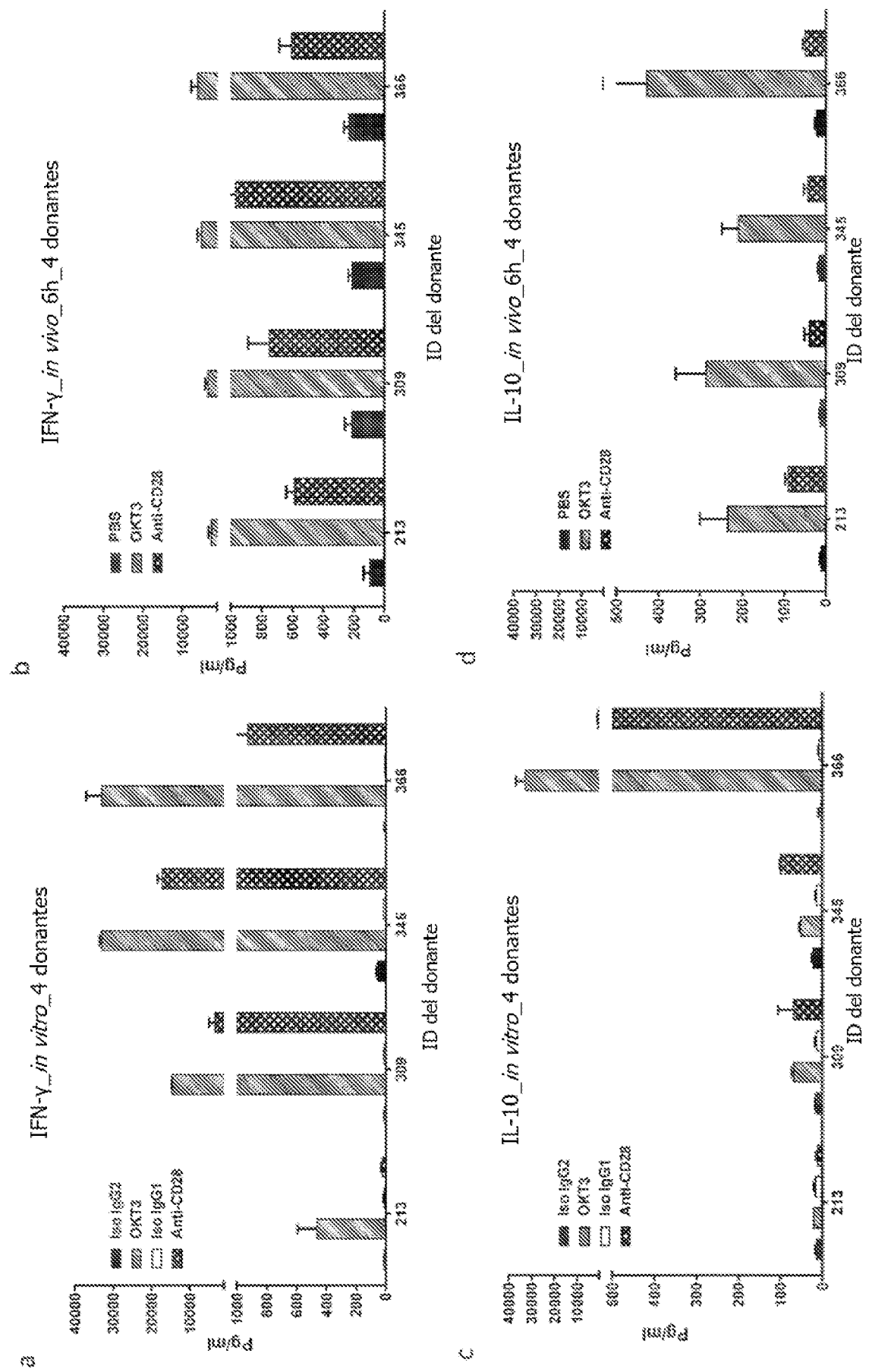


FIG.14B

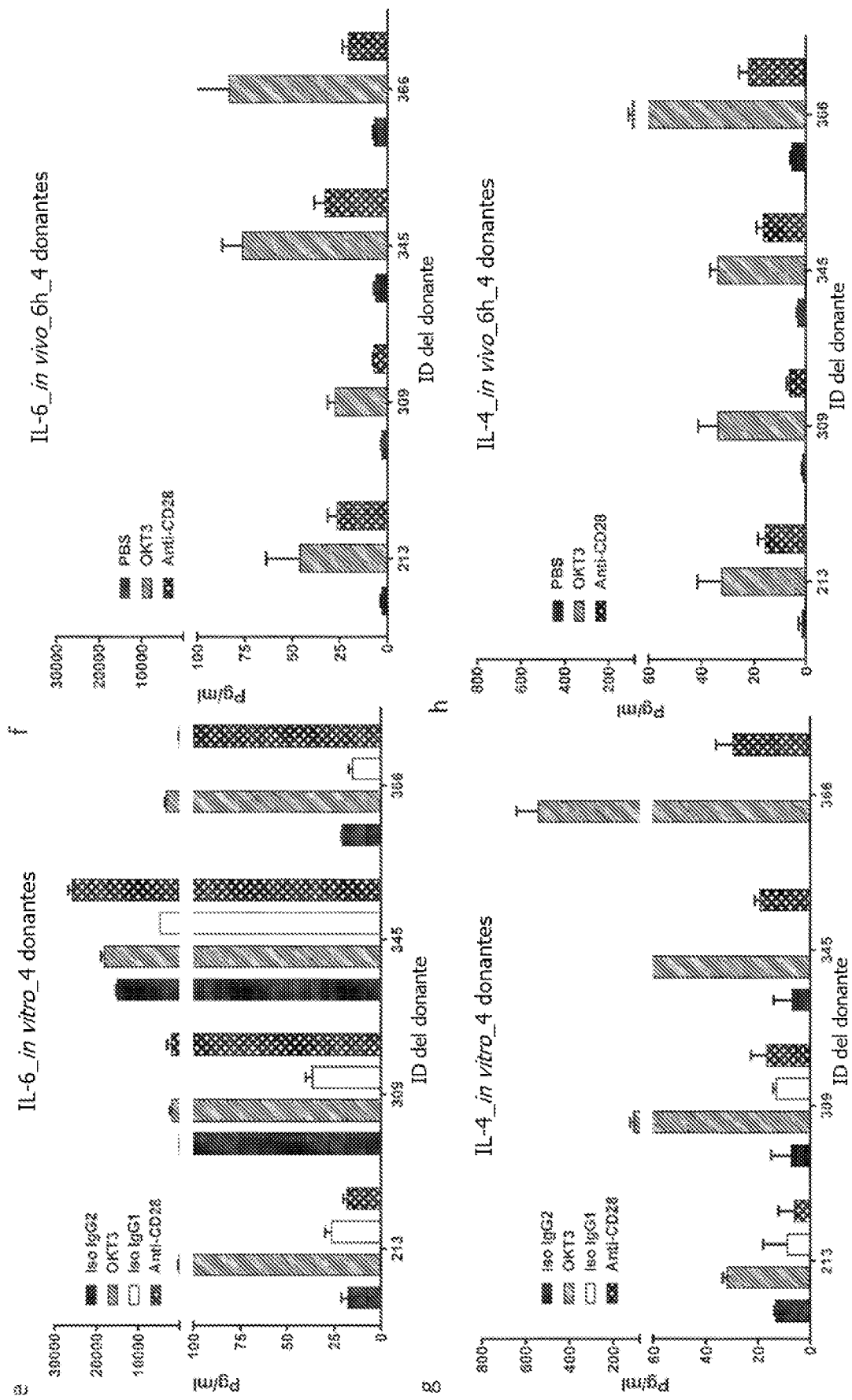


FIG. 15

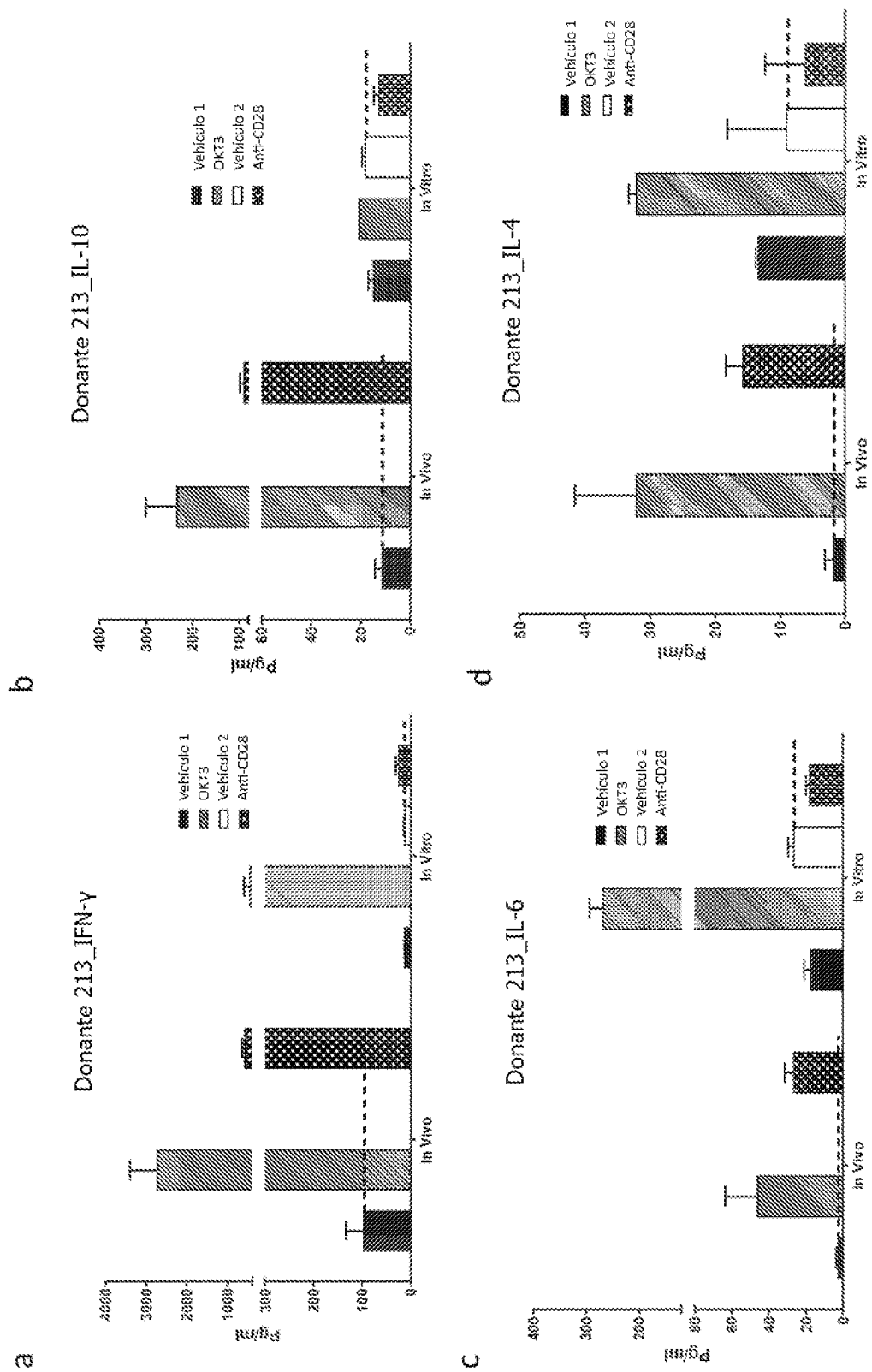


Fig.16

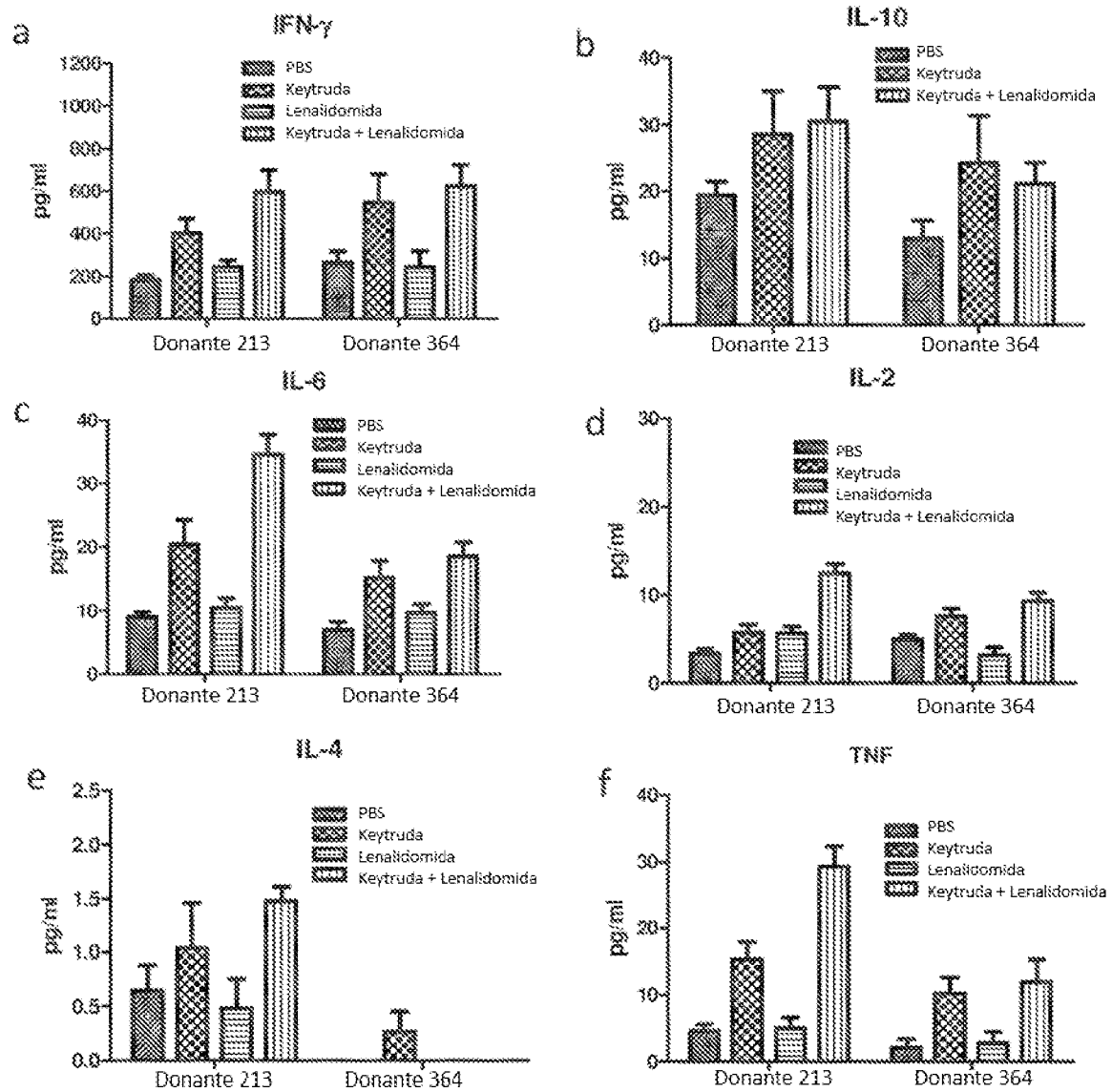


Fig.17

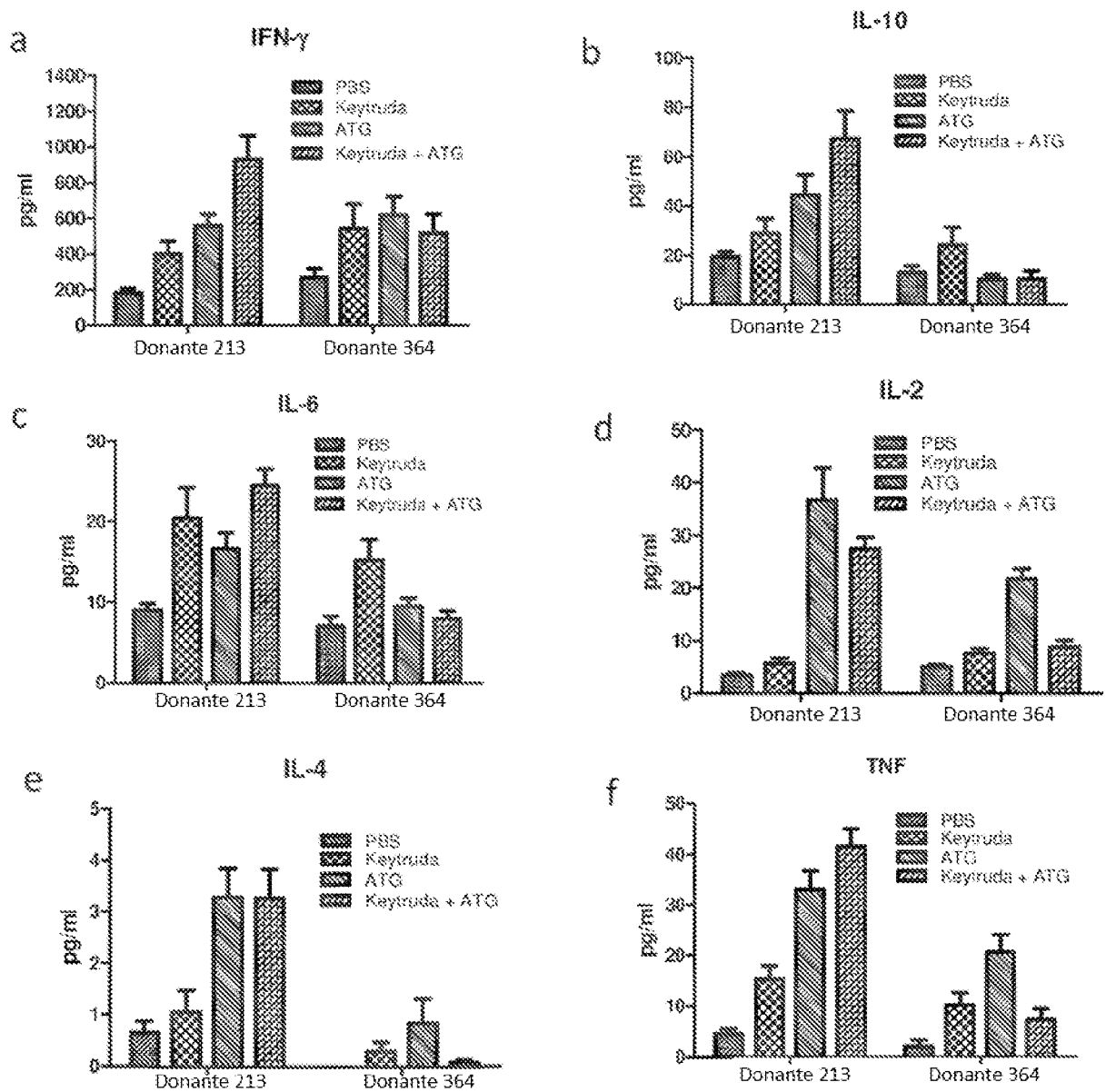


Fig.18

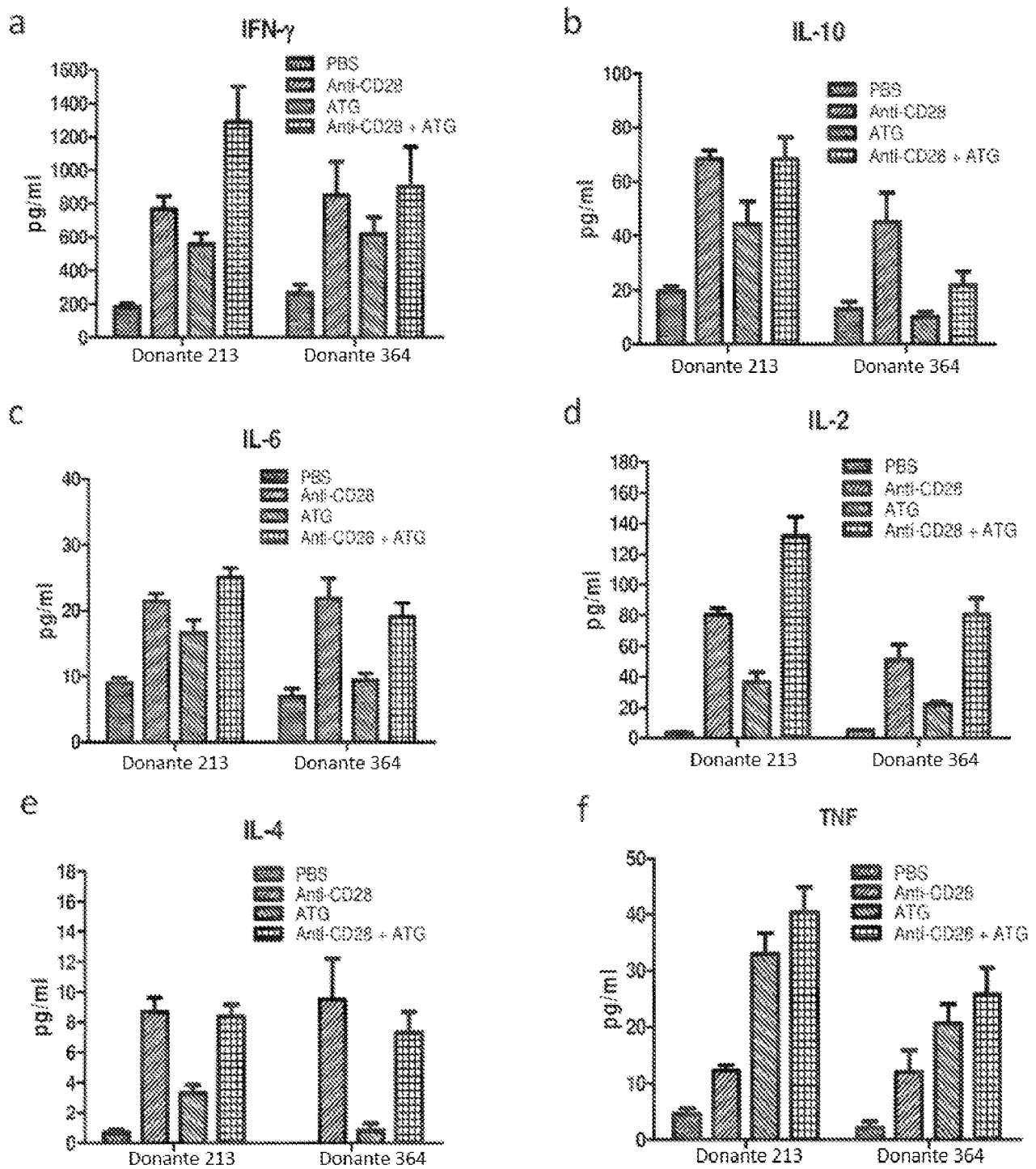


FIG. 19

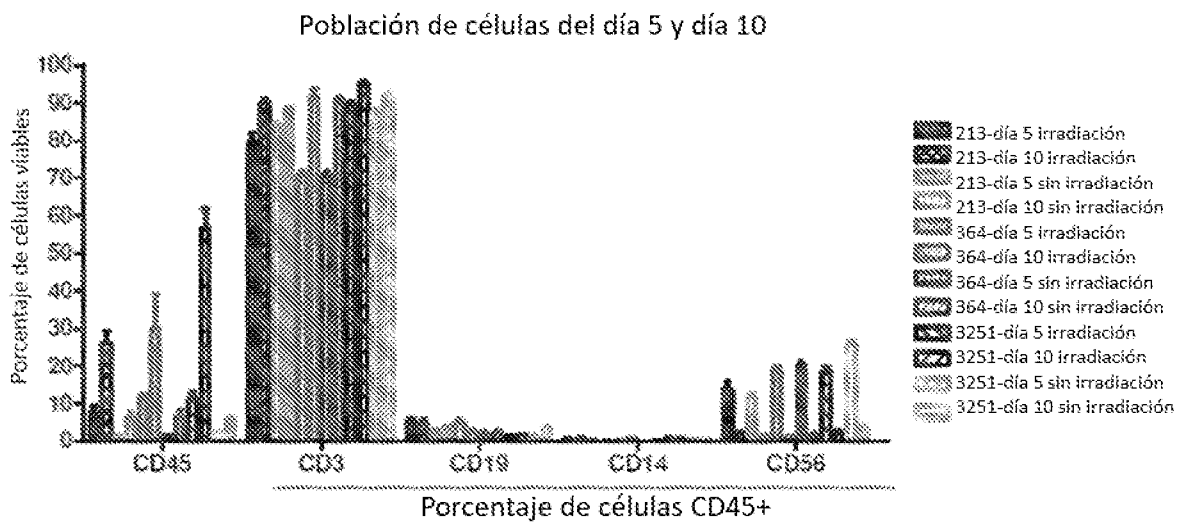
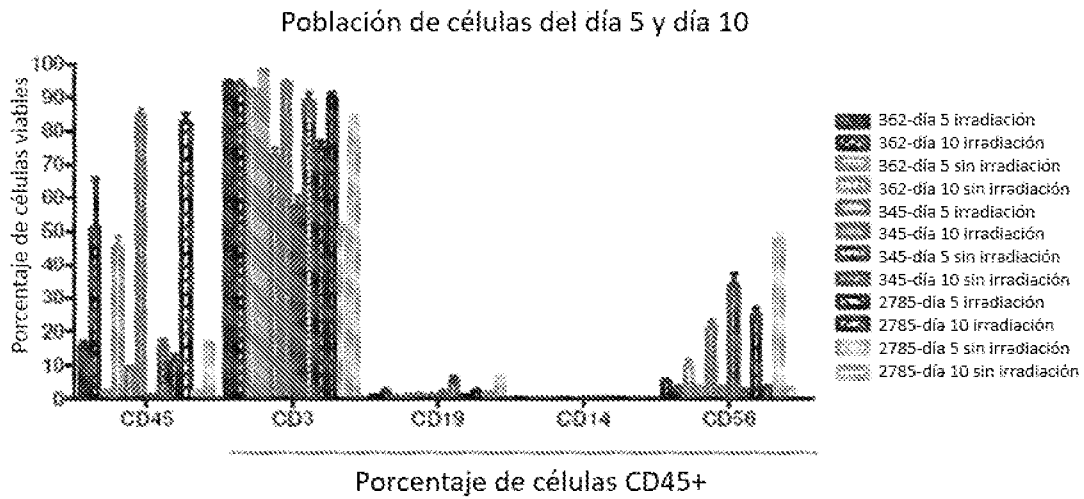


FIG. 20

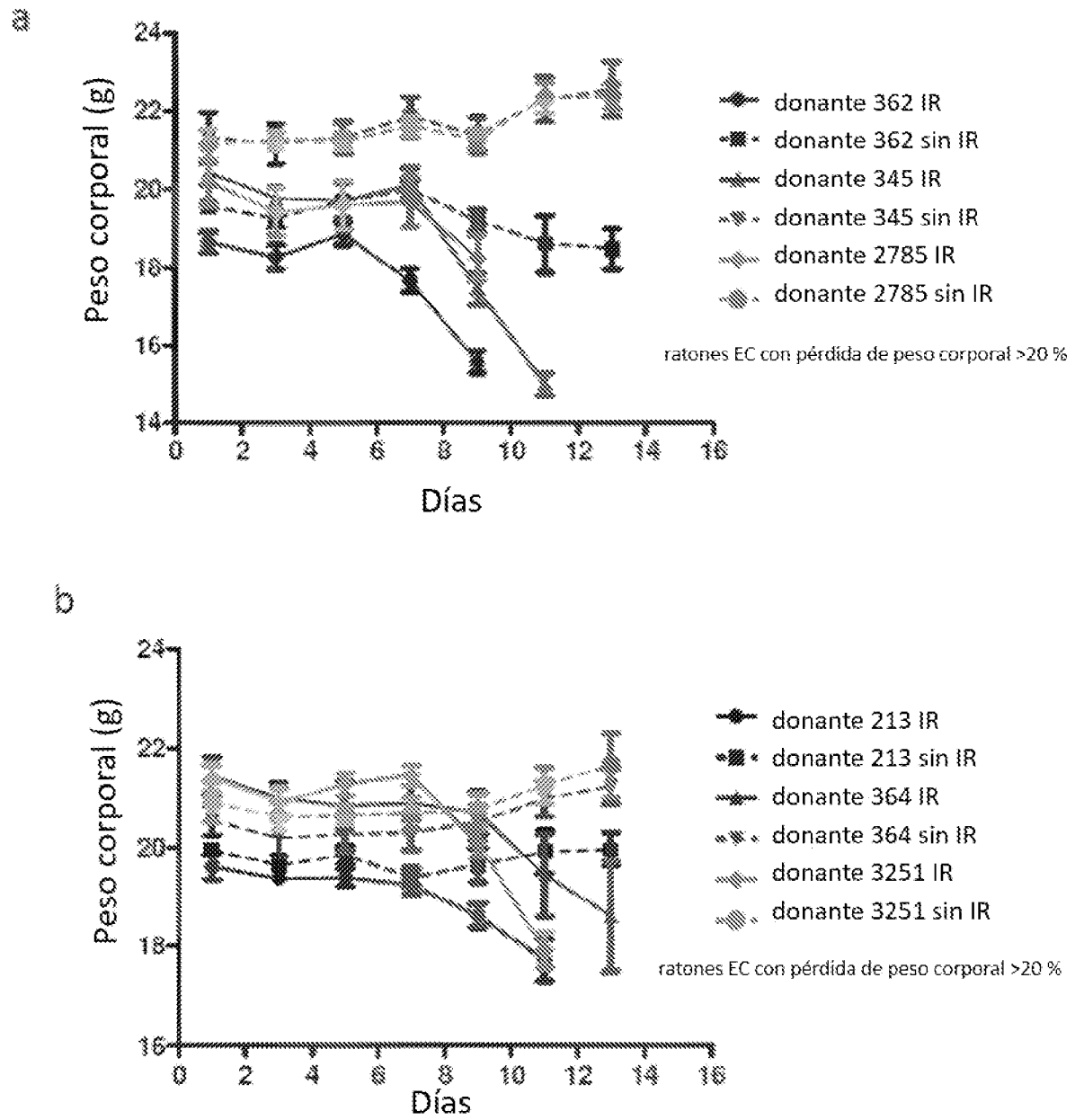


FIG. 21

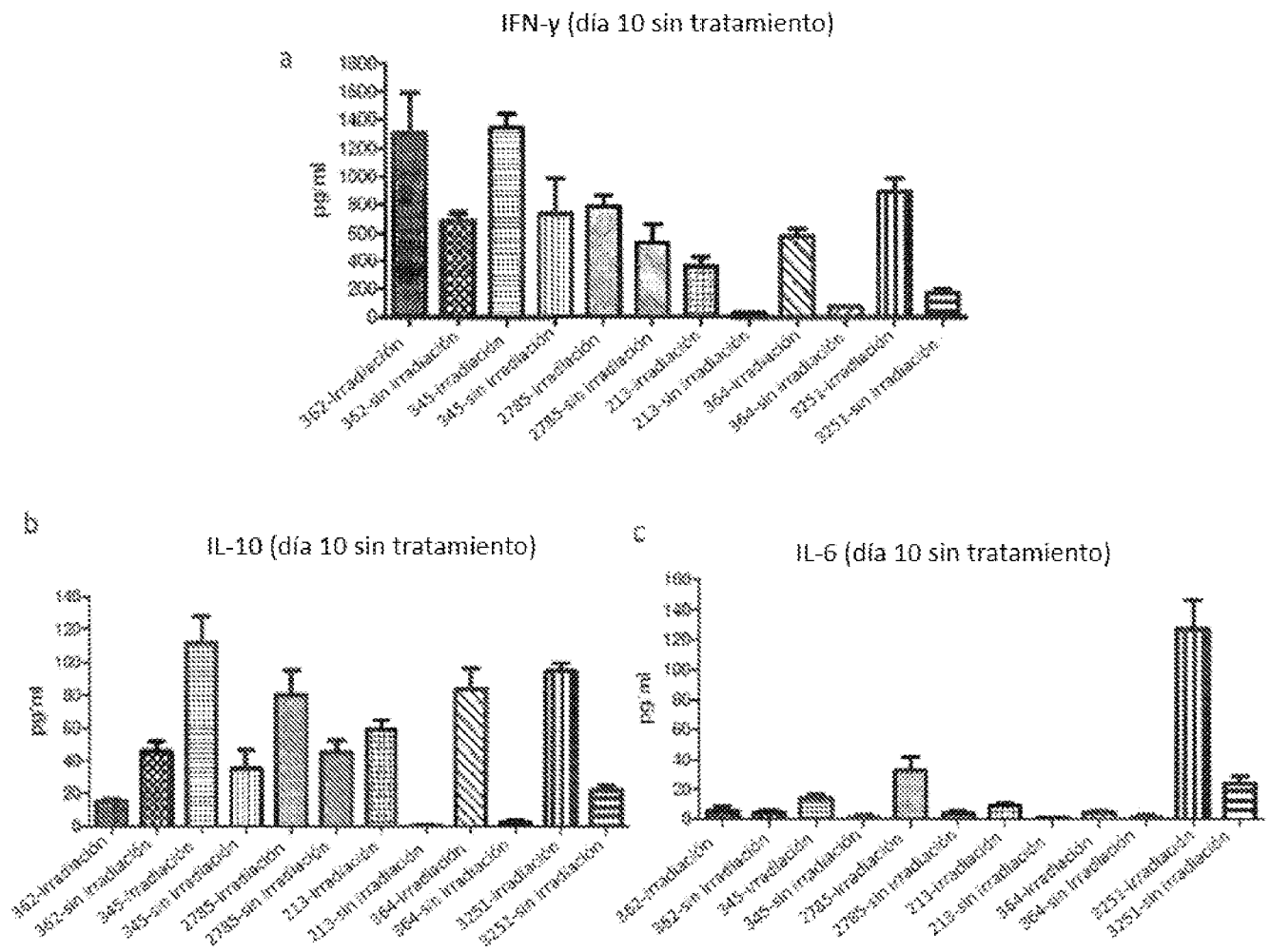


FIG. 22A

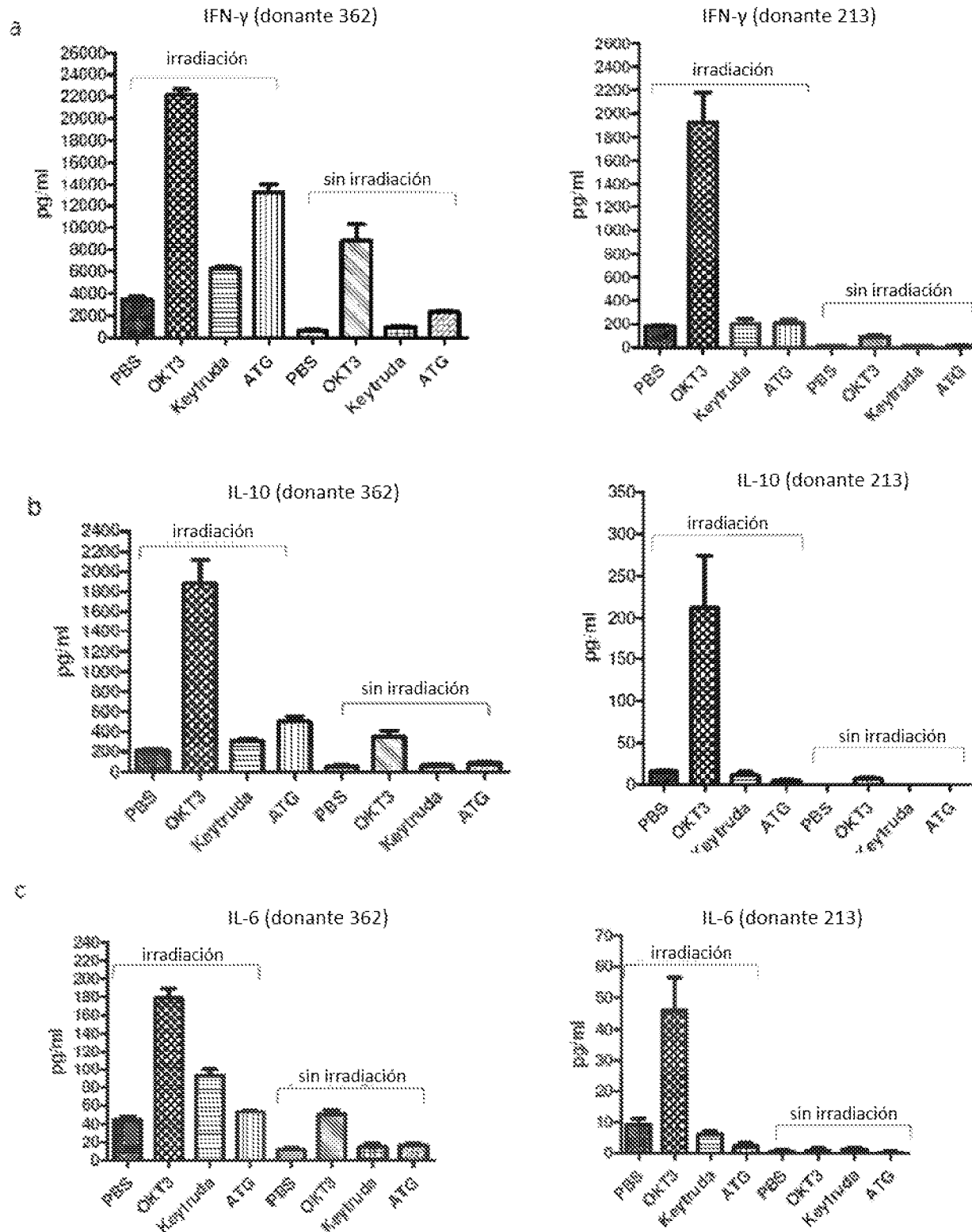


FIG. 22B

