

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 949**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C12N 5/078 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2017** **E 17382399 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019** **EP 3421994**

54 Título: **Método para predecir y monitorizar la respuesta clínica a terapia inmunomoduladora**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.02.2020

73 Titular/es:

**BIOHOPE SCIENTIFIC SOLUTIONS FOR HUMAN
HEALTH S.L. (100.0%)
C/ Santiago Grisolia nº 2, Parque Tecnológico de
Madrid
28760 Tres Cantos (Madrid), ES**

72 Inventor/es:

**DOTOR DE LAS HERRERÍAS, JAVIER;
DI SCALA, MARIANNA;
SÁNCHEZ, VERÓNICA y
PORTERO SÁNCHEZ, ISABEL**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 740 949 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 para predecir y monitorizar la respuesta clínica a terapia inmunomoduladora

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método/kit adecuado para llevar a cabo una monitorización cuantitativa de la respuesta específica de diferentes pacientes a fármacos inmunomoduladores.

10 Antecedentes de la invención

Hay muchas enfermedades en las que el principal elemento patógeno es la inflamación crónica progresiva. A diferencia del tratamiento de los brotes de inflamación aguda, que se controlan fácilmente con el control clínico actual, el verdadero caballo de batalla de estas enfermedades es detener o revertir el proceso de inflamación crónica y la destrucción progresiva del tejido que siguen a los brotes agudos sucesivos, con la consiguiente disfunción orgánica o destrucción de los órganos afectados con muchos ejemplos clínicos en este contexto, como variantes de esclerosis múltiple progresiva, artritis reumatoide, rechazo de trasplantes y muchos otros.

La inflamación crónica está asociada con muchas enfermedades humanas, incluidas las enfermedades autoinmunitarias, la aterosclerosis, el cáncer y la degeneración, entre otras. La respuesta inflamatoria, cualquiera que sea la causa, su propósito es eliminar la causa o devolver un tejido a un estado homeostático, ya esté provocado el mal funcionamiento por una sobrecarga en el tejido o en el órgano. Si las causas fueron transitorias (como después de un traumatismo o determinadas infecciones), normalmente se produce una resolución del fenómeno inflamatorio, pero si la causa es persistente o el sistema inmunitario no puede detener la respuesta iniciada, la respuesta perjudicial mantenida induce una secuencia de cambios en el sistema inmunitario y en la homeostasis del tejido afectado, que se han denominado en general inflamación crónica. Esto es típico de las enfermedades autoinmunitarias, enfermedades cuya principal base patógena es la inflamación debida a un mal funcionamiento del sistema inmunitario innato o mecanismos de tolerancia (enfermedad de Crohn) o estímulos inmunitarios constantes (asma innata, rechazo de órganos trasplantados). En estos casos, nuestras respuestas adaptativas fisiológicas que supuestamente ofrecían un beneficio a corto plazo para eliminar el ataque y reparar el tejido, se vuelven inadaptadas para convertirse en crónicas e inducir cambios destructivos en el tejido, a través de la aparición de fibrosis. La fibrosis es simplemente una respuesta derivada de una adaptación repetida a un intento de entorno adverso (provocado por cualquier motivo), que provoca un fuerte estrés en el tejido, una homeostasis y una función alteradas, lesiones y, por tanto, una necesidad de reparación constante.

La inflamación crónica es un fenómeno difícilmente reversible que provoca lesiones incapacitantes o enfermedades orgánicas específicas. La contribución real de los fármacos inmunosupresores/inmunomoduladores en enfermedades con un sustrato inflamatorio o inmunológico e inflamación crónica asociada es restablecer el equilibrio en el sistema inmunitario o el estado inflamatorio de los pacientes, revirtiendo el proceso y facilitando el desarrollo de mecanismos de reparación del tejido fisiológico.

Hay disponible una gran cantidad de medicamentos considerados como inmunosupresores e inmunomoduladores en medicina clínica con diversas aplicaciones terapéuticas. Estos se utilizan en trasplantes, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, entre otras. Se ha demostrado ampliamente la eficacia de estos fármacos para controlar los brotes agudos de estados inflamatorios. Por el contrario, cuando el fenómeno inflamatorio está entrando en un estado de cronificación o ya ha alcanzado esta fase, solo algunos de estos fármacos y combinaciones de fármacos son útiles y, en general, solo puede considerarse un éxito parcial.

En la mayoría de los estados de tipo inflamatorio, el verdadero desafío es la inflamación crónica y la fibrosis final. En los últimos años, un enfoque terapéutico basado en directrices clínicas y en evitar acontecimientos adversos evidentes en pacientes propensos a ellos, ha sido suficiente para controlar los brotes inflamatorios agudos. Esto se basa en el hecho de que todos los fármacos inmunosupresores son bastante eficaces en la inflamación aguda, de modo que no hay necesidad de un "ajuste fino" de la selección de fármacos. Pero teniendo en cuenta que los fármacos inmunosupresores/inmunomoduladores son solo parcialmente eficaces en la prevención y el tratamiento de estados crónicos, se necesita un enfoque más sólido para la selección de la combinación de fármacos más adecuada. Actualmente, tal como se explicará más adelante, no existe una herramienta de eficacia/potencia para anticipar qué fármacos serán mejores para cada paciente, en un ámbito clínico que necesita con urgencia una mejor metodología para ayudar al médico a tomar la decisión de qué fármacos/combinaciones deben usarse para tratar a cada paciente específico.

Fue solo a través del descubrimiento, la evolución y el uso rutinario de los fármacos inmunosupresores que la supervivencia aumentó y la calidad de vida mejoró en muchos estados clínicos de base inmunitaria. Sin embargo, a pesar de estos avances glamurosos, es importante tener en cuenta el mecanismo que subyace a la inmunosupresión: los inmunosupresores amortiguan el sistema inmunitario del cuerpo, que es esencial para la vida, de modo que resulta crítico intentar un equilibrio entre la eficacia para tratar el estado clínico y no disminuir demasiado la función inmunológica, de modo que puedan aparecer acontecimientos adversos graves (infecciones y

cáncer).

Los inmunosupresores seleccionan como diana varias células del sistema inmunitario que muestran las siguientes características:

- 5
- Son células que circulan por la sangre, residentes en los tejidos o de órganos linfoides.
 - Están representadas en lo que se denomina "PBMC" (*peripheral blood mononuclear cells*, células mononucleares de sangre periférica) convencionales de laboratorio, fáciles de obtener a partir de muestras de sangre.
 - 10 - Son células capaces de ser "activadas" con varios estímulos que se denominan "señales de peligro" en general: en las infecciones son microorganismos y moléculas de virus, en la autoinmunidad es un autoantígeno, en el trasplante es el tejido alogénico que impulsa esta activación, y en otros estados es un mal funcionamiento del sistema inmunitario innato o el fallo de los mecanismos de tolerancia.
 - Después de la activación, entran en una fase de expansión clonal rápida, en la que se dividen exponencialmente.
 - 15 - Las células tras la proliferación activadas resultantes circulan hasta el tejido diana y entran en una fase efectora de ataque, como linfocitos citolíticos o células formadoras de anticuerpos.

20 Los inmunosupresores, en diferentes puntos de las cascadas bioquímicas que siguen a la activación, inhiben la expansión clonal, impidiendo así que un gran número de células efectoras articulen un ataque a los tejidos diana. Sin embargo, es esencial comprender que no todos los pacientes responden de la misma manera a cada inmunosupresor. Con estas diferencias, no solo se encuentran diferencias farmacocinéticas sino también diferencias farmacodinámicas importantes. Esto significa que hay diferencias en la respuesta de PBMC de diferentes personas a los inmunosupresores, probablemente basado en el genotipo y las causas epigenéticas. En este sentido, el complejo de HLA específico y otros factores de cada paciente (genotipo), así como el perfil inmunitario específico en un determinado punto de tiempo (epigenético/fenotipo), influyen fuertemente en la respuesta a los inmunosupresores.

30 Los regímenes de inmunosupresión varían desde simples tratamientos de monoterapia hasta combinaciones muy complejas que implican la administración de cócteles que combinan hasta 4-5 fármacos diferentes, como modo de garantizar una eficacia máxima de la inmunosupresión. Actualmente, no hay un modo personalizado de determinar qué fármacos o combinaciones de fármacos son más apropiados para cada paciente. La decisión de qué fármacos usar para un determinado paciente se basa únicamente en dos factores:

35 1) Directrices clínicas: un panel de expertos considera y revisa un resumen de ensayos clínicos realizados con inmunosupresores para redactar recomendaciones, que indiquen los tratamientos de primera y segunda línea. Esto se basa solo en los resultados de ensayos clínicos, lo que implica resultados estadísticos agrupados de varias cohortes de pacientes en una variedad de países, edades, momentos después del inicio de la enfermedad, enfermedad subyacente y estado inmunitario. Por tanto, es válido para recomendaciones generales, pero las directrices clínicas no son herramientas para determinar cuál de los tratamientos sería mejor para un paciente específico con un estado y un perfil inmunológico específicos.

40 2) Acontecimientos adversos frecuentemente asociados con fármacos. Los médicos eligen fármacos con un perfil de acontecimientos adversos compatible con la situación biológica y funcional del paciente (como la función hepática, el estado cardiovascular, etc.). Existen herramientas clínicas para abordar este problema que funcionan adecuadamente para el objetivo.

50 Este control clínico claramente carece de una herramienta para determinar la potencia (eficacia) de los fármacos inmunosupresores sobre las células inmunitarias de los pacientes, que en realidad son las células diana de los inmunosupresores/inmunomoduladores. Este "ensayo de potencia" identificaría aquellos inmunosupresores que pueden ser más eficaces para cada paciente en un determinado punto de tiempo. Se necesita un ensayo funcional porque no es posible anticipar, por ejemplo, basándose únicamente en estudios farmacogenéticos, cuál será el efecto de las terapias inmunomoduladoras sobre las células del sistema inmunitario de un paciente específico. Con las diferentes respuestas de los inmunosupresores, hay muchos factores (genéticos, epigenéticos, etc.) que combinados solo pueden abordarse de manera suficiente con ensayos biológicos funcionales que aborden el "perfil de respuesta inmunitaria" final del paciente en un determinado punto de tiempo. Los regímenes de tratamiento deben cambiarse a lo largo de la vida del paciente porque la eficacia del tratamiento varía con el tiempo a medida que el perfil inmunológico evoluciona con el tiempo en las fases posteriores del estado clínico (algo similar a la resistencia a los antibióticos con infecciones que se prolongan en el tiempo).

60 El documento WO 2013/025543 A1 describe chips celulares para someter a prueba la toxicidad de medicamentos *in vitro* y un método de preparación de los mismos que comprende inmovilizar células en una matriz biológica tridimensional (3D) de, por ejemplo, colágeno, Matrigel y alginato.

65 El documento US 2015/101070 A1 describe un método de examen para seleccionar agentes antineoplásicos

específicos del paciente que reflejen propiedades genéticas individuales para el desarrollo del campo médico personalizado. Se mezclan células cancerosas aisladas de tejidos tumorales de un paciente en hidrogel (gel de alginato), se someten a un cultivo tridimensional sobre un micropilar y las células cancerosas en cultivo tridimensionales se exponen a un fármaco candidato.

El documento US 2010/056390 A1 proporciona un sistema de cultivo celular tridimensional que comprende uno o más tipos de células de interés incorporados en un hidrogel natural o sintético (por ejemplo, un hidrogel basado en alginato). Las células incluyen células primarias derivadas del paciente. El sistema se usa para someter a prueba las respuestas celulares a fármacos.

Actualmente, no hay ningún modo de determinar cuál es el mejor esquema de inmunosupresores para cada paciente, sino por prueba y error: los médicos comienzan con algunos de los fármacos de primera línea y si el estado clínico no mejora o incluso empeora, cambian a fármacos de segunda línea. Este enfoque de prueba y error conlleva un gran riesgo para el paciente porque, si se produce un error, puede conducir a inflamación crónica irreversible y fibrosis del tejido. Para aquellos pacientes que deben seguir una terapia de inmunosupresión durante largos periodos de tiempo, la eficacia mejoraría y los efectos secundarios podrían reducirse significativamente si se usara un enfoque racional en la selección del tratamiento óptimo para las necesidades específicas del paciente (tratamiento personalizado). Esto podría ser posible solo mediante la determinación de los efectos de diferentes terapias y combinaciones de terapias en el "perfil de respuesta inmunitaria" del paciente y la monitorización de la evolución a lo largo del tiempo, de modo que los ajustes de la medicación podrían realizarse en consecuencia. Sin embargo, dado que no existe una solución disponible para hacerlo, el enfoque personalizado es imposible en la actualidad.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona una solución al problema mencionado anteriormente al proporcionar una herramienta/método para determinar la eficacia de fármacos inmunosupresores y/o inmunomoduladores sobre las células inmunitarias de los pacientes, que en realidad son las células diana de los inmunosupresores/inmunomoduladores. En este sentido, la presente invención describe un ensayo biológico *in vitro* que proporcionará una funcionalidad esencial para el control clínico global de pacientes que necesitan tratamiento con inmunosupresores o inmunomoduladores, principalmente para el tratamiento de estados crónicos de base inmunitaria. En particular, un inmunobiograma para ayudar a los médicos clínicos en la determinación de la combinación/posología óptima de los fármacos inmunosupresores/inmunomoduladores para tratar la inflamación al tiempo que reduce el riesgo de cronificación del estado y permite una reducción de los efectos secundarios no deseados de una inmunosupresión ineficaz (evitar la sub/sobreinmunosupresión).

A este respecto, una muestra de sangre extraída de un sujeto, en particular un sujeto humano, mediante venopunción se procesará para extraer las PBMC (por ejemplo, tal procesamiento de muestras puede realizarse mediante procedimientos regulares ampliamente usados en laboratorios clínicos). Estas PBMC se estimularán para la proliferación *in vitro* y separación en diferentes fracciones. Cada fracción se someterá (cultivo celular) a una combinación/posología diferente de fármacos inmunosupresores/inmunomoduladores (ensayo de potencia IMS). Las fracciones de PBMC cultivadas en estas condiciones diferentes permiten una titulación de la proliferación con cada fármaco inmunosupresor/inmunomodulador y sus combinaciones, que es una medida de la potencia de estos fármacos sobre las células diana en cada paciente específico evaluado. Los resultados del análisis generarán un informe analítico que incluye: a) una jerarquía de fármacos inmunosupresores/inmunomoduladores y combinaciones en orden de potencia inhibidora sobre las células diana del paciente específico y b) recomendaciones para el ajuste de la terapia de manera individualizada para cada paciente.

Breve descripción de las figuras.

Figura 1. Diseño de protocolo de placa de 6 pocillos (véase el ejemplo 1). CsA = ciclosporina A; ug/d = microgramos por disco; C + = control positivo (PBMC estimuladas con perlas Dynabead) C- = control negativo (PBMC no estimuladas).

Figura 2. Imagen de placa de 6 pocillos con luz visible (cámara Sanyo S1070 y E1075) del ensayo de difusión en disco con un disco cargado con ciclosporina A. Resultados en agarosa al 0,5% (A) y colágeno al 0,3% (B).

Figura 3. Imagen de placa de 6 pocillos con luz ultravioleta obtenida bajo exposición a lámpara ultravioleta en un sistema de obtención de imágenes con luz en gel UVItec Geldoc con software Uvidoc. Resultados en agarosa al 0,5% (A) y colágeno al 0,3% (B).

Figura 4. Imagen de cuantificación fluorescente obtenida con un lector de fluorescencia de microplacas (lector de microplacas multimodal PHERAstar® FSX de BMG LABTECH). Lectura superior, con las longitudes de onda de excitación y emisión ajustadas a los requisitos de resazurina. Resultados en agarosa al 0,5% (A) y colágeno al 0,3% (B).

Figura 5. Imagen de cuantificación fluorescente obtenida con un lector de fluorescencia de microplacas (lector de

microplacas multimodal PHERAstar® FSX de BMG LABTECH). Lectura superior, con las longitudes de onda de excitación y emisión ajustadas a los requisitos de resazurina. Resultados en agarosa al 0,5% (A) y colágeno al 0,3% (B). (Figura en escala de grises).

5 Figura 6. Inhibición de ciclosporina A dependiente de la dosis de PBMC activadas humanas en un ensayo de difusión en disco. Resultados en agarosa al 0,5% (A) y colágeno al 0,3% (B). URA = unidades relativas de área.

Figura 7. Señal fluorescente de reducción de resazurina como cuantificación de proliferación/viabilidad celular de PBMC activadas con perlas Dynabead con Ac anti-CD3/CD28 en diferentes matrices de hidrogeles durante 5 días. MC: metilcelulosa (Clonacell), Colg: colágeno, Agrs: agarosa, Pept: péptido de autoensamblaje (Biogelx), URF-UV: Unidades relativas de fluorescencia con radiación ultravioleta.

10

Figura 8. Señal fluorescente de reducción de resazurina como cuantificación de proliferación/viabilidad celular de PBMC activadas con perlas Dynabead con Ac anti-CD3/CD28 en matrices de hidrogeles de colágeno en diferentes porcentajes después de 24 o 48 h de incubación.

15

Figura 9. Señal fluorescente de reducción de resazurina como cuantificación de proliferación/viabilidad celular de PBMC activadas con perlas Dynabead con Ac anti-CD3/CD28 en matrices de hidrogeles de agarosa en diferentes porcentajes después de 24 o 48 h de incubación.

20

Figura 10. Ensayo de dilución de líquido en microplaca de ciclosporina A. Inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de PBMC estimuladas. CsA = ciclosporina A; C + = control positivo (PBMC estimuladas con perlas Dynabead); C - = control negativo (PBMC no estimuladas).

25 Figura 11. Cálculo de la concentración inhibidora al 50% (CI_{50}) del ensayo de dilución de líquido en microplaca de ciclosporina A.

Figura 12. Cuantificación de halos inhibidores dependientes de la dosis del ensayo de difusión en disco de agarosa al 0,5% de diferentes fármacos inmunosupresores. CsA = ciclosporina A (inhibidor de calcineurina); Ever = everolímús (inhibidor de mTOR), AMF = ácido micofenólico (inhibidor de la síntesis de ADN), Met-Pred = metilprednisolona (glucocorticoide).

30

Figura 13. Efecto dependiente de la dosis de diluciones en serie de inmunosupresores sobre PBMC humanas activadas. C + = control positivo (PBMC estimuladas con perlas Dynabead) C- = control negativo (PBMC no estimuladas).

35

Figura 14. Efecto dependiente de la dosis de las diluciones en serie del inmunosupresor sirolímús sobre las PBMC humanas activadas de dos voluntarios humanos diferentes (PBMC Hu 1 y 2). C + = control positivo (PBMC estimuladas con perlas Dynabead) C- = control negativo (PBMC no estimuladas).

40

Figura 15. Efecto dependiente de la dosis de diluciones en serie de inmunosupresores (tacrolímús, sirolímús, everolímús) sobre PBMC humanas activadas sobre PBMC humanas.

Figura 16. La titulación de los discos cargados de inmunosupresores afecta a diferentes dosis sobre las PBMC activadas humanas, incluidas en el hidrogel de copolímero de colágeno-metilcelulosa en microplaca de 48 pocillos (A). El efecto de gradiente de los discos cargados con 20 ó 50 microgramos de inmunosupresores dentro de los pocillos se midió y representó en función de la distancia desde la posición del disco (B). C +: control positivo (PBMC estimuladas con perlas Dynabead); C-: control negativo (PBMC no estimuladas); MPA = ácido micofenólico; CpA = ciclosporina A; TAC: tacrolímús; MTP. Metilprednisolona, SIR: sirolímús; EVE = everolímús. URF: unidades relativas de fluorescencia.

45

50

Figura 17 Representación del efecto del gradiente inhibidor de diferentes fármacos inmunosupresores sobre dos donantes humanos de PBMC diferentes (gráfico superior e inferior) incluidos en el hidrogel de copolímero de colágeno-metilcelulosa. C +: control positivo (PBMC estimuladas con perlas Dynabead); C-: control negativo (PBMC no estimuladas); MPA = ácido micofenólico; CpA = ciclosporina A; TAC: tacrolímús; MTP. Metilprednisolona, SIR: sirolímús; EVE = everolímús.

55

Figura 18. Ejemplo de representación de diseño gráfico de microplacas con diferente magnitud de la longitud de canales. Todos los números se refieren a valores métricos de longitud, anchura y altura de elementos externos e internos de la microplaca, en unidades de milímetros. Diseño de placa opcional con una longitud de canales de 3,4 mm.

60

Figura 19. Representación de la evolución de la difusión en un hidrogel que evalúa un único eje espacial. Representación gráfica de las diferencias de concentración (C_a , C_b) en dos puntos espaciales diferentes (X_a , X_b) como resultado de la difusión del soluto en un hidrogel (A). Representación gráfica de un gradiente de difusión como la pendiente de la curva que representa una variación de la concentración de soluto en función del incremento de la

65

distancia (B).

Descripción detallada de la invención

5 Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, el término “derivados celulares de la sangre” se entiende como una población de leucocitos totales, células mononucleares de sangre periférica o cualquier subpoblación específica de PBMSc tales como, pero sin limitarse a, linfocitos T, células T reguladoras (Treg), NK (linfocitos citolíticos naturales), macrófagos o linfocitos B.

Tal como se usa en el presente documento, el término “disolución de colágeno de cultivo celular” se entiende como un medio acuoso que comprende sales y factores nutricionales adecuados para mantener la viabilidad de las PBMC y un porcentaje de colágeno por debajo del 0,5% p/v, preferiblemente igual o inferior al 0,3% p/v.

Tal como se usa en el presente documento, el término “disolución de agarosa de cultivo celular” se entiende como un medio acuoso que comprende sales y factores nutricionales adecuados para mantener la viabilidad de las PBMC y un porcentaje de agarosa igual o inferior al 1% p/v, preferiblemente inferior o igual al 0,5% p/v.

El término “aproximadamente” en referencia a un valor numérico significa +/- 20% de ese valor numérico. El término “aproximadamente” en referencia a un valor numérico también incluye +/- 10% de ese valor numérico. El término “aproximadamente” en referencia a un valor numérico también incluye +/- 5% de ese valor numérico. El término “aproximadamente” en referencia a un valor numérico también incluye +/- 1% de ese valor numérico.

Los términos “comprende” y “que comprende” se usan en sentido abierto e inclusivo, lo que significa que pueden incluirse elementos adicionales. El término “comprende” también abarca y puede usarse indistintamente con los términos “consiste en” y “consiste esencialmente en”.

Tal como se usa en el presente documento, el término “fármaco o compuesto inmunomodulador” se entiende como cualquier compuesto químico (incluido cualquier compuesto orgánico, proteínas recombinantes o no, anticuerpos, citocinas o cualquier terapia avanzada, incluidos productos terapéuticos celulares, productos génicos y cualquier derivado) capaz de inducir, aumentar, reducir o dirigir la respuesta inmunitaria. Los ejemplos de fármacos inmunomoduladores son glucocorticoides (dexametasona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, cortisona, hidrocortisona, triamcinolona, budesonida, etc.), inhibidores de la calcineurina (ciclosporina A, tacrolimús, etc.), inhibidores de mTOR (sirolimús, everolimús y análogos), inhibidores de citocinas/interleucinas (rilonacept, secukinumab, anakinra, isekizumab, tocilizumab, reslizumab, canakinumab, mepolizumab, basiliximab, siltuximab, daclizumab, faralimomab, elsilimomab, lebrikizumab, mepolizumab, etc.), antimetabolitos (metotrexato, azatioprina, ácido micofenólico, leflunomida, terflunomida, etc.), inhibidores de TNF- α (etanercept, infliximab, certolizumab, golimumab, adalimumab, infliximab, pegsunercept, etc.), interleucinas recombinantes (proleucina, oprelvekina, etc.), dianas de CTLA-4 (abatacept, belatacept, ipilimumab, tremelimumab, etc.), dianas de PD1/PDL-1 (nivolumab, pembrolizumab, etc.), dianas de CD40/C40L (tenelimumab, toralizumab), terapia celular (células madre mesenquimatosas, células T reguladoras, células dendríticas, etc.) y otros (lenalidomida, pomalizumab, talidomida y derivados, apremilast, etc.)

Tal como se usa en el presente documento, el término “fármaco o compuesto inmunosupresor” se entiende como cualquier compuesto orgánico, recombinante o no proteínas, anticuerpos, citocinas o cualquier terapia avanzada, incluidos productos terapéuticos celulares, productos génicos y cualquier derivado capaz de dirigir la respuesta inmunitaria a través de reducción de la activación de las células inmunitarias, proliferación y/o inhibición de las respuestas efectoras.

Tal como se usa en el presente documento, el término “gradiente de fármaco inmunomodulador” se entiende como un comportamiento de distribución de sustancias descrito por las leyes de difusión de Fick, en el que el soluto se moverá desde una región de alta concentración hasta una región de baja concentración a través de un gradiente de concentración espacial en estado líquido o semisólido (primera ley) de manera dependiente del tiempo (segunda ley). La primera ley de Fick:

$$J = -D \frac{d\varphi}{dx}$$

donde

J es el “flujo de difusión”, cuya dimensión es la cantidad de sustancia por área unitaria por tiempo unitario, de modo que se expresa en unidades tales como mol m⁻² s⁻¹. J mide la cantidad de sustancia que fluirá a través de un área unitaria durante un intervalo de tiempo unitario.

D es el coeficiente de difusión o difusividad. Su dimensión es el área por tiempo unitario, de modo que las unidades

típicas para expresarlo serían m²/s

φ (para mezclas ideales) es la concentración, cuya dimensión es la cantidad de sustancia por volumen unitario. Puede expresarse en unidades de mol/m³.

5

x es la posición, cuya dimensión es la longitud. Por tanto, podría expresarse en la unidad m.

$$\frac{\partial \varphi}{\partial t} = D \frac{\partial^2 \varphi}{\partial x^2}$$

La segunda ley de Fick:

10 donde

φ es la concentración en dimensiones de [(cantidad de sustancia) de longitud⁻³], unidad de ejemplo mol/m³;

15

φ = φ(x, t) es una función que depende de la ubicación x y el tiempo t;

t es el tiempo [s];

D es el coeficiente de difusión en dimensiones de [longitud² tiempo⁻¹]; unidad de ejemplo m²/s

20

x es la posición [longitud], unidad de ejemplo m

25

Tal como se usa en el presente documento, el término “una disolución de cultivo celular capaz de proporcionar un hidrogel” se entiende como un medio acuoso que comprende sales y factores nutricionales adecuados para mantener la viabilidad de las PBMC y un polímero capaz de dar lugar a un material viscoelástico similar a un sólido que comprende una red reticulada elástica y agua, en el que el agua es el componente principal. Se observa que el polímero debe ser compatible con la viabilidad de crecimiento 3D (tridimensional) de las PBMC.

30

Tal como se usa en el presente documento, el término “compuesto de activación de linfocitos” se entiende como cualquier sustancia química capaz de inducir una respuesta celular linfocítica, tal como proliferación celular, producción y/o secreción de citocinas proinflamatorias, o presentación en la superficie de la membrana de receptores o ligandos de proactivación.

35

Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpos agonistas anti-CD3 (TCR) y CD28” se entiende como cualquier anticuerpo capaz de unirse específicamente a CD3 y CD28 humanos ejerciendo un efecto de activación equivalente a la unión de los ligandos de membrana fisiológicos CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) y CD80/86, respectivamente.

40

Tal como se usa en el presente documento, el término “ionomicina” se entiende como un ionóforo sintético o derivado de la bacteria *Streptomyces conglobatu*, capaz de elevar el nivel intracelular de calcio (Ca²⁺) estimulando la producción intracelular de linfocitos del interferón, perforina, IL-2 e IL-4. Habitualmente se usa en conjunto con PMA.

45

Tal como se usa en el presente documento, el término “PMA (miristato-acetato de forbol)” se entiende como un compuesto químico capaz de activar la PKC (proteína cinasa C) y las respuestas de señalización celular subordinadas que activan las respuestas linfocíticas. Por lo general, se usa en combinación con ionomicina.

50

Tal como se usa en el presente documento, el término “lectinas” se entiende como cualquier proteína derivada de una planta con una alta capacidad de unión específica a los hidratos de carbono. Capaz de agregar receptores y ligandos de superficies celulares que inducen la estimulación cruzada de linfocitos artificiales.

55

Tal como se usa en el presente documento, el término “superantígenos” se entiende como cualquier antígeno derivado de bacterias o virus capaz de inducir una activación inespecífica de células T que da como resultado la activación de células T policlonales y la liberación masiva de citocinas.

60

Tal como se usa en el presente documento, el término “lipopolisacáridos (LPS)”, también conocido como lipoglicanos o endotoxinas, se entiende como moléculas grandes que consisten en un lípido y un polisacárido que se compone de antígeno O derivado de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, capaz de provocar fuertes respuestas inmunitarias a través de la activación de receptores de la superficie de membrana de células inmunitarias específicas. Tal como se usa en el presente documento, el término “determinantes antigénicos o epítomos” se entiende como parte de un antígeno que podría ser reconocido por el sistema inmunitario (anticuerpos, células B o células T).

Tal como se usa en el presente documento, el término “reacción linfocítica mixta” se entiende como una reacción de

ensayo inmunitario celular *ex vivo* entre dos poblaciones de linfocitos alogénicos (la misma especie pero donantes genéticamente distintos) que induce la proliferación de linfocitos y la secreción de citocinas proinflamatorias en respuesta a las diferencias del antígeno mayor de histocompatibilidad (CMH de clase I y II) entre las dos poblaciones de células.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “eficacia” se entiende como la capacidad de un fármaco para producir un efecto sobre las células diana, tal como inducir una respuesta celular diana que consiste en la modulación de la proliferación, producción y/o secreción de citocinas o factores inmunorreguladores, o la presentación en la superficie de la membrana de receptores o ligandos coestimuladores.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “incrustado dentro del hidrogel” se entiende como las PBMC activadas, los leucocitos totales o las subpoblaciones específicas de PBMC fijadas en una masa de hidrogel circundante.

15 **Descripción**

La presente invención proporciona un método para medir cuantitativamente la respuesta de un paciente a un fármaco inmunomodulador que ayudará a los médicos clínicos en la determinación de la combinación/posología óptima de los fármacos inmunosupresores/inmunomoduladores. Además, este método abrirá la posibilidad de que los médicos clínicos realicen los ajustes necesarios en la terapia de inmunosupresión, como un modo para evitar que tenga lugar realmente un rechazo de órganos. Además, este método reducirá significativamente los efectos secundarios de los fármacos inmunosupresores, optimizando el esquema y las dosificaciones terapéuticas, permitiendo la determinación del régimen de inmunosupresión más eficaz a las menores dosificaciones para cada paciente individualmente y la monitorización de la eficacia del tratamiento a lo largo del tiempo, abriendo por tanto el camino a la personalización del tratamiento.

20 Para comprender correctamente la presente invención, es importante observar que la titulación es un método de laboratorio habitual de análisis químico cuantitativo que se usa para determinar la concentración desconocida de un analito identificado. El término titulación podría aplicarse en muchos campos científicos como la evaluación de la variación cuantitativa del parámetro X en función de la variación cuantitativa del parámetro Y.

30 Basándose en esto, en la presente invención, el término titulación se entiende como el análisis cuantitativo del efecto dependiente de la dosis de un inmunosupresor basado en el gradiente generado en un hidrogel. Alternativamente, en la presente invención, el término titulación también se entiende como la cuantificación comparativa de los efectos del gradiente de inmunosupresor sobre las PBMC activadas incrustadas dentro de un hidrogel. En este sentido, es importante observar que en la presente invención se titula el efecto (no la concentración) de los inmunosupresores, analizando el gradiente espacial formado que inhibe la proliferación/activación de las células incrustadas en el hidrogel.

35 Con el fin de determinar tal titulación de los fármacos inmunosupresores, en el método de la presente invención, se controla la dosis del inmunosupresor en la cantidad seca incluida en los discos que se insertan en el hidrogel, después de insertar los discos en el hidrogel se genera un gradiente de concentración mediante la difusión del inmunosupresor y tal gradiente genera un efecto dependiente de la dosis sobre las células incrustadas dentro del hidrogel, que luego se revela y mide como una señal de fluorescencia con un fluorímetro.

40 Es crucial comprender que el método de la invención no funciona de manera eficaz con cualquier pocillo convencional de una microplaca, debido al hecho de que las placas de pocillos convencionales de grandes dimensiones (placas de 6-12 pocillos) no pueden generar datos de selección múltiple de inmunosupresores y las placas de pocillos de dimensiones reducidas (de 48 a 1536) no pueden generar un gradiente de inmunosupresor medible. Solo con pocillos no circulares definidos como pocillos canalizados o canales caracterizados por una proporción dimensional en la que uno de los tres ejes espaciales (eje longitudinal) es al menos 4 veces, preferiblemente al menos 5 veces, preferiblemente al menos 6 veces, más preferiblemente al menos 7 veces, más preferiblemente al menos 8 veces, más preferiblemente al menos 15 veces, más largo que el promedio de longitud de los otros dos ejes que se pudieron conformar en forma de hidrogel, de modo que el hidrogel introducido en el mismo (en el pocillo canalizado) fue capaz de proporcionar un flujo en gradiente de fármaco medible y estable en el eje longitudinal del pocillo canalizado descrito. La media o el promedio de longitud de los dos ejes menores se define como la suma de las longitudes dividida entre 2. Es importante observar que para que se produzca un flujo en gradiente de fármaco medible y estable en el eje longitudinal del pocillo canalizado descrito, el pocillo canalizado debe estar completamente cubierto por el hidrogel en su eje longitudinal y debe cubrir al menos el 30% de la altura del pocillo canalizado.

45 En este sentido, en el contexto de la presente invención, “pocillo convencional” se entiende como cualquier pocillo, incluido en la definición dimensional de pared cilíndrica o cuadrangular equilátera; de fondo redondeado, cónico o plano; de 1,5 a 35 mm de diámetro o lado, de 5 a 20 mm de altura y de 10 a 16.800 ul de volumen total. Los pocillos convencionales también incluyen procedimientos o dispositivos de microplaca capaces de generar gotas colgantes de medios de cultivo líquidos o gotas/trozos de hidrogeles que pueden enmarcarse en las dimensiones mencionadas

de pocillos convencionales.

En los presentes sistemas experimentales, usando pocillos convencionales, y en todos los intentos de cuantificar el efecto inhibitor dependiente de la dosis de los inhibidores de la ruta de señalización de mTOR (inmunosupresores: sirolimús y everolimús) sobre PBMC humanas estimuladas, no se pudo cuantificar correctamente dicho efecto inhibitor dependiente de la dosis. El motivo se debió a que a todas las concentraciones sometidas a prueba (incluso a niveles femtomolares) hubo al menos cierto efecto de nivel inhibitor y a que nunca se alcanzó el control positivo de proliferación en ausencia de inmunosupresores. En sistemas experimentales adicionales, usando 96 pocillos convencionales para titular los inmunosupresores (para analizar cuantitativamente el efecto dependiente de la dosis de inmunosupresores basándose en el gradiente generado en un hidrogel), en particular mediante la realización de diluciones en serie de los siguientes inmunosupresores: ácido micofenólico, ciclosporina A y prednisona; se pudieron generar (véase la figura 13) efectos sobre la proliferación/activación de PBMC que iban desde las células sin estímulos (referencia de control negativo, línea continua) hasta células estimuladas con perlas Dynabead anti-CD3/CD28 (control positivo + línea discontinua). De ese modo, para estos inmunosupresores, la titulación del efecto dependiente de la dosis fue viable y cuantificable mediante el uso de pocillos convencionales. Sin embargo, las diluciones en serie de microplacas de 96 pocillos convencionales de los inhibidores de mTOR: sirolimús y everolimús, tal como se muestra en las figuras 14 y 15, no pudieron generar efectos sobre la proliferación/activación de PBMC que iban desde las células sin estímulos (referencia de control negativo, línea continua) a células estimuladas con perlas Dynabead anti-CD3/CD28 (control positivo + línea discontinua). En este sentido, en todas las concentraciones sometidas a prueba, incluso a niveles femtomolares, las PBMC humanas no recuperaron una capacidad proliferativa comparable con un nivel de control positivo. De ese modo, para algunos inmunosupresores, en particular para los inhibidores de mTOR, la titulación del efecto dependiente de la dosis sobre la proliferación celular no es viable mediante el uso de pocillos de formatos convencionales y, por tanto, no se podrían obtener datos cuantificables para titular los efectos farmacológicos mediante el uso de pocillos convencionales.

En contraste con los resultados mencionados anteriormente, la titulación de todos los inmunosupresores sometidos a prueba usando pocillos canalizados caracterizados como anteriormente, pudo proporcionar un flujo en gradiente de fármaco medible y estable en el eje mayor del pocillo canalizado descrito que contiene las PBMC humanas incrustadas dentro del hidrogel, generando así una titulación cuantificable del efecto dependiente de la dosis de estos fármacos después de la generación de gradiente basada en difusión, incluidos los inhibidores de mTOR designados como IMS 5 y 6, tal como se muestra en la figura 17.

El motivo de esto es que la difusión espontánea de una sustancia en un hidrogel depende de varios parámetros como las características del soluto (concentración, tamaño molecular, solubilidad, polaridad, etc.), las características de la red del hidrogel (tamaño de poro, estructura química del monómero, grado de reticulación, tamaño de malla, etc.), temperatura, pH, presencia de iones, etc. Esta difusión de sustancias (inmunosupresores) genera un gradiente de concentración que ejerce un efecto inhibitor dependiente de la dosis sobre la proliferación de las células incrustadas en el hidrogel.

Se produce difusión en agua, pero un gradiente de concentración estable de una sustancia solo puede medirse en ausencia o presencia mínima de alteración de fluido debido a fuerzas externas. Los hidrogeles generan una malla molecular que estabiliza las propiedades físicas y mecánicas del fluido que contiene el gradiente de compuesto en curso. En el caso de la presente invención, se usan hidrogeles biológicos compuestos por diferentes polímeros para establecer gradientes de moléculas biológicas alrededor de células *in vitro*. Al introducir una concentración conocida de un compuesto (inmunosupresores) dentro del gel, la molécula biológica difunde aleatoriamente desde su fuente hacia el gel formando un gradiente de concentración sobre las células incrustadas que evoluciona de manera constante en ambas escalas espacial y temporal cuando otras variables que afectan al paciente como la temperatura y las características del soluto y el hidrogel son fijas y estables.

Para que tenga lugar tal difusión que forma un gradiente de concentración, los hidrogeles deben incluirse en los canales longitudinales, en los que el eje longitudinal es X ($X \gg Y \sim Z$) y en los que el gradiente se desarrolla prácticamente en una dimensión. En este escenario simplificado de la primera ley de Fick, el gradiente es una función de las concentraciones y la distancia entre puntos espaciales definidos. La derivada de las variaciones de concentración espacial infinitamente próximas (dC/dX) corresponde a la pendiente (figura 18). La magnitud del gradiente es un vector definido por las derivadas parciales de las componentes del sistema de ejes (X, Y, Z). Además, cuando el incremento de distancia ($\Delta X = X_a - X_b$) es bajo, las diferencias de concentración entre los puntos espaciales correspondientes son limitadas y, por consiguiente, el gradiente se reduce o no es detectable en la práctica (figuras 19-B). En compartimentos 3D isométricos reducidos (pocillos circulares pequeños de microplacas, 100-500 μ l de volumen), la distancia limitada en los tres ejes espaciales genera una difusión rápida y un gradiente muy bajo. En los canales apropiados (estrechos y largos) en los que dos de los tres ejes son significativamente menores que el otro, la difusión se desarrolla de manera suficientemente constante y lenta a lo largo del eje longitudinal (X) como para permitir que se cuantifique correctamente un amplio gradiente (figura 17).

Todas estas declaraciones anteriores no son aplicables a la microfluidica.

Por tanto, el gradiente de difusión medible en hidrogeles incluidos en dispositivos de microplaca requiere una

distribución espacial en los tres ejes espaciales con al menos un eje con un intervalo de distancia de al menos 4 veces el promedio de los otros dos ejes, definidos como pocillos canalizados o canales. De ese modo, las microplacas de pocillos circulares y cuadrados equiláteros se descartan definitivamente de esta definición. De esta manera, los canales longitudinales rectilíneos, curvilíneos o sinusoidales, o cualquier combinación de las formas mencionadas, permiten que pueda generarse un gradiente de concentración de amplio intervalo, proporcionando así un efecto medible dependiente de la dosis sobre las células cultivadas incrustadas dentro del hidrogel. En esta descripción, el término longitudinal se define como el eje a lo largo de la dirección de mayor longitud de una figura o un cuerpo que pasa a través de su centro geométrico de gravedad, rectilínea se define como una forma delimitada por líneas rectas paralelas, curvilínea se define como una forma que consiste en o está delimitada por líneas curvas (falta de rectitud) y sinusoidal se define como una forma similar a o que varía según una curva sinusoidal u onda sinusoidal (oscilación repetitiva).

Por tanto, con el fin de generar una titulación cuantificable del efecto dependiente de la dosis de fármacos inmunosupresores, incluidos los inhibidores de mTOR, después de la generación de un gradiente basado en difusión en un hidrogel, es obligatorio que el método de la presente invención use un pocillo canalizado o una microplaca caracterizada por proporciones dimensionales en las que uno de los tres ejes espaciales (eje longitudinal) es al menos 4 veces, preferiblemente al menos 5 veces, preferiblemente al menos 6 veces, más preferiblemente al menos 7 veces, más preferiblemente al menos 8 veces, más preferiblemente al menos 15 veces, más largo que el promedio de longitud de los otros dos ejes. Un ejemplo de una microplaca útil en la presente invención se muestra en la figura 18 adjunta en el presente documento; en particular, una placa de las siguientes dimensiones: $127,76 \pm 0,25$ mm de longitud, $85,48 \pm 0,25$ mm de ancho y 10-15 mm de altura. Los canales incluidos en dicha placa tienen preferiblemente una longitud entre 20 y 70 mm, una anchura de desde 1 hasta 4 mm y una altura de 7 a 10 mm; tales canales deben poder contener un volumen de hidrogel por canal de desde 40 hasta 2.800 μ l. Es importante observar que los pocillos canalizados o microplacas útiles en la presente invención excluyen los pocillos canalizados o microplacas útiles en microfluidica, que se definen por dispositivos en el intervalo de volumen de pocillos de 10 microlitros (μ l) a femtolitros (fl) (Chem. Soc. Rev., 2010, 39, 1153-1182), en este sentido, el pocillo canalizado o las microplacas útiles en la presente invención deben poder contener un volumen de hidrogel por pocillo de al menos 40 μ l, preferiblemente de 40 μ l a 2.800 μ l.

Preferiblemente, las microplacas útiles en la presente invención comprenden una multiplicidad de canales para retener muestras que van a someterse a ensayo mediante emisiones, transmisión o absorbanza de luz, comprendiendo dicha placa una placa superior que forma las paredes laterales de los pocillos, canales o depósitos de muestra, siendo dichas paredes laterales de plástico opaca polimérico, de modo que no puede transmitirse luz entre canales adyacentes a través de dichas paredes laterales, una lámina inferior fusionada y sellada que forma las paredes inferiores de los pocillos de muestra, siendo transparentes dichas paredes inferiores para permitir la transmisión de luz a su través, siendo dicha placa inferior una pieza de plástico polimérico compatible con el cultivo celular, siendo una tapa de placa superior una única pieza de plástico transparente unitaria con dimensiones compatibles para caber en la microplaca descrita.

Las microplacas útiles en la presente invención pueden fabricarse con cualquier material sin capacidad para afectar a la viabilidad o activación de células cultivadas, incluidos, entre otros, poliestireno, polipropileno, policarbonato o derivados de copolímeros de olefina cíclica.

Al leer y entender de los inventores, esta es la primera vez que los pocillos canalizados mencionados anteriormente se usan en un método para medir cuantitativamente la respuesta de un paciente a un fármaco inmunomodulador que ayudará a los médicos clínicos en la determinación de la combinación/posología óptima de inmunosupresores/inmunomoduladores.

Basándose en todos los criterios anteriores, un primer aspecto de la invención se refiere a un método para medir cuantitativamente la respuesta de un paciente a un fármaco inmunomodulador, comprendiendo el método las siguientes etapas:

- a. activar células mononucleares de sangre periférica (PBMC), leucocitos totales o subpoblaciones específicas de PBMC tales como linfocitos T, células T reguladoras (Treg), NK (linfocitos citolíticos naturales), macrófagos o linfocitos B, obtenidos de una muestra biológica seleccionada de la lista que consiste en derivados celulares de la sangre o en la sangre del paciente, a través de la incubación con un compuesto de activación de linfocitos seleccionado de la lista consiste en: anticuerpos agonistas anti-CD3 (TCR) y CD28, ionomicina y PMA (miristato-acetato de forbol), lectinas, superantígenos, lipopolisacáridos (LPS), determinantes antigénicos o epítopos y a través de una reacción linfocítica mixta;
- b. obtener un hidrogel que comprende a su vez las PBMC activadas, leucocitos totales o subpoblaciones específicas de PBMC, incrustados dentro del hidrogel en el que el hidrogel está ubicado en un soporte o una microplaca que comprende pocillos canalizados o canales caracterizados por tener una proporción dimensional en la que los tres ejes espaciales (eje longitudinal) son al menos 4 veces, preferiblemente al menos 5 veces, preferiblemente al menos 6 veces, más preferiblemente al menos 7 veces, más

preferiblemente al menos 8 veces, más preferiblemente al menos 15 veces, más largo que el promedio de longitud de los otros dos ejes, de modo que el hidrogel es capaz de proporcionar un flujo en gradiente de fármaco medible y estable en el eje mayor de los pocillos canalizados descritos, en el que los pocillos canalizados contienen un volumen de hidrogel por canal de al menos 40 μ l y en el que el pocillo canalizado debe estar completamente cubierto por el hidrogel en su eje longitudinal y debe cubrir al menos el 30% de la altura del pocillo canalizado;

c. poner en contacto el hidrogel de la etapa b) con uno o más fármacos inmunomoduladores;

d. añadir una disolución de un compuesto capaz de revelar una zona inhibidora alrededor del sitio de contacto del fármaco inmunosupresor con el hidrogel; y

e. obtener la cuantificación del gradiente de fármaco inmunomodulador formado, preferiblemente mediante la adquisición de imágenes o la cuantificación de señales (absorbancia, fluorescencia o luminiscencia);

en el que el hidrogel se forma a través de la reticulación no covalente (hidrogeles físicos) de cadenas poliméricas, en el que la fracción polimérica total representa menos del 5% (5 g/100 ml de hidrogel), y en el que la fracción polimérica total consiste en metilcelulosa y colágeno, en el que el contenido de metilcelulosa es igual o inferior al 4% (g/100 ml de hidrogel), preferiblemente inferior o igual al 2% (g/100 ml de hidrogel), y el contenido de colágeno es inferior o igual al 0,3% (g/100 ml de hidrogel).

La etapa c) de la metodología mencionada anteriormente da como resultado la formación de un gradiente de fármaco inmunomodulador en el hidrogel. Tal gradiente requiere una difusión del inmunosupresor en el hidrogel ubicado en un soporte o la microplaca que comprende pocillos canalizados caracterizados como anteriormente, capaces de proporcionar un flujo en gradiente estable y medible de fármaco en el eje mayor de los pocillos canalizados o canales descritos. La difusión se define como el movimiento neto de partículas desde una región de alta concentración hasta una región de baja concentración siguiendo el gradiente de concentración (primera ley de Fick). En este caso, el gradiente de concentración es un cambio en los valores de cantidad de dos variables: concentración con respecto a distancia. De ese modo, la difusión en gradiente en hidrogeles podría definirse como la tasa de cambio de una concentración de sustancia con respecto a la distancia de difusión desde un punto espacial inicial

Tal como se muestra en el ejemplo 3, los métodos de dilución de medios líquidos en formato de microplaca en el contexto de la inhibición proliferativa específica de PBMC activadas, requieren entre 3 y 5 días de cultivo para detectar variaciones de respuesta en la proliferación de linfocitos humanos activados. En cambio, los resultados obtenidos con el ensayo de difusión en hidrogel (formatos semisólidos) tal como se describe en el primer aspecto de la invención, permiten la interpretación de la actividad del inmunosupresor en 2-3 días. En particular, el formato en estado semisólido después de 24-48 horas de estimulación y durante las siguientes 24 horas, detecta diferencias entre los controles positivos y negativos, y puede visualizarse o detectarse el frente inhibitor. También el número de compuestos que podía someterse a prueba era mayor en formatos en estado semisólido. Además, mientras que la titulación en microplacas requiere diluciones en serie manuales o automatizadas al menos por triplicado para tener un poder estadístico aceptable y detectar el efecto de borde durante el ensayo de periodo largo (efecto de evaporación del medio), el formato de hidrogel generó una tasa de evaporación homogénea.

Además, el crecimiento de PBMC (linfocitos) *in vitro* requiere estimulación, contacto celular próximo (fondo en forma de U de microplacas de 96 pocillos) y varios días en medio de cultivo celular líquido. Sin embargo, inesperadamente, después de la estimulación, las PBMC sembradas y dispersas en un hidrogel 3D crecen, como lo que se describe en el primer aspecto de la invención, mantienen una buena viabilidad que podría medirse en tiempos más cortos en comparación con condiciones similares en un medio de cultivo líquido. Además, basándose en el conocimiento general común, se esperaba el requisito de formación y crecimiento de colonias de linfoblastos (que requieren varios días) para medir el efecto de la difusión de inmunosupresores desde discos. Pero los resultados mostraron que no hay necesidad de proliferación o formación de colonias real en formato de hidrogeles 3D para medir la actividad celular y los halos inhibidores, lo que constituye una mejora adicional de la metodología descrita en el primer aspecto de la invención.

Por tanto, las ventajas del método descrito en el primer aspecto de la invención son la simplicidad de la prueba, la provisión de resultados categóricos interpretados fácilmente por todos los médicos clínicos y la flexibilidad en la selección potencial de discos cargados con inmunorreguladores para las pruebas. Es el menos costoso de todos los métodos de susceptibilidad. Además, con los discos normalizados, la solubilidad no es un problema puesto que la difusión está definida por la polaridad del inmunosupresor y el PM (peso molecular), el % de hidrogel y la composición de los medios, y todos estos parámetros son fácilmente normalizables. En cambio, en las placas con medio líquido, los compuestos hidrófobos (casi todos los compuestos activos inmunosupresores) requieren disolventes orgánicos (DMSO, etanol) que podrían generar toxicidad, precipitación parcial a altas concentraciones y variaciones de biodisponibilidad *in vitro*. Sin embargo, los medios semisólidos realizan un proceso de dilución pasiva a través de la difusión desde el disco por el hidrogel y una tasa de evaporación homogénea, de modo que los halos inhibidores generan información más fiable en periodos de tiempo de ensayo más cortos y evitan variaciones e

interpretaciones erróneas de los datos debido a problemas de solubilidad.

5 Considerando el perfil de solubilidad de los principales fármacos inmunosupresores actualmente en uso para diferentes estados de inflamación crónica (prednisona, hemisuccinato de Na de metilprednisolona, prednisolona, ácido micofenólico, azatioprina, ciclosporina A, tacrolimús, sirolimús, everolimús), la mayoría presenta una solubilidad en agua muy escasa. Es importante darse cuenta de que solo los derivados metabólicos activos deben someterse a prueba en ensayos *in vitro*, puesto que es el principio activo farmacéutico el que ejerce la actividad biológica. En este contexto, solo el ácido micofenólico presenta una buena solubilidad en agua. Además, la solubilidad del compuesto en tampones, etanol y dimetilsulfóxido (DMSO) se ha convertido en un problema importante en la investigación de fármacos. Muchos compuestos activos tienen baja solubilidad pero son potencialmente valiosos como compuestos principales y en análisis de investigación. Desafortunadamente, la baja solubilidad afecta a los ensayos biológicos en microplaca al provocar una actividad subestimada, sensibilidad reducida, datos variables y pruebas de actividad *in vitro* imprecisas. Además, las diluciones podrían enmascarar la toxicidad de los principios activos farmacéuticos inmunosupresores y modificar su estructura física. Las estrategias para optimizar los ensayos biológicos en microplaca requieren considerar la solubilidad en el diseño de la biblioteca de HTS; examen temprano de la solubilidad; mejora del almacenamiento y la manipulación de disoluciones madre en DMSO; optimización de los protocolos de dilución; y aseguramiento de que los compuestos de baja solubilidad estén completamente solubilizados en los ensayos biológicos. En cambio, el método de difusión en estado semisólido en hidrogel del primer aspecto de la invención resuelve muchos de los problemas descritos relacionados con el desafío de la solubilidad. Por último, el formato de microplaca requiere algunas etapas de manipulación extra que aumentan la posibilidad de errores y no se desean para los análisis automatizados (Cell Viability Assays, Terry L Riss, PhD* Promega Corporation).

25 Por tanto, el ensayo o método del primer aspecto de la invención genera una herramienta cuantitativa simplificada capaz de medir la respuesta celular de un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, frente a un panel de compuestos o fármacos inmunosupresores o inmunomoduladores. La interpretación de los resultados depende de la respuesta relativa y la validación entre los perfiles de pacientes sanos y diferentes. Una vez que se establezca la carga de los discos de fármaco y el intervalo de referencia de los halos inhibidores, los médicos clínicos obtendrán datos de eficacia relativa de diferentes fármacos para seleccionar la combinación de fármacos o multiterapia y el intervalo de dosis que podrían tratar mejor la patología del paciente, generando el mejor efecto inmunosupresor con menores efectos secundarios y tóxicos. Además, este sistema de ensayo podría generar información complementaria sobre la capacidad de respuesta de los linfocitos del paciente en presencia o ausencia de estimulación.

35 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la etapa de activación a) se realiza usando anticuerpos agonistas anti-CD3 (TCR) y CD28, preferiblemente perlas poliméricas magnéticas recubiertas con anticuerpos agonistas anti-CD3/CD28 activadores de células T humanas.

40 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, el hidrogel contiene más del 95% de fase acuosa, preferiblemente más del 97%, siendo esta fase acuosa un medio de cultivo celular, preferiblemente medios mínimos sin Suero animal, rojo fenol o antibióticos.

45 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, la disolución de la etapa d) es una disolución de resazurina. Se observa que están disponibles otras opciones para revelar la actividad celular y las conocen los expertos y podrían ser compatibles con el ensayo de hidrogel para definir zonas inhibitoras alrededor de discos de inmunosupresores.

50 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, el método para medir cuantitativamente la respuesta de un paciente a un gradiente de fármaco inmunomodulador tiene como objetivo prevenir y tratar estados inflamatorios crónicos tales como esclerosis múltiple progresiva., artritis reumatoide, rechazo de trasplantes y muchos otros.

55 Un segundo aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* de un hidrogel, en el que el hidrogel se forma a través de la reticulación no covalente (hidrogeles físicos) de cadenas poliméricas, en el que la fracción polimérica total representa menos del 5% (5 g/100 ml de hidrogel), y en el que la fracción polimérica total consiste de metilcelulosa y colágeno, en el que el contenido de metilcelulosa es igual o inferior al 4% (g/100 ml de hidrogel), preferiblemente inferior o igual al 2% (g/100 ml de hidrogel), y el contenido de colágeno es inferior o igual al 0,3% (g/100 ml de hidrogel), que comprende a su vez PBMC activadas, leucocitos totales o subpoblaciones específicas de PBMC, incrustados dentro del hidrogel para medir cuantitativamente la respuesta de un paciente a un fármaco inmunomodulador. Preferiblemente, para medir cuantitativamente la respuesta de un paciente a un fármaco inmunomodulador para ayudar al médico a tomar la decisión de qué fármacos/combinaciones, regímenes, dosificaciones, ... deben usarse para tratar a un sujeto, en particular a un paciente humano, preferiblemente que padece un estado inflamatorio crónico, como esclerosis múltiple progresiva, artritis reumatoide o rechazo de trasplantes.

65 Un tercer aspecto de la invención se refiere a un kit o dispositivo adecuado para medir cuantitativamente la

respuesta de un paciente a un fármaco inmunomodulador, que comprende:

- 5 a. un soporte con uno o más canales capaces de comprender un hidrogel que comprende a su vez PBMC activadas, leucocitos totales o subpoblaciones específicas de PBMC, incrustados dentro del hidrogel. Es importante observar que tal soporte o microplaca comprende pocillos canalizados o canales caracterizados por tener unas proporciones dimensionales en las que uno de los tres ejes espaciales (eje longitudinal) es al menos 4 veces, preferiblemente al menos 5 veces, preferiblemente al menos 6 veces, más preferiblemente al menos 7 veces, más preferiblemente al menos 8 veces, más preferiblemente al menos 15 veces, más largo que el promedio de longitud de los otros dos ejes, de modo que el hidrogel es capaz de proporcionar un flujo en gradiente de fármaco medible y estable en el eje mayor de los pocillos canalizados descritos, en el que los pocillos canalizados contienen un volumen de hidrogel por canal de al menos 40 μ l y en el que el pocillo canalizado debe estar completamente cubierto por el hidrogel en su eje longitudinal y debe cubrir al menos el 30% de la altura del pocillo canalizado;

15 y en el que dicho kit o dispositivo comprende además los siguientes elementos:

- 20 a. un compuesto de activación de linfocitos seleccionado de la lista que consiste en: anticuerpos agonistas anti-CD3 (TCR) y CD28, ionomicina y PMA (miristato-acetato de forbol), lectinas, superantígenos, lipopolisacáridos (LPS), determinantes antigénicos o epítopos;
- 25 b. una disolución de cultivo celular capaz de proporcionar un hidrogel, en el que el hidrogel se forma a través de la reticulación no covalente (hidrogeles físicos) de cadenas poliméricas, en el que la fracción polimérica total representa menos del 5% (5 g/100 ml de hidrogel), y en el que la fracción polimérica total consiste en metilcelulosa y colágeno, en el que el contenido de metilcelulosa es igual o inferior al 4% (g/100 ml de hidrogel), preferiblemente inferior o igual al 2% (g/100 ml de hidrogel), y el contenido de colágeno es inferior o igual al 0,3% (g/100 ml de hidrogel); y un
- 30 c. compuesto capaz de revelar un efecto de gradiente de fármaco inmunomodulador, preferiblemente mediante la adquisición de imágenes o la cuantificación de señales.

35 En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, el kit comprende además un soporte físico para poner en contacto el hidrogel con uno o más fármacos inmunomoduladores, tal como un disco, un cilindro o una tira que tiene una concentración del fármaco inmunomodulador., en el que dicho soporte físico está compuesto por cualquier material poroso capaz de liberar el compuesto inmunomodulador una vez en contacto con el hidrogel.

40 En otra realización preferida del tercer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, el kit comprende además fármacos inmunomoduladores tales como un inmunosupresor (glucocorticoides, inhibidores de la calcineurina, inhibidores de mTor, inhibidores de la síntesis de ADN u otros).

45 En otra realización preferida del tercer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, el compuesto de activación de linfocitos son anticuerpos anti-CD3 (TCR) y CD28, preferiblemente perlas poliméricas magnéticas recubiertas con anticuerpos agonistas anti-CD3/CD28 activadores de células T humanas.

50 En otra realización preferida del tercer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, el compuesto capaz de cuantificar un gradiente de fármaco inmunomodulador es una disolución de resazurina.

55 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un uso *in vitro* del kit tal como se define en el tercer aspecto de la invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas, para medir cuantitativamente la respuesta de un paciente a un gradiente de fármaco inmunomodulador. Preferiblemente, para medir cuantitativamente la respuesta de un paciente a un gradiente de fármaco inmunomodulador para ayudar al médico a tomar la decisión de qué fármacos/combinaciones, regímenes, dosificaciones deben usarse para tratar a un sujeto, en particular un paciente humano, preferiblemente que padece un estado inflamatorio crónico tal como esclerosis múltiple progresiva, artritis reumatoide o rechazo de trasplantes. Un ejemplo no limitativo de un estado inflamatorio crónico para el que es útil el kit de la invención sería para el trasplante de órganos tal como trasplante de riñón ante enfermedad renal en fase terminal (ERFT).

60 La enfermedad renal en fase terminal (ERFT) es la última fase de una enfermedad renal crónica que, si no se aborda, conduce a una muerte prematura y, aunque puede tratarse mediante diálisis, el trasplante de riñón es el tratamiento preferido debido a mejores tasas de supervivencia y mejor calidad de vida y rentabilidad. La ERFT puede abordarse de forma clínica mediante diálisis o mediante trasplante de riñón. Debido a las mejores tasas de supervivencia (> 80%), la mejor calidad de vida y la rentabilidad para los sistemas sanitarios (un ahorro mensual promedio de 3.800 € después del trasplante), el trasplante de riñón es, con mucho, el enfoque preferido. Sin embargo, el control clínico de los pacientes trasplantados conlleva varios desafíos tal como se explica a continuación.

65 El desafío más importante es lograr la supervivencia a largo plazo del órgano trasplantado (también conocido como

injerto o aloinjerto). La supervivencia del injerto depende de la capacidad del receptor de no rechazar el "órgano extraño". El rechazo es un proceso que se produce de manera natural desencadenado por una respuesta biológica del sistema inmunitario, cuya función principal en el cuerpo es defenderlo frente a organismos infecciosos y otros invasores. Como tal, el sistema inmunitario está preparado para rechazar un "órgano extraño", algo que actualmente se previene al prescribir terapias inmunosupresoras (fármacos que suprimen/reducen la eficacia del sistema inmunitario) a los pacientes durante toda su vida. Sin embargo, aunque las terapias inmunosupresoras han representado un gran avance en el trasplante de órganos, su uso todavía conlleva problemas importantes. Por un lado, suprimir el sistema inmunitario implica efectos secundarios graves, como infecciones oportunistas, cáncer y otras patologías graves. Por otro lado, incluso con terapias inmunosupresoras, aproximadamente el 50% de los riñones trasplantados se pierden durante los primeros 10 años y esto se debe a una respuesta inmunitaria que se describe generalmente como rechazo crónico. El rechazo de órganos es el desenlace natural después de un trasplante de riñón. El rechazo se produce como resultado de respuestas humorales y mediadas por células por el receptor a antígenos específicos presentes en el tejido del donante. Estos antígenos se conocen como moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) o complejo de antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés) en humanos. El complejo HLA es un grupo de proteínas en las membranas celulares, que se expresan mediante el sistema HLA (código genético) y es único para cada persona, excepto en gemelos monocigóticos (idénticos). Por tanto, el complejo HLA puede considerarse como un "código de identificación único". Cada vez que se introduce un órgano de donante en el cuerpo del receptor, el sistema inmunitario reconoce el complejo HLA de las células del nuevo órgano como un "extraño" e inicia de inmediato la respuesta de rechazo. El rechazo inmediato/a corto plazo se conoce como rechazo agudo y en la actualidad se ha abordado casi totalmente mediante el uso de medicamentos inmunosupresores. La terapia de inmunosupresión se inicia antes de la intervención quirúrgica. En este momento, se administran fármacos inmunosupresores en dosis muy altas, como para suprimir el sistema inmunitario del paciente durante las primeras horas/días después del trasplante. Luego, la terapia de inmunosupresión se reduce gradualmente hasta determinadas dosis para reducir la fortaleza del sistema inmunitario y se mantiene en estos niveles de administración durante toda la vida del paciente. Sin embargo, esta estrategia no es eficaz frente al rechazo renal crónico, que se produce en el 50% de los casos en los siguientes 10 años tras el trasplante (de los cuales el 7-16% en el primer año). El rechazo crónico es actualmente el principal desafío en la terapia renal sustitutiva.

Por tanto, un desafío importante en el trasplante de riñón consiste en encontrar el esquema de tratamiento inmunosupresor más eficaz para cada paciente. Los pacientes que se someten a un trasplante de riñón pueden mostrar 3 perfiles diferentes de respuesta inmunitaria principal a largo plazo (~10 años después del trasplante): respuesta clásica controlada por rechazo (40%), tolerancia al órgano trasplantado que permite la reducción gradual del tratamiento (10%) y el rechazo crónico (50%), entendidos como brotes tardíos de rechazo. Para el 40% de los pacientes con una respuesta clásica, los efectos secundarios inmunosupresores podrían reducirse ajustando el tratamiento a las necesidades reales del paciente. Para el 50% de los pacientes, cuyo desenlace es el rechazo crónico, esto podría prevenirse mediante el ajuste temprano (aumento/cambio) de la terapia de inmunosupresión. Para el 10% de los pacientes que muestran una tolerancia operativa, los fármacos inmunosupresores podrían reducirse o retirarse gradualmente sin comprometer la supervivencia del injerto. Sin embargo, todas estas soluciones no pueden implementarse actualmente en la rutina clínica debido a la falta de medios eficaces para monitorizar la función del aloinjerto y los enfoques de base racional encaminados a la selección de la terapia de inmunosupresión óptima.

En este sentido, la metodología, así como el kit descrito en la presente invención, son particularmente útiles para ayudar al médico a tomar la decisión de qué fármacos/combinaciones, regímenes y/o dosificaciones deben usarse para tratar a un paciente que ha tenido un trasplante de riñón para prevenir el rechazo del órgano. De hecho, tal metodología sería de gran utilidad en este contexto clínico, ya que no hay otro modo aparte de las directrices clínicas y el ensayo/error para tomar la decisión de qué esquema de inmunosupresión va a usarse después del trasplante de riñón. Además, no existe un sistema para monitorizar la evolución de la "sensibilidad" de las células del sistema inmunitario a estos tratamientos, tal como se realiza actualmente (por ejemplo) con antibióticos para el tratamiento de infecciones de larga duración, en el que la sensibilidad de los microorganismos objetivo a los antibióticos se controla con el tiempo y se modifica el tratamiento en consecuencia.

Ejemplos

Materiales y métodos.

- Aislamiento de células sanguíneas inmunitarias periféricas.

Después de la extracción de sangre humana por venopunción, pudo evaluarse la separación de las células inmunitarias de la muestra de sangre completa mediante lisis de los eritrocitos, el aislamiento de las células mononucleares (PBMC) mediante separación por gradiente de densidad y la agrupación de métodos de clasificación sin flujo, como las separaciones con perlas magnéticas, para el enriquecimiento de poblaciones celulares específicas, incluidos monocitos, linfocitos T, linfocitos B, neutrófilos, etc. Inicialmente, una muestra de sangre completa o una fracción obtenida tal como se describió anteriormente, podría usarse recientemente para ensayos *in vitro* o de fenotipado adicionales o congelarse inmediatamente para estudios adicionales después del método de

descongelación apropiado.

- Estimulación de PBMC

5 Se activaron células T de PBMC a través de la incubación con anticuerpos agonistas anti-CD3/CD28 activadores de células T humanas en perlas Dynabead (Thermo Fisher, nº de cat. 111.32D) usando una razón 1:2 (perlas Dynabead:PBMC) en un frasco de cultivo celular. También se cultivaron PBMC en ausencia de perlas Dynabead como control negativo de estimulación.

10 Sin embargo, deben considerarse otros tipos de compuestos de activación de linfocitos tales como:

a. Ionomicina + PMA (miristato-acetato de forbol):

15 La ionomicina es un ionóforo de calcio derivado de bacterias (*Streptomyces conglobatus*), que aumenta los niveles de calcio intracelular (Ca^{2+}). El PMA es un éster de forbol que induce una activación específica de la PKC (proteína cinasa C) y de la misma de la ruta de NF- κ B (respuesta fisiológica a TNF, LPS, CMH-TCR, BCR y receptores de factores de crecimiento). Ambos compuestos estimulan todo tipo de células y en las PBMC inducen la producción de varias citocinas, incluyendo IFN-g, IL-2, IL-4 y perforinas.

20 b. Lectinas (Con A / PHA / PWM):

25 Proteínas de origen vegetal (semillas leguminosas), con alta afinidad para hidratos de carbono (glicoproteínas y glicolípidos). Estas proteínas inducen la proliferación de células T a través de la aglutinación inespecífica de receptores de membrana, que reproducen los efectos de la estimulación inmunológica de tipo 1 y 2.

Con A: Concanavalina A, PHA: fitohemaglutinina, PWM: mitógeno de fitolaca

30 c. Superantígenos:

35 Proteínas derivadas de virus y bacterias que inducen la unión inespecífica de CMH-TCR que induce la activación policlonal de linfocitos y la liberación masiva de citocinas. Estas proteínas son capaces de activar el 25% de los linfocitos en ausencia de determinantes antigénicos, algunos de ellos pueden estimular específicamente los linfocitos B.

d. Lipopolisacárido (LPS):

40 Derivados de la pared de bacterias Gram-negativas (endotoxinas) que se unen al complejo de membrana CD14/TLR4/MD2 de diferentes tipos de células (monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B) que inducen citocinas proinflamatorias, NO y eicosanoides. Aunque LPS de monocitos inducen la liberación de IL-10 y la activación de Treg (perfil inmunosupresor).

45 e. Antígeno determinante o epítipo (péptidos):

50 Secuencias peptídicas presentadas en el CMH (tipo II) de las células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B) al TCR de los linfocitos T. Estos péptidos inducen la activación específica de antígeno a través de la señal inmunológica de tipo 1. Esta estimulación es limitada, depende de la componente de memoria inmunológica y se usa para elementos de estimulación secundaria requeridos (IL-2) y para generar respuestas proliferativas potentes.

f. Reacción linfocítica mixta (MLR):

55 Respuesta proliferativa inducida por el cocultivo *in vitro* de leucocitos de diferentes donantes o especies. Las células T de un donante reaccionan a los antígenos expresados por CMH de otros. La población de células de un donante suele tratarse con radiación o mitomicina C para bloquear la proliferación celular.

60 - Procedimientos de preparación de hidrogeles:

65 Metilcelulosa: se calentó una disolución de metilcelulosa Clonacell™ (Stemcell Technologies) en un baño de agua a 37°C durante 1 h, luego se añadieron 5 ml de PBS-10x (Biosolve) a 45 ml de disolución de Clonacell, finalmente 45 ml de disolución de metilcelulosa completa X-VIVO (Lonza). Se añadieron las células a X-VIVO con una razón en volumen de 1:20 con la disolución de metilcelulosa preparada previamente.

Colágenos: se prepararon hidrogeles de colágeno con disolución de PureCol® EZ Gel al 0,5% (Advance Biomatrix)

en hielo hasta su uso, hasta un % deseado final diluido en X.-VIVO (Lonza). Después de la adición de células y la distribución en placas, la gelificación requiere 90 minutos.

5 Se prepararon hidrogeles de copolímero de colágeno y metilcelulosa mezclando a 4°C, el 70% en volumen de la disolución de metilcelulosa preparada previamente. Metilcelulosa: Clonacell™ (Stemcell Technologies) y el 30% en volumen de la disolución de PureCol® EZ Gel al 0,5% (Advance Biomatrix) para una composición de hidrogel final de colágeno al 0,15%. Después de la adición de células y la distribución en placas, la gelificación a 37°C requiere entre 5 y 30 minutos.

10 Agarosa: se prepararon hidrogeles de agarosa con gel de agarosa al 4% (Gibco) calentado en baño de agua hasta 70-80°C durante 10-15 minutos y luego se almacenaron en un baño de agua a 37°C hasta su uso hasta un % deseado final diluido en X.-VIVO (Lonza). La gelificación tiene lugar en segundos-minutos en un proceso que depende del tiempo, la temperatura y el % de agarosa.

15 Péptidos de autoensamblaje: se preparó un hidrogel peptídico con 22 mg de polvo de gel peptídico Biogelx (Biogelx) en 5 ml de agua ultrapura estéril y se almacenó a 4°C. Después de la adición de las células y la distribución en placas, después de 90 minutos a 37°C y el 5% de CO₂, se añadió medio X-VIVO a los pocillos y se reemplazó después de 3 horas adicionales.

20 - Discos inmunosupresores

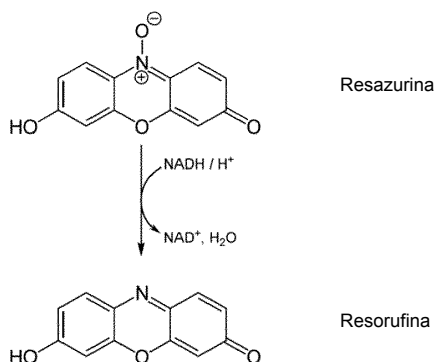
Se usaron discos de papel de 6 mm de diámetro como unidades de administración de inmunosupresores. Se obtuvieron los discos con el taladro manual de hoja de papel de cromatografía Whatman™, CHR de 3 mm o usando un disco de papel comercial listo para usarse (DDbiolab). Se esterilizaron los discos mediante tratamiento en autoclave. Se disolvieron los fármacos inmunosupresores (Sigma Aldrich) en etanol puro (Sigma Aldrich) a 20 mg/ml y se almacenaron como disolución madre a -20°C hasta su uso. Se cargaron los discos en una campana extractora estéril con 10-15 ul de etanol que contenían diferentes cantidades de fármacos inmunosupresores, oscilando entre 0,1 y 200 µg por disco. Después de la evaporación del etanol (1 hora a 37°C o 3 horas a temperatura ambiente), se colocaron los discos en el centro (pocillos circulares) o en el borde (pocillos canalizados) de hidrogeles que contenían PBMC, de 1 a 6 horas después de la adición de las células de hidrogel para garantizar un proceso de gelificación adecuado.

- Adición de resazurina

35 Se añadió disolución de resazurina (Presto Blue, Thermo Fisher) en diferentes periodos de tiempo en una razón en volumen de 1:10 respecto del volumen final (volumen de hidrogel y Presto Blue + X-VIVO).

Mecanismo de acción de resazurina: la resazurina (10-óxido de 7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona) es un colorante azul, débilmente fluorescente en sí mismo hasta que se reduce irreversiblemente al compuesto de color rosa y altamente fluorescente en el rojo. Se usa como indicador de oxidación-reducción en los ensayos de viabilidad celular para bacterias y células de mamíferos, y para medir la respiración aerobia y el intercambio con la zona hiporreica en arroyos. Por lo general, está disponible comercialmente como la sal de sodio.

45 La disolución de resazurina tiene uno de los valores más altos conocidos del índice de Kreft. Esto significa que tiene un gran cambio en el color percibido (resolución) cuando el grosor o la concentración de la muestra observada aumenta o disminuye.



50 La resazurina se reduce eficazmente en las mitocondrias, haciendo que también sea útil para evaluar la actividad metabólica mitocondrial. Habitualmente, en presencia de NADPH deshidrogenasa o NADH deshidrogenasa como enzima, NADPH o NADH es el reductor que convierte la resazurina en resorufina. Por tanto, el sistema de resazurina/diaforasa/NADPH puede usarse para detectar el nivel de NADH, NADPH o diaforasa, y cualquier actividad bioquímica o enzimática que esté involucrada en una reacción bioquímica que genere NADH o NADPH.

Están disponibles otras opciones para revelar la actividad celular y podrían ser compatibles con el ensayo de hidrogel para definir zonas inhibitoras alrededor de discos de inmunosupresores.

- Adquisición de imágenes - cuantificación de halos

La transición de resazurina (azul) a resorufina (rosa) se monitorizó a simple vista o se comprobó después de la incubación durante la noche dependiendo del diseño del ensayo. Se detuvo la reacción con incubación a 4°C. Se recopilaron los resultados a través de adquisición de imágenes con luz visible (cámara Sanyo S1070 y E1075), luz ultravioleta (sistema de obtención de imágenes con luz en gel UVItec Geldoc) y lector múltiple de microplacas por fluorescencia (lector de microplacas multimodal PHERAstar® FSX de BMG LABTECH o Spark® 10M Tecan.). Se cuantificaron los frentes o halos de gradientes inhibitorios inducidos por discos cargados con inmunosupresores con el software ImageJ en un proceso semiautomatizado o el software Spark control v1.2.25.

EJEMPLO 1. Ensayo de difusión en disco en medios semisólidos (hidrogeles de agarosa al 0,5% e colágeno al 0,3%)

Se prepararon hidrogeles poliméricos de agarosa y colágeno a partir de una disolución madre concentrada (al 4% y al 0,5% g/100 ml, respectivamente) y se diluyeron en medio de cultivo celular hasta un porcentaje final del 0,5 y el 0,3% g/100 ml, respectivamente. La disolución madre de agarosa requiere fusión previa a 70°C y la disolución madre de colágeno requiere manipulación a 4°C hasta su uso para evitar la gelificación prematura. Se añadieron inmediatamente células inmunitarias, previamente aisladas y contadas, y se mezclaron con la disolución de hidrogel a una concentración en el intervalo de 500.000 células/ml, generando una dispersión de células 3D homogénea. Ambas disoluciones se volvieron semisólidas en un periodo de tiempo que osciló desde 30 hasta 90 minutos, según la temperatura (T.A. o 37°C) y el porcentaje de polímero. Después de la gelificación, se colocaron discos con diferentes contenidos de ciclosporina A en el centro de los pocillos sobre la superficie del hidrogel. Después de 24 horas de incubación a 37°C y el 0,5% de CO₂, se añadió la disolución de resazurina (Presto Blue®) a cada pocillo en una razón volumétrica de 1:10 y se incubó adicionalmente durante 4-8 h.

Se muestran los resultados en las figuras 1 a 6. La resazurina se redujo solo por las células viables activadas que generan un compuesto rosa y fluorescente (resorufina) que revela un gradiente azul de fluorescencia reducida en el hidrogel alrededor del disco que se corresponde con las células inhibidas por el inmunosupresor de manera dependiente de la dosis generada por la difusión pasiva del compuesto en el hidrogel. Los halos inhibitorios obtenidos fueron proporcionales al contenido del disco de inmunosupresor.

Tal como se muestra en los resultados proporcionados, el ensayo de hidrogel 3D es capaz de cuantificar un efecto inhibitorio dependiente de la dosis de ciclosporina A sobre la proliferación de PBMC humanas con una buena linealidad. Estos resultados implican la capacidad del ensayo biológico para detectar variaciones mínimas en la susceptibilidad del paciente a diferentes gradientes de compuestos inmunosupresores.

EJEMPLO 2. Comparativa entre diferentes medios semisólidos.

Se prepararon diferentes composiciones de hidrogeles (agarosa, metilcelulosa, colágeno y péptidos de autoensamblaje) y porcentajes en medio celular X-VIVO (Lonza). Se añadieron inmediatamente PBMC previamente aisladas (activadas durante 24 h con anticuerpo antiCD3-CD28: control positivo y PBMC no activadas: control negativo) a la mezcla de hidrogel-medio celular a una concentración en el intervalo de 500.000 células/ml, generando una dispersión homogénea de células 3D. Después del tiempo apropiado para permitir el proceso de gelificación (de 30 a 90 minutos) y un periodo de incubación adicional de 24 ó 48 horas a 37°C y el 0,5% de CO₂, se añadió la disolución de resazurina (Presto Blue®) a cada pocillo en una razón volumétrica de 1:10 y se incubó adicionalmente durante 6-20 h. La ventana de activación entre PBMC activadas y no activadas depende del tiempo, la composición química del polímero de hidrogel y la rigidez, entendida como un parámetro proporcional al porcentaje de fracción polimérica.

Tal como se ilustra en la figura 7, los hidrogeles basados únicamente en metilcelulosa y péptidos de autoensamblaje no sostienen la viabilidad y la proliferación de PBMC activadas de manera tan óptima como los hidrogeles de colágeno o agarosa. Estos compuestos son productos comerciales listos para usarse sin opciones de dilución. En cambio, la agarosa al 0,5% (g/100 ml) y el colágeno al 0,3% (g/100 ml) generan un entorno adecuado para la proliferación de PBMC.

Se sometió a prueba adicionalmente el colágeno basado en la viabilidad de dilución en diferentes concentraciones (véase la figura 8). Tal como se indica en la figura 8, las concentraciones de colágeno por debajo del 5% g/100 ml permiten la proliferación/viabilidad de PBMC activadas. La diferencia entre el control negativo y el positivo aumenta con el tiempo, y se detectó cierta activación inespecífica de las células en los cortos tiempos de incubación después de la estimulación de PBMC (alrededor de 24 h). En conclusión, los porcentajes de colágeno por encima del 0,3% g/100 ml no son compatibles con el ensayo propuesto.

Con respecto al porcentaje óptimo de agarosa para el cultivo de PBMC, las concentraciones de agarosa por encima

del 1% g/100 ml son difíciles de manipular durante el ensayo debido a la viscosidad creciente y también ejerce un efecto inhibitor sobre la proliferación/viabilidad de PBMC. En conclusión, solo los porcentajes de agarosa por debajo del 0,5% g/100 ml son compatibles con el ensayo propuesto.

- 5 La composición química y la densidad de la red polimérica (%) afectan gravemente a la respuesta y la viabilidad de las células del sistema inmunitario en el cultivo celular 3D. En general, un alto contenido en % polimérico inhibe la viabilidad celular y algunas características químicas de algunos polímeros son capaces de inducir una activación inespecífica de PMBC (ejemplo: colágeno). Basándose en estas interacciones potenciales, cada nueva composición de hidrogel definida, compuesta por uno o varios compuestos químicos poliméricos diferentes, podría ejercer diferentes efectos sobre el ensayo biológico de difusión en disco que deben considerarse caso por caso.

EJEMPLO 3. Métodos de dilución de medios líquidos en formato de microplaca en el contexto de la inhibición proliferativa específica de PBMC activadas.

- 15 Se extrajeron PBMC humanas para bolsas de capa leucocítica de una donación de voluntarios del banco de sangre mediante centrifugación en gradiente de densidad en disoluciones de polisacáridos isosmóticos hidrófilos adecuados con una densidad de 1,077 g/ml (Pancoll, PAN BIOTECH GmbH o Ficoll, GE Healthcare) a 760 G durante 20 minutos a T.A. Se extrajeron las células con una pipeta de la interfase del gradiente y luego se lavaron en HBSS sin Ca, Mg y rojo de fenol (Lonza) y se resuspendieron en medio X-VIVO 15 (Lonza). Se congelaron las células obtenidas en crioviales con medio libre de suero (Profreeze-CDM, Lonza) DMSO (Sigma Aldrich) al 7,5% y se almacenaron hasta su uso en nitrógeno líquido.

- 25 Unos días más tarde, se descongelaron inmediatamente los viales retirados del nitrógeno líquido en un baño de agua a 37°C durante 2 minutos. Cuando las células se descongelaron casi por completo, se arrastraron los viales con etanol al 70% en una campana extractora estéril. Se diluyó el contenido del vial en 10 ml de medio X-VIVO precalentado a 37°C en tubos Falcon de 15 ml. Centrifugar a 400G durante 5 minutos. Después de desechar el sobrenadante, se resuspendieron las células en medio X-VIVO para una cuantificación de viabilidad y recuento adicionales.

- 30 Después de descongelar las PBMC, se cuantificó la viabilidad con azul tripano y cámara de Neubauer. Luego, se sembraron en placa 35 x 10³ células viables por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo, en 100 ul de medio X-VIVO en presencia o ausencia de estimulación proliferativa con anticuerpos agonistas anti-CD3/CD28 activadores de células T humanas en perlas Dynabead (Thermo Fisher, n.º de cat. 111.32D) usando una razón 1:2 (perlas Dynabead: PBMC). Se incubaron las células a 37°C con el 5% de CO₂.

- 35 Después de 24 horas, se añadieron diluciones en serie 1/3 de ciclosporina A (Sigma) (ejemplo de fármaco inmunosupresor) a las células en 100 ul de medio de cultivo X-VIVO. Se preparó una disolución madre de ciclosporina A con DMSO o etanol (Sigma) a 20 mg/ml y se almacenó a -20°C hasta su uso, se diluyó una alícuota de disolución madre en medio X-VIVO hasta las concentraciones finales deseadas. La ciclosporina A a 100 ug/ml en este medio y condiciones permanece sin disolverse a nivel macroscópico: la mayor concentración de DMSO en el cultivo celular alcanza el 0,5% (por debajo del límite de toxicidad del 1%)

- 45 Se añadió disolución de resazurina (Presto Blue, Thermo Fisher) después de 96 horas (24 h de incubación con perlas Dynabead más 72 h adicionales de incubación en presencia o ausencia de ciclosporina A). Se retiraron y desecharon los primeros 100 ul por pocillo, luego se añadió la disolución de Presto Blue en una razón en volumen de 1:10 respecto del volumen final de 150 ul por pocillo (Presto Blue + X-VIVO). El volumen final de cada pocillo se homogeneizó con un pipeteo con pipeta multicanal 3 veces para desagregar la masa de células en crecimiento y acelerar la reducción de resazurina a través de la interacción con células en proliferación.

- 50 Después de 10-12 horas de incubación con Presto Blue, se transfirieron 100 ul de cada pocillo a una placa de ELISA de 96 pocillos, y luego se cuantificó la absorbancia a una longitud de onda de 570 y 620 nm en un lector robótico de microplacas de absorbancia (Tekan, Infinite F50). Se obtuvieron los valores finales como resultado de la absorbancia a 570 nm menos la absorbancia a 620 nm, siguiendo las instrucciones del fabricante de Presto Blue (Thermo Fisher). La absorbancia corregida es una medida directa de la reducción de resazurina a resorufina, inducida por la actividad celular, que representa una medida indirecta de la proliferación y viabilidad celular.

- 55 El valor de CI₅₀ permite que se representen gráficamente los datos biológicos de dosis-respuesta y se ajusten a una curva para obtener la concentración del ligando del punto medio como la determinación de la concentración inhibitora de la ciclosporina A que redujo el 50% de la proliferación de PBMC activadas. Se obtuvo el valor de CI₅₀ usando el paquete de software GNUPLLOT. Se muestran los resultados en las figuras 10 y 11. En el contexto de intentar generar un método potencial para predecir y monitorizar las terapias inmunomoduladoras de respuesta clínica, el presente método de dilución establecido en formato de microplaca presenta claras desventajas en comparación con el formato 3D de hidrogel. El formato de dilución de líquido requiere casi el doble de tiempo del periodo de cultivo celular (48 h frente a 96 h) para detectar variaciones de respuesta en la proliferación de linfocitos humanos activados. Además, la titulación en microplacas requiere diluciones en serie manuales o automáticas al menos por triplicado para un poder estadístico aceptable, mientras que el formato de hidrogel genera un proceso en

gradiente normalizado pasivo. La solubilidad de los compuestos sometidos a prueba (generalmente, hidrófobos) implica problemas de diluciones previas con disolventes orgánicos, falta de reproducibilidad y etapas manuales adicionales; por el contrario, el formato de hidrogel implica una difusión pasiva de la fracción soluble de los compuestos inmunomoduladores sometidos a prueba desde dispositivos de administración en seco. Por todos estos motivos, el formato de hidrogel presenta un mejor perfil de simplicidad, eficiencia potencial, variabilidad reducida y plazo de entrega mejorado.

EJEMPLO 4. Ensayo de difusión en disco en medios semisólidos (agarosa al 0,5%) para la cuantificación de la actividad de diferentes fármacos inmunosupresores

Siguiendo el protocolo detallado en el ejemplo 1, se sometieron a prueba otros fármacos inmunosupresores, representativos de determinadas clases farmacéuticas, en el ensayo de difusión en disco. El ácido micofenólico (MFA) como inhibidor de la síntesis de ADN, la metilprednisolona como un glucocorticoide, el everolimús como inhibidor de mTOR y la ciclosporina A como inhibidor de la calcineurina se presentaron en el ejemplo 1. Los halos inhibidores dependientes de la dosis se cuantificaron y presentaron en la figura 12. El ensayo biológico de difusión en disco proporciona una herramienta capaz de cuantificar la susceptibilidad de células activadas por PBMC derivadas humanas a diferentes clases de fármacos inmunosupresores.

EJEMPLO 5. Limitaciones de titulación de la microplaca de 48 pocillos para diferentes efectos de dosis de disco cargado con inmunosupresores y gradiente insuficiente sobre PBMC activadas, incluidas en el hidrogel de copolímero (colágeno - metil celulosa).

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad discontinua en medio de separación de Percoll-Hanks y se congelaron en medio Profreeze al 7,5% en DMSO hasta su uso. Se descongelaron las PBMC crioconservadas previamente, con un lento proceso de descongelación que incluía el calentamiento de los crioviales hasta 37°C y la adición de un medio de lavado tibio. Después del proceso de descongelación, el 80% del total de células se activaron durante 48 h con perlas Dynabead® a 37°C y el 5% de CO₂ y el 20% de las células se incubaron en las mismas condiciones sin estímulo de activación.

48 h después de la activación, se recogieron las células tratadas con perlas Dynabead y las células no tratadas y se sembraron en placa en una placa de 48 pocillos a una concentración de 500.000 células/ml en un copolímero Thermogel constituido por el 30% de disolución de PureCol® EZ Gel al 0,5% (Advance Biomatrix) más el 70% de metilcelulosa ClonaCell (Stem Cell Technologies) para una composición final de hidrogel de colágeno al 0,15%. Se mantienen todos los componentes de Thermogel a 4°C para mantener el estado líquido durante el proceso de mezcla. Se ponen las células en Thermogel a 37°C, el 5% de CO₂ durante 5 minutos y luego se sitúan los discos que contienen IMS en el centro del pocillo (extremo del canal).

20-24 horas después de la incubación, para realizar una cuantificación rápida de la viabilidad celular, se realizó un ensayo basado en resazurina y 4-6 h después de la adición de resazurina, se analizó la placa con un fluorímetro. Mientras tanto, las disoluciones madre de inmunosupresores (IMS) se diluyeron en EtOH absoluto hasta la concentración final deseada y se añadieron a un disco de celulosa para permitir la absorción de los IMS y la evaporación del EtOH absoluto. Se ponen las células en Thermogel a 37°C, el 5% de CO₂ durante 5-20 minutos y luego se sitúan los discos que contienen IMS en el centro del pocillo (extremo del canal). 20-24 horas después de la incubación, para realizar una cuantificación rápida de la viabilidad celular, se realizó un ensayo basado en resazurina y 4-6 horas después de la adición de resazurina, se analizó la placa con un fluorímetro (Tecan Spark 10M).

Se midió la señal fluorescente neta de cada pocillo (figura 16-A), así como la señal de diferentes puntos espaciales dentro de algunos pocillos (figura 16-B).

EJEMPLO 6. Ensayo de difusión en disco en medios semisólidos (metilcelulosa/colágeno) incluidos en la microplaca de los pocillos canalizados para la cuantificación de la actividad de diferentes fármacos inmunosupresores

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad discontinua en medio de separación de Percoll-Hanks y se congelaron en medio Profreeze al 7,5% en DMSO hasta su uso. Se descongelaron las PBMC crioconservadas previamente, con un lento proceso de descongelación que incluía el calentamiento de los crioviales hasta 37°C y la adición de un medio de lavado tibio. Después del proceso de descongelación, el 80% del total de células se activaron durante 48 h con perlas Dynabead® a 37°C y el 5% de CO₂ y el 20% de las células se incubaron en las mismas condiciones sin estímulo de activación.

48h después de la activación, se recogieron las células tratadas con perlas Dynabead y las células no tratadas y se sembraron en depósitos de 12 canales de poliestireno a una concentración de 500.000 células/ml en un medio Thermogel constituido por el 30% de disolución de PureCol® EZ Gel al 0,5% (Advance Biomatrix) más el 70% de metilcelulosa ClonaCell (Stem Cell Technologies) para una composición de hidrogel final de colágeno al 0,15%. Se mantienen todos los componentes de Thermogel a 4°C para mantener el estado líquido durante el proceso de mezcla. Mientras tanto, las disoluciones madre de inmunosupresores (IMS) se diluyeron en EtOH absoluto hasta la

5 concentración final deseada y se añadieron a un disco de celulosa para permitir la absorción de los IMS y la evaporación del EtOH absoluto. Se ponen las células en Thermogel a 37°C, el 5% de CO₂ durante 5-20 minutos y luego se sitúan los discos que contienen IMS en el extremo del canal. 20-24 horas después de la incubación, para realizar una cuantificación rápida de la viabilidad celular, se realizó un ensayo basado en resazurina y 4-6 horas después de la adición de resazurina, se analizó la placa con un fluorímetro (Tecan Spark 10M). se adquirió la señal fluorescente de los pocillos canalizados y se representó en la figura 17.

REIVINDICACIONES

1. Método para medir cuantitativamente la respuesta de un paciente a un fármaco inmunomodulador, comprendiendo el método las siguientes etapas:
- 5 a. activar células mononucleares de sangre periférica (PBMC), leucocitos totales o subpoblaciones específicas de PBMC tales como linfocitos T, células T reguladoras (Treg), NK (linfocitos citolíticos naturales), macrófagos o linfocitos B, obtenidos de una muestra biológica seleccionada de la lista que consiste en derivados celulares de la sangre o en la sangre del paciente, a través de la

10 incubación con un compuesto de activación de linfocitos seleccionado de la lista que consiste en: anticuerpos agonistas anti-CD3 (TCR) y anti-CD28, ionomicina y PMA (miristato-acetato de forbol), lectinas, superantígenos, lipopolisacáridos (LPS), determinantes antigénicos o epítomos o a través de una reacción linfocítica mixta;
 - 15 b. obtener un hidrogel que comprende a su vez las PBMC activadas, leucocitos totales o subpoblaciones específicas de PBMC, incrustados dentro del hidrogel, en el que el hidrogel está ubicado en un soporte caracterizado por tener unas proporciones dimensionales en las que uno de los tres ejes espaciales (eje longitudinal) es al menos 4 veces más largo que el promedio de longitud de los otros dos ejes, de modo que el hidrogel es capaz de proporcionar un flujo en

20 gradiente de fármaco medible y estable en el eje mayor de los pocillos canalizados descritos, en el que los pocillos canalizados contienen un volumen de hidrogel por canal de al menos 40 μ l y en el que el pocillo canalizado debe estar completamente cubierto por el hidrogel en su eje longitudinal y debe cubrir al menos el 30% de la altura del pocillo canalizado;
 - 25 c. poner en contacto el hidrogel de la etapa b) con uno o más fármacos inmunomoduladores;
 - d. añadir una disolución de un compuesto capaz de revelar una zona inhibidora alrededor del sitio de contacto del fármaco inmunosupresor con el hidrogel;
 - 30 e. obtener la cuantificación del gradiente de fármaco inmunomodulador formado, preferiblemente mediante la adquisición de imágenes o la cuantificación de señales (absorbancia, fluorescencia o luminiscencia);
- 35 en el que el hidrogel se forma a través de la reticulación no covalente (hidrogeles físicos) de cadenas poliméricas, en el que la fracción polimérica total representa menos del 5% (5 g/100 ml de hidrogel), y en el que la fracción polimérica total consiste en metilcelulosa y colágeno, en el que el contenido de metilcelulosa es igual o inferior al 4% (g/100 ml de hidrogel), preferiblemente inferior o igual al 2% (g/100 ml de hidrogel), y el contenido de colágeno es inferior o igual al 0,3% (g/100 ml de hidrogel).
- 40 2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de activación a) se realiza usando anticuerpos agonistas anti-CD3 (TCR) y anti-CD28, preferiblemente perlas poliméricas magnéticas recubiertas con anticuerpos agonistas anti-CD3/CD28 activadores de células T humanas.
 - 45 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el hidrogel contiene más del 95% de fase acuosa, preferiblemente más del 97%, siendo esta fase acuosa un medio de cultivo celular, preferiblemente medios mínimos sin suero animal, rojo de fenol o antibióticos.
 - 50 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la disolución de la etapa d) es una disolución de resazurina.
 5. Uso *in vitro* de un hidrogel según la reivindicación 1, que comprende a su vez PBMC activadas, leucocitos totales o subpoblaciones específicas de PBMC, incrustados dentro del hidrogel, para medir cuantitativamente la respuesta de un paciente a un fármaco inmunomodulador.
 - 55 6. Kit o dispositivo adecuado para medir cuantitativamente la respuesta de un paciente a un gradiente de fármaco inmunomodulador, que comprende:
 - 60 a. un soporte con uno o más canales capaces o adecuados para comprender un hidrogel que comprende a su vez PBMC activadas, leucocitos totales o subpoblaciones específicas de PBMC, incrustados dentro del hidrogel, caracterizado por tener unas proporciones dimensionales en las que uno de los tres ejes espaciales (eje longitudinal) es al menos 4 veces más largo que el promedio de longitud de los otros dos ejes, de modo que el hidrogel es capaz de proporcionar un flujo en gradiente de fármaco medible y estable en el eje mayor de los pocillos canalizados descritos, y en el que los pocillos canalizados contienen un volumen de hidrogel por canal de al menos 40 μ l; y
 - 65 b. un compuesto de activación de linfocitos seleccionado de la lista que consiste en: anticuerpos agonistas

anti-CD3 (TCR) y CD28, ionomicina y PMA (miristato-acetato de forbol), lectinas, superantígenos, lipopolisacáridos (LPS), determinantes antigénicos o epítomos;

5 c. una disolución de cultivo celular capaz de proporcionar un hidrogel, en el que el hidrogel se forma a través de la reticulación no covalente (hidrogeles físicos) de cadenas poliméricas, en el que la fracción polimérica total representa menos del 5% (5 g/100 ml de hidrogel), y en el que la fracción polimérica total consiste en metilcelulosa y colágeno, en el que el contenido de metilcelulosa es igual o inferior al 4% (g/100 ml de hidrogel), preferiblemente inferior o igual al 2% (g/100 ml de hidrogel), y el contenido de colágeno es inferior o igual al 0,3% (g/100 ml de hidrogel); y un

10 d. compuesto capaz de revelar un efecto de gradiente de fármaco inmunomodulador, preferiblemente mediante la adquisición de imágenes o la cuantificación de señales.

15 7. Kit según la reivindicación 6, en el que el kit comprende además un soporte físico para poner en contacto el hidrogel con uno o más fármacos inmunomoduladores tales como un disco, un cilindro o una tira que tiene una concentración del fármaco inmunomodulador, en el que dicho soporte físico está compuesto por cualquier material poroso capaz de liberar el compuesto inmunomodulador una vez en contacto con el hidrogel.

20 8. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, en el que el kit comprende además un fármaco inmunomodulador.

25 9. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el compuesto de activación de linfocitos son anticuerpos anti-CD3 (TCR) y CD28, preferiblemente perlas poliméricas magnéticas recubiertas con anticuerpos agonistas anti-CD3/CD28 activadores de células T humanas.

10. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que el compuesto capaz de revelar un efecto de gradiente de fármaco inmunomodulador es una disolución de resazurina.

30 11. Uso *in vitro* del kit según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, para medir cuantitativamente la respuesta de un paciente a un fármaco inmunomodulador.

Fig. 1.

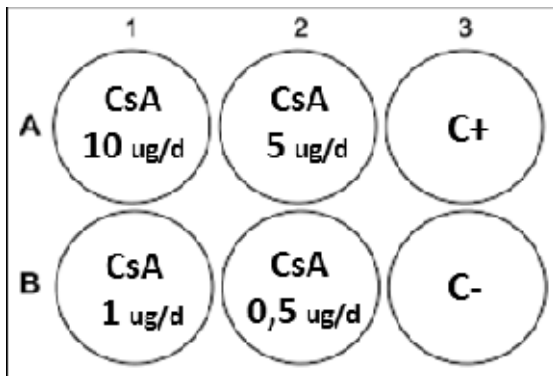
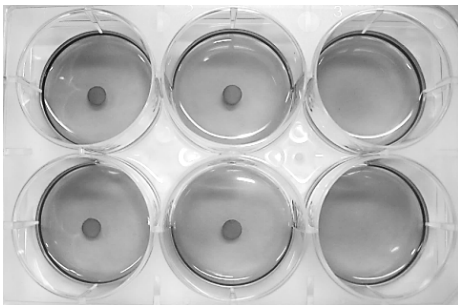


Fig. 2

A



B

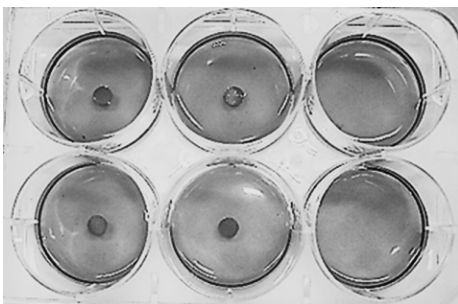
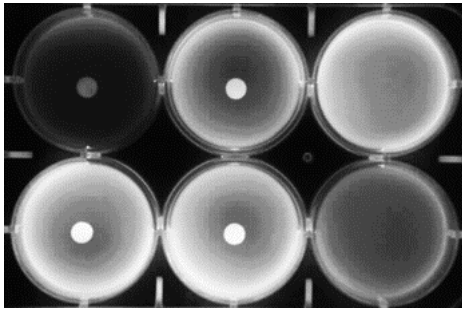


Fig. 3

A



B

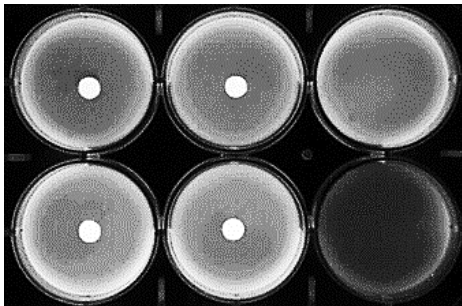
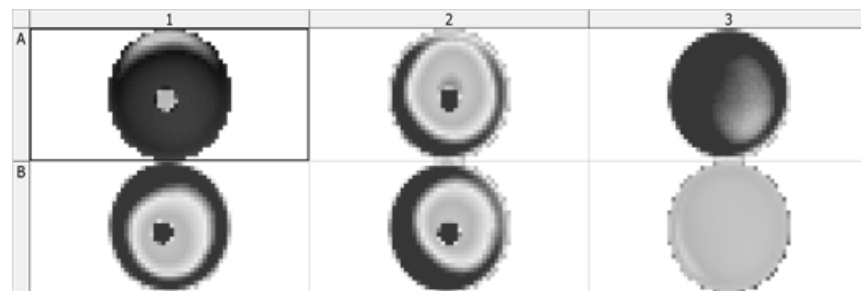


Fig. 4

A



B

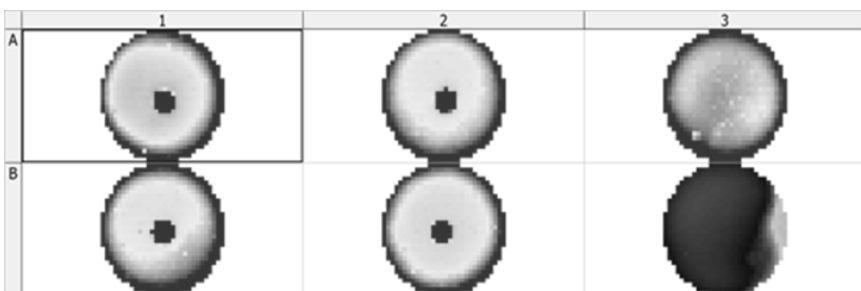
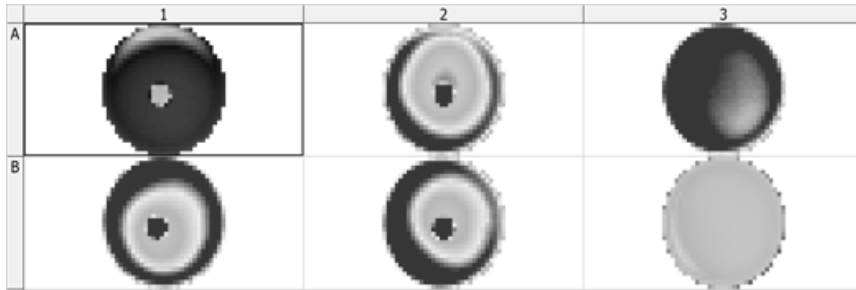


Fig. 5

A



B

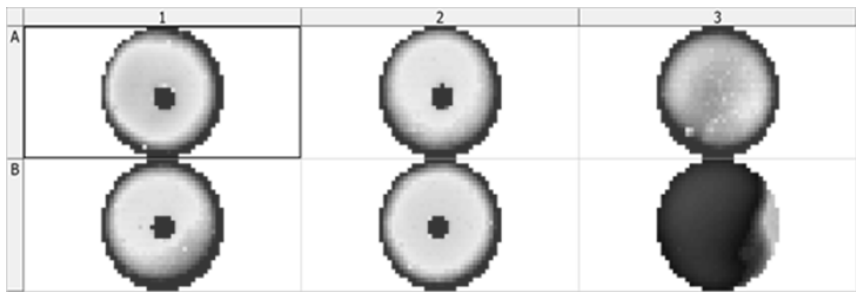
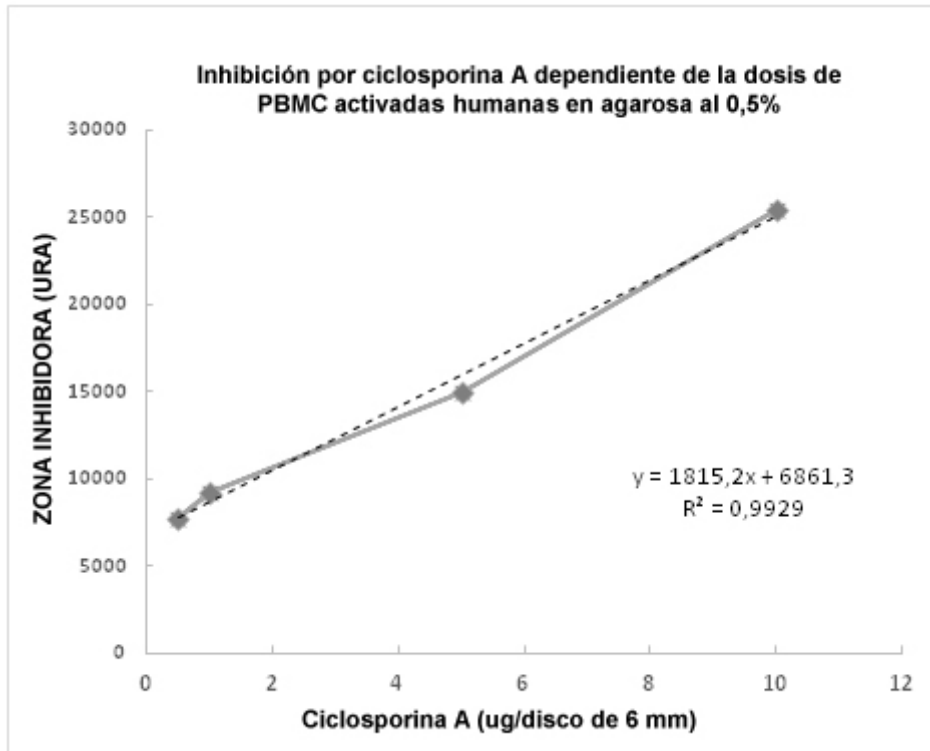


Fig. 6

A



B

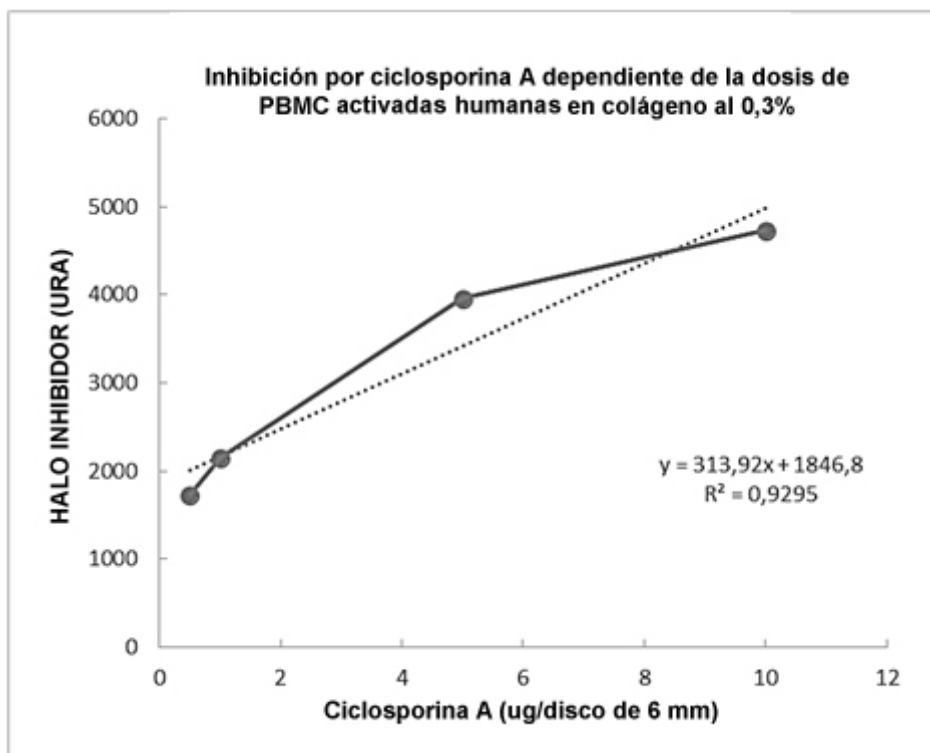


Fig. 7.

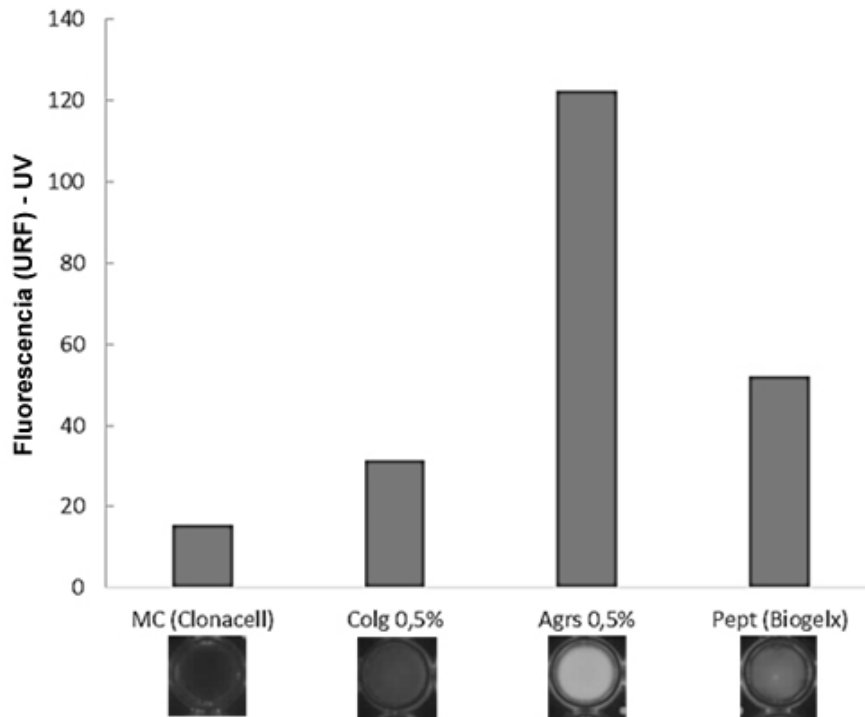


Fig. 8

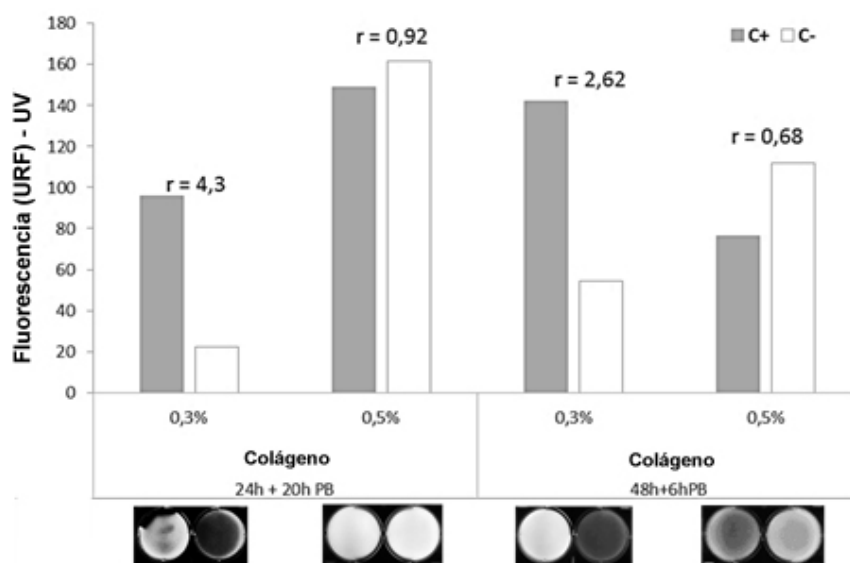


Fig. 9

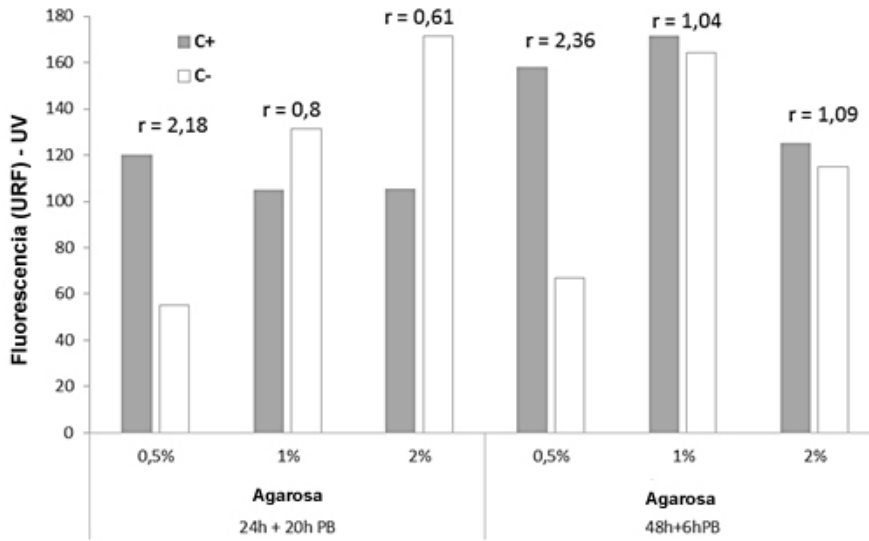


Fig. 10

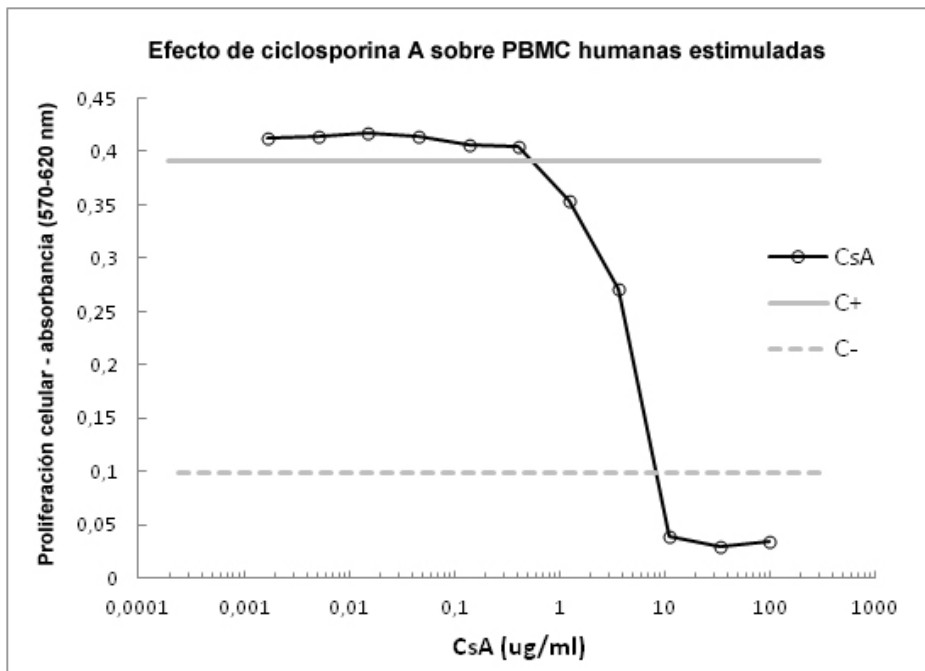
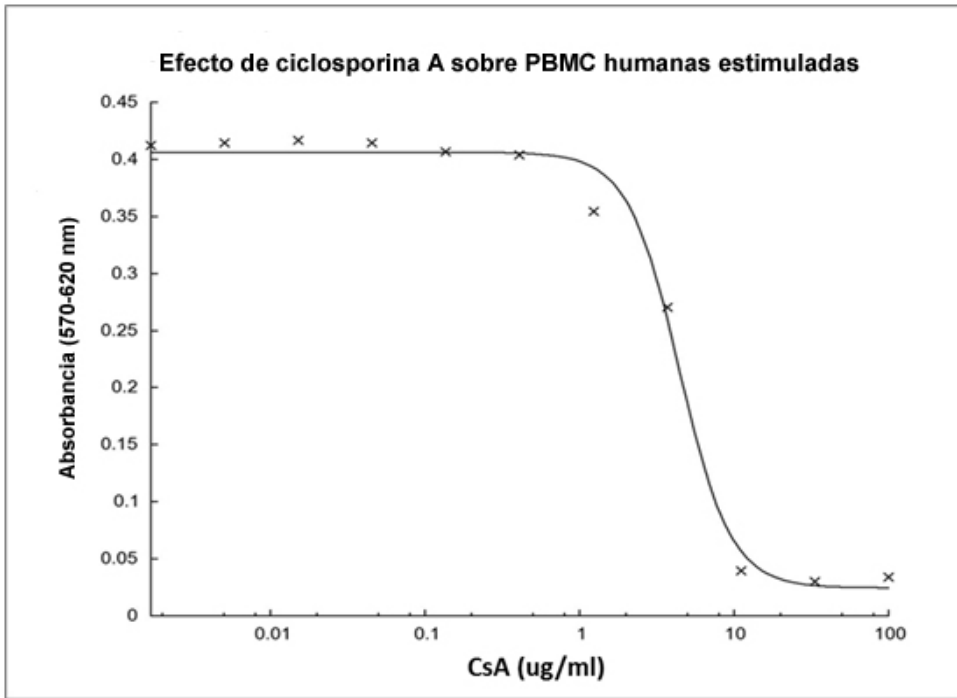


Fig. 11



Mínimo	0,0245971 +/- 0,0133 (54,09%)
Máximo	0,406161 +/- 0,007122 (1,754%)
CI ₅₀	4,44025 +/- 0,3977 (8,956%)
Coef. de Hill	2,606 +/- 0,6276 (24,08%)

Fig. 12

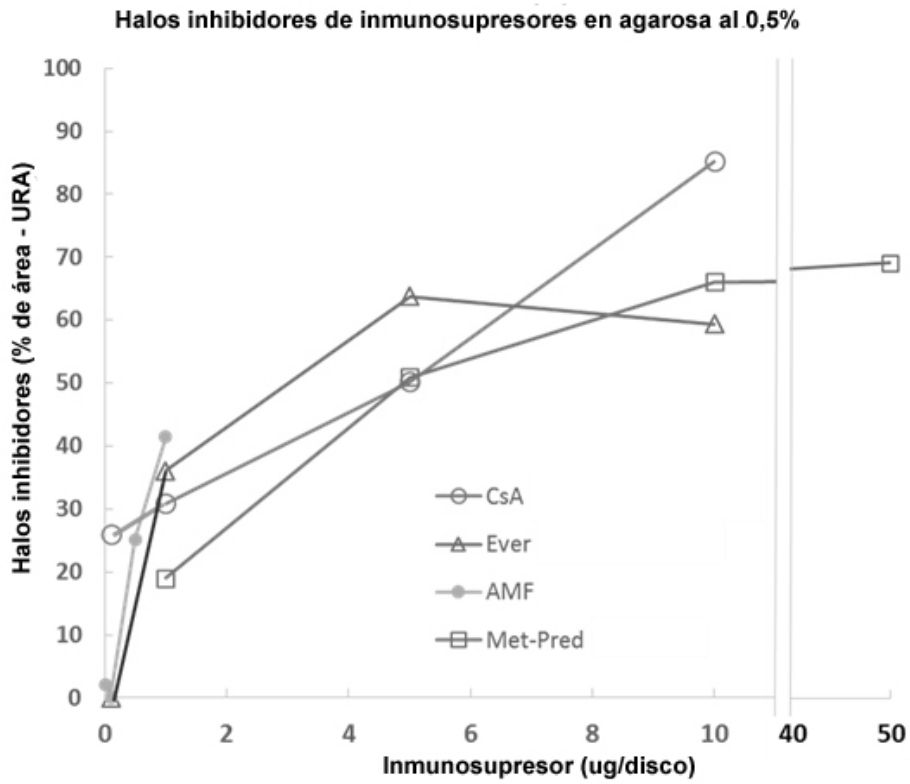


Fig. 13

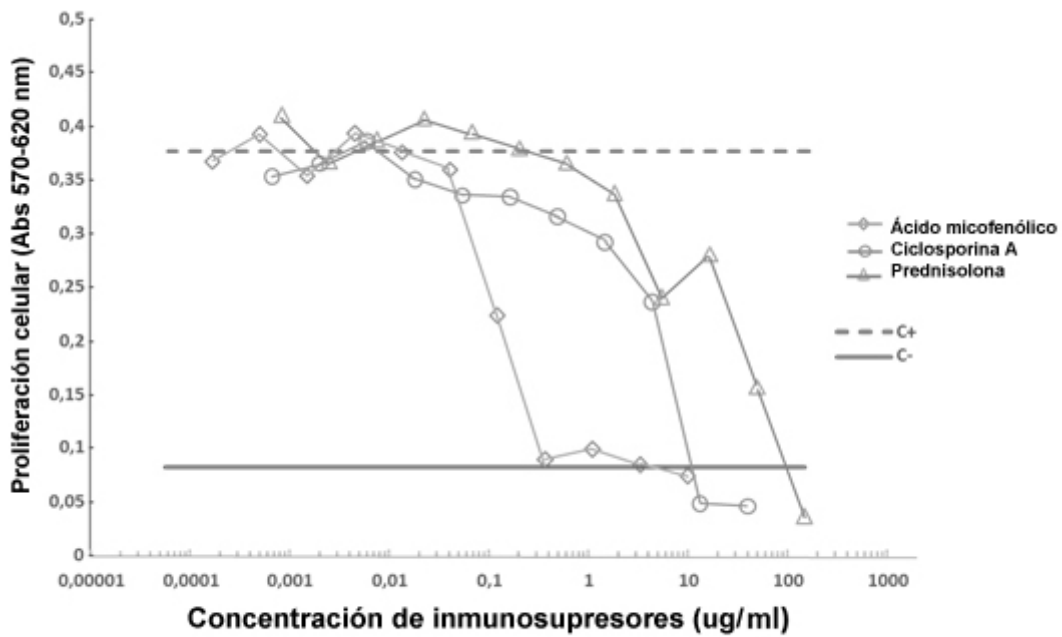


Fig. 14

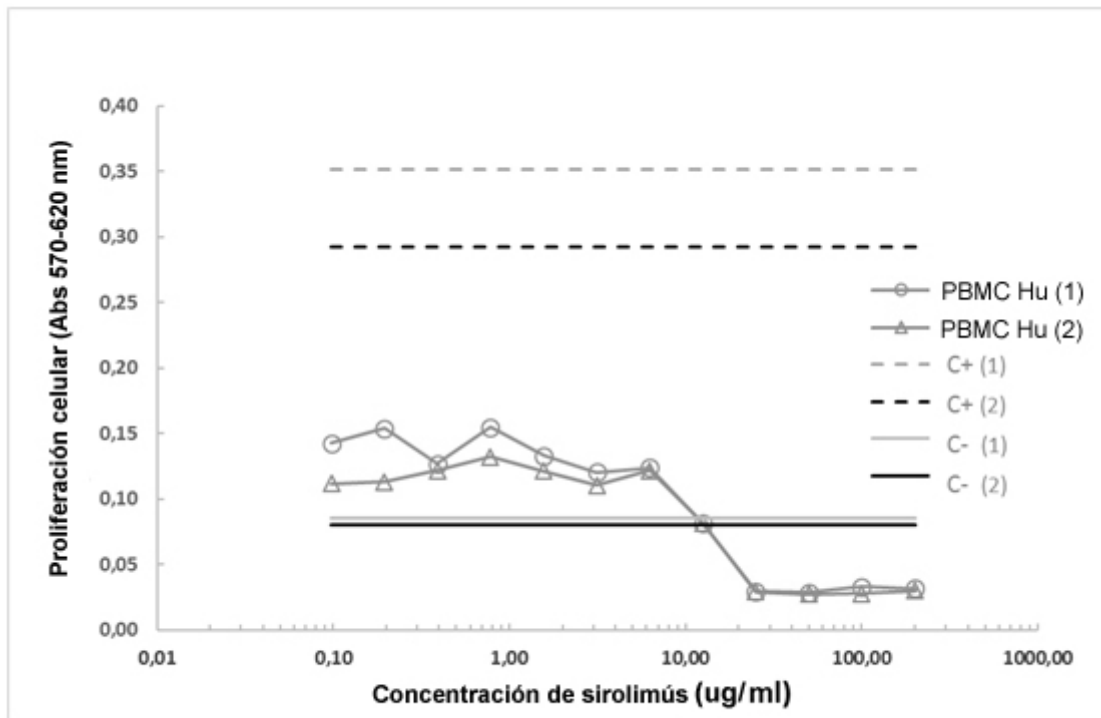


Fig. 15

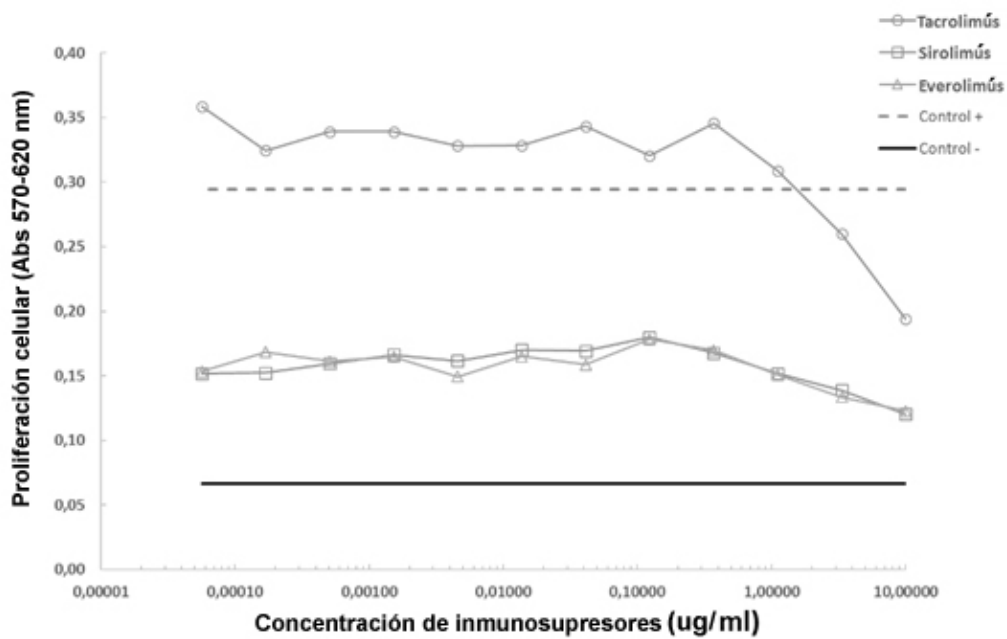
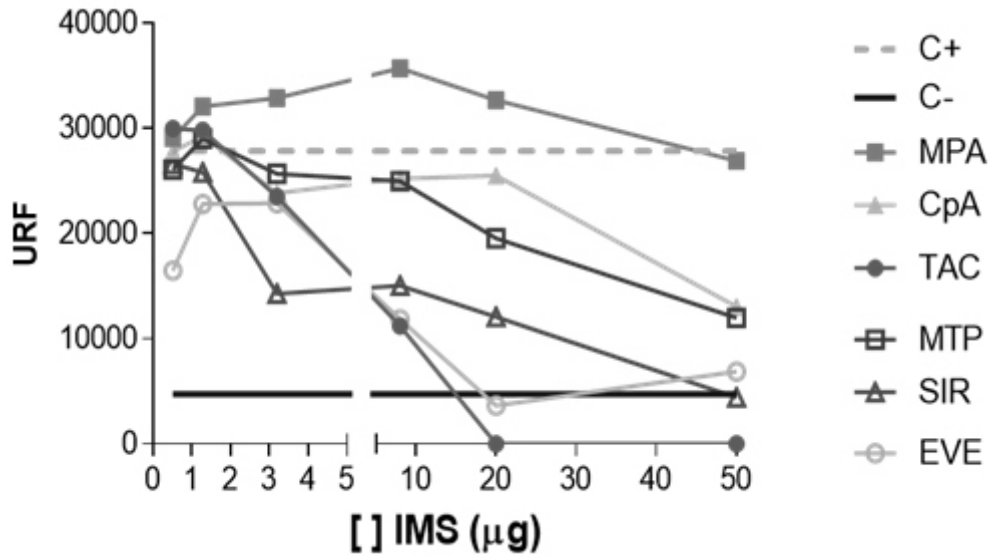


Fig. 16

A



B

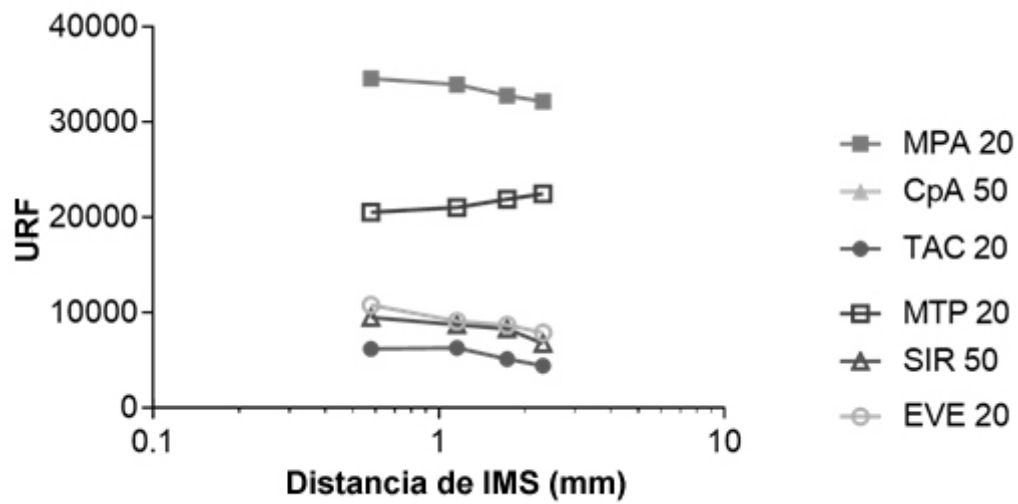


Fig. 17

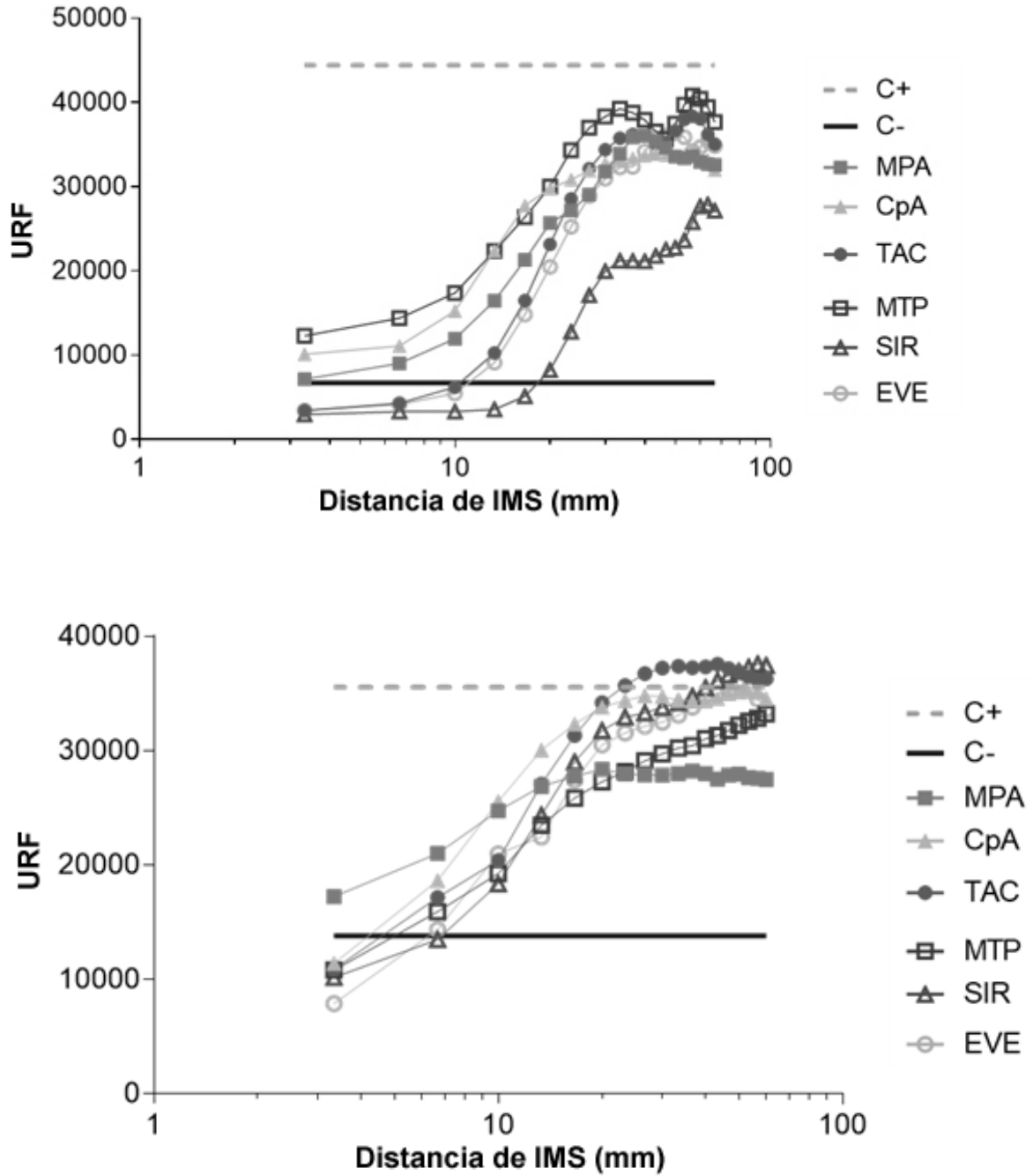


Fig. 18

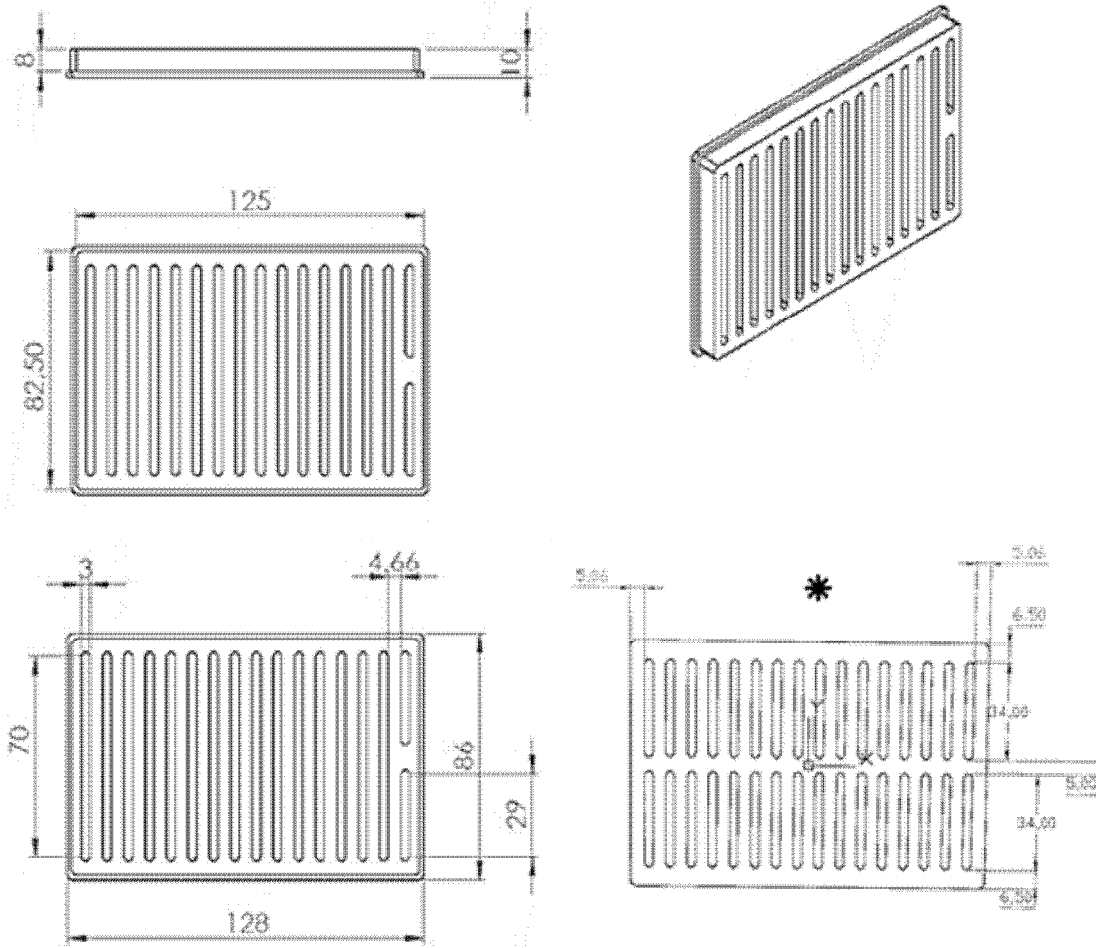


Fig. 19

