

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 052**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/07** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2007 E 07819295 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2084266**

54 Título: **Sistema de cultivo de células, un procedimiento para su producción así como su utilización en la investigación preclínica**

30 Prioridad:

**25.10.2006 DE 102006051283**

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

**22.11.2013**

73 Titular/es:

**EDI (EXPERIMENTELLE & DIAGNOSTISCHE  
IMMUNOLOGIE) GMBH (100.0%)**

**Aspenhastrasse 25  
72770 Reutlingen, DE**

72 Inventor/es:

**SCHMOLZ, MANFRED**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 431 052 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

Sistema de cultivo de células, un procedimiento para su producción así como su utilización en la investigación preclínica

5 El invento se refiere a un sistema de cultivo de células así como a la utilización del sistema de cultivo de células para el ensayo preclínico de sustancias activas.

10 El escrutinio preclínico de sustancias activas o respectivamente el ensayo preclínico de sustancias activas presenta una importancia especial para la validación médica de ciertas sustancias, antes de que éstas sean ensayadas en estudios clínicos con seres humanos después de haber superado con éxito esta fase de ensayo preclínico. Otro punto esencial del ensayo preclínico lo constituye, junto a la comprobación de un efecto médico principal de las sustancias que deben de ser ensayadas, también la estimación de unos posibles efectos secundarios, que podrían resultar en el caso de otra validación de sustancias activas en estudios clínicos.

15 Así, por ejemplo, el reconocimiento precoz de unos indeseados efectos secundarios hace posible conseguir ahorros de costos. Además de ello, el riesgo para los pacientes de ensayos clínicos se puede reducir manifiestamente mediante una investigación preclínica madurada de sustancias activas.

20 Como modelos preclínicos de investigación entran en consideración en particular los animales de ensayo. Los ensayos con animales tienen la ventaja de que las sustancias activas que deben de ser investigadas, pueden ser caracterizadas *in vivo*. No obstante, los reconocimientos obtenidos a partir de éstos son transferibles, solamente en una extensión restringida, también a los seres humanos, debido a las diferencias parcialmente agravantes entre los animales y los seres humanos.

25 En la fase preclínica de ensayo de sustancias activas pasan a emplearse además unos cultivos de células como modelos de investigación. El empleo de cultivos de células ofrece la ventaja de que éstos se pueden llevar a cabo de un modo relativamente sencillo. Además de esto, los cultivos de células permiten unas altas caudales de paso de las muestras y unas condiciones de ensayo muy bien controlables. Además, con respecto a los cultivos de células no existe ningún reparo ético. Es desventajoso el hecho de los cultivos de células, como modelos de investigación *in vitro*, pueden simular sólo insuficientemente los procesos celulares que tienen lugar realmente en tejidos humanos.

35 Un perfeccionamiento interesante de los cultivos de células lo constituyen los denominados cultivos concomitantes. Tales cultivos concomitantes se componen de dos cultivos de células separados en el espacio uno de otro, entre los cuales es posible, sin embargo, un intercambio de sustancias. Uno de los cultivos de células contiene regularmente unas células de determinados tipos de tejidos, mientras que el otro cultivo de células contiene determinadas células sanguíneas, en particular unas células mononucleares de sangre periférica (en inglés "peripheral blood mononuclear cells, PMBC). Para el ensayo preclínico de sustancias activas, los cultivos de células se incuban en presencia de las sustancias activas que deben de ser ensayadas. Los flujos de sustancias que tienen lugar en el cultivo concomitante son investigados y evaluados después de la fase de incubación. Tales cultivos concomitantes son conocidos, por ejemplo, a partir de los artículos "IL-10 producing CD14<sup>low</sup> monocytes inhibit lymphocyte-dependent activation of intestinal epithelial cells by commensal bacteria" [Unos monocitos CD14<sup>low</sup> productores de IL-10 inhiben la activación dependiente de linfocitos de las células epiteliales intestinales por bacterias comensales] (Haller D, Microbiol. Immunol. 2002; 46: 195-205) y "Monocyte/Macrophage Regulation of Vascular Calcification In Vitro" [Regulación por monocitos y macrófagos de la calcificación vascular *in vitro*] (Tintut Y, Circulation 2002, 105: 650-655). En este caso es desventajoso el hecho que, al fin y al cabo, también los cultivos concomitantes pueden reproducir sólo insuficientemente las circunstancias reales en seres humanos o animales, en particular en el sector de los procesos inmunorreguladores. Los reconocimientos obtenidos con ayuda de tales cultivos concomitantes se deben de considerar por lo tanto siempre con un cierto escepticismo en lo que respecta a una valoración o respectivamente a una caracterización fiable de las sustancias activas ensayadas. Por otra parte, los requisitos planteados en cuanto a la calidad de un escrutinio preclínico de sustancias activas son constantemente más exigentes a causa de los posibles riesgos clínicos así como de los costos de desarrollo de los medicamentos, que por lo general se están haciendo cada vez más altos.

55 El invento se plantea, por consiguiente, la misión de poner a disposición un modelo de investigación *in vitro* para el ensayo preclínico de sustancias activas, que, en comparación con los modelos de investigación conocidos a partir del estado de la técnica, haga posible una reproducción mejorada de las complejas circunstancias fisiológicas en un organismo humano y/o animal, y en particular una caracterización más fiable de las sustancias activas en lo que respecta a su investigación clínica.

60 El problema planteado por esta misión se resuelve mediante un sistema de cultivo de células, en particular para el ensayo preclínico de sustancias activas, que comprende unos compartimentos primero y segundo, que están en comunicación entre sí a través de una capa de separación que es permeable para sustancias secretadas (excretadas) celularmente, que está situada entre dichos compartimentos primero y segundo, conteniendo el primer compartimento un cultivo sintópico con células tisulares y células inmunitarias fagocitadoras, y el segundo compartimento un cultivo con células sanguíneas (cultivo de células sanguíneas).

65

Por el concepto de "un cultivo sintópico" dentro del sentido del presente invento se debe de entender un cultivo de células, que tiene en un compartimento por lo menos un tipo de células tisulares y por lo menos un tipo de células del sistema inmunitario.

5 Por el concepto de "sangre entera" dentro del sentido del presente invento se deben de entender todos los componentes de la sangre, inclusive las células sanguíneas y el plasma sanguíneo así como los factores de manera preferida biológicamente activos, que están contenidos en éste, tales como los factores de la coagulación, las proteínas del complemento, etc.

10 Por el concepto de "cebadura" dentro del sentido del presente invento se debe de entender una activación previa (preactivación) de células, que es provocada por ciertas sustancias, en particular por unas sustancias mensajeras.

15 Mediante el invento se ponen a disposición unos sistemas de cultivo de células que, a causa de la toma en consideración de un cultivo sintópico con células tisulares y células inmunitarias fagocitadoras, así como de un cultivo con células sanguíneas, se diferencian manifiestamente en cuanto a su complejidad celular con respecto de los sistemas de cultivo concomitante conocidos hasta ahora. El sistema de cultivo de células conforme al invento puede ser considerado en particular como un cultivo concomitante sintópico. En comparación con los conocidos sistemas de cultivo concomitante, el sistema de cultivo de células conforme al invento hace posible una comunicación esencialmente más compleja y en particular más diferenciada entre las células. Los flujos de sustancias y los mecanismos de regulación que tienen lugar entre las células del sistema de cultivo de células permiten realizar una simulación manifiestamente mejorada de los procesos celulares que tienen lugar realmente en un organismo humano y/o animal. Las sustancias secretadas celularmente pueden reaccionar en particular con unas correspondientes células diana en el sistema de cultivo de células y, por ejemplo, pueden ser consumidas de nuevo.

20 Por consiguiente, con una ventaja especial se pueden evitar unas concentraciones excesivas no naturales en el sistema de cultivo de células conforme al invento. Además, las células dianas modifican su producción propia de sustancias de señal bajo la influencia de las sustancias mensajeras secretadas por las otras células. De esta manera se modifica de un modo muy fisiológico la red reguladora global del sistema de cultivo de células conforme al invento. El sistema de cultivo de células conforme al invento se adecua en medida especial para la validación preclínica de sustancias activas. Para esto, se utilizan convenientemente las células de una especie, que debe de ser tratada en una fase clínica posterior con las sustancias activas que deben de ser ensayadas. El sistema de cultivo de células se incuba en común con las sustancias activas que deben de ser ensayadas. Los flujos de sustancias y/o las modificaciones de sustancias que tienen lugar se determinan de manera preferida después de la fase de incubación y se pueden comparar en particular con los flujos de sustancias y/o las modificaciones de sustancias de un sistema de cultivo de células, que se incuba sin sustancias activas. Los datos y respectivamente las informaciones que se deducen a partir de esto se pueden aprovechar como el fundamento para una caracterización fiable de las sustancias activas investigadas. Así, se pueden realizar en particular unas declaraciones mejoradas en lo que respecta a la actividad medicinal de las sustancias activas así como en lo que respecta a unos posibles riesgos, en particular con vistas a una subsiguiente investigación clínica.

30 En una forma preferida de realización, las células tisulares del primer compartimento son adherentes. De manera preferida, las células tisulares se adhieren a la superficie de la capa de separación. La capa de separación puede ser revestida previamente con unas sustancias adecuadas. En el caso de las sustancias se puede tratar, por ejemplo, de ciertas proteínas, en particular de unas proteínas extracelulares de la matriz. Por ejemplo, la capa de separación puede ser revestida con colágeno, laminina, tenascina, etc.

35 Las células tisulares del primer compartimento son cultivadas previamente de manera conveniente sobre la superficie de la capa de separación. Conforme al invento, se prevé en particular que las células tisulares cubran a la capa de separación por lo menos parcialmente, y de manera preferida, totalmente. Las células tisulares pueden cubrir a la capa de separación en particular en forma estratificada, de manera preferida como una monocapa.

40 En una forma especialmente preferida de realización, en el caso de las células inmunitarias fagocitadoras se trata en particular de monocitos y/o macrófagos. Los monocitos y macrófagos constituyen una central de conmutación inmunorreguladora dentro del sistema inmunitario. Ellas participan en particular en procesos inflamatorios en un cuerpo humano y/o animal. De manera preferida, en el caso del cultivo sintópico del primer compartimento se trata de un cultivo sintópico a base de células tisulares y de células inmunitarias fagocitadoras.

45 Las células inmunitarias se adosan habitualmente a las células tisulares, de manera preferida mediante la formación de unas adhesiones intermoleculares. El adosamiento de las células inmunitarias se efectúa en particular sobre la base de unos receptores localizados junto a la superficie celular. Mediante la toma en consideración de las células inmunitarias en el sistema de cultivo de células conforme al invento, los procesos inflamatorios que tienen lugar en un cuerpo humano y/o animal pueden ser simulados manifiestamente mejor. Los resultados deducidos de esto dentro del marco de un escrutinio preclínico de sustancias activas hacen posible por consiguiente una caracterización más fiable de las sustancias activas ensayadas con ayuda del sistema de cultivo de células conforme al invento.

- 5 En el caso de las células tisulares del invento se trata de manera preferida de unos tipos de células, que se presentan en unos tejidos con una enfermedad inflamatoria, en particular en unos tejidos con una enfermedad inflamatoria crónica. En el caso de los tejidos se puede tratar en particular de ciertos órganos. En el caso de las células tisulares se puede tratar en particular de células de un tipo de tejido. En una forma más amplia de realización, el cultivo sintópico puede contener varios tipos de células tisulares. Esto aumenta particularmente las posibilidades de comunicación y regulación entre las células del sistema de cultivo de células conforme al invento. De esta manera, se pueden simular de un modo especialmente eficaz las circunstancias fisiológicas en un cuerpo humano y/o animal, en particular en el plano celular.
- 10 En una forma preferida de realización, en el caso de las células tisulares se trata de células epiteliales y/o de células similares a las epiteliales. De manera especialmente preferida, en el caso de las células tisulares se trata de células epidérmicas, bronquiales y/o epiteliales intestinales.
- 15 En otra forma de realización, en el caso de las células tisulares se trata de células endoteliales, de manera preferida de células endoteliales vasculares sanguíneas. Por lo demás, se prefiere que en el caso de las células tisulares se trate de células cutáneas, en particular de queratinocitos, fibroblastos y/o de células cutáneas de las articulaciones (los denominados sinoviocitos), y/o de condrocitos. Además, como células tisulares entran en cuestión células neuronales y/o musculares, en particular células musculares lisas.
- 20 De manera preferida, el primer compartimento contiene un cultivo sintópico con células musculares, en particular con células musculares lisas, y con células inmunitarias, siendo aplicadas las células musculares de manera preferida sobre el lado superior de la capa de separación. Sobre el lado inferior de la capa de separación pueden ser aplicadas en particular células endoteliales. De esta manera se pueden simular las circunstancias de los vasos sanguíneos naturales.
- 25 En otra forma más amplia de realización, las células del sistema de cultivo de células conforme al invento, en particular las células del cultivo sintópico (las células tisulares y las células inmunitarias fagocitadoras) proceden de ciertos linajes de células. Los linajes de células son de manera preferida de origen humano.
- 30 En otra forma de realización, las células del sistema de cultivo de células conforme al invento proceden de unas muestras de tejidos y/o de unas muestras de líquidos corporales. En el caso de las muestras se trata en particular de unos materiales aislados primarios, es decir de unas muestras que son extraídas de cuerpos humanos y/o animales. Las muestras de tejidos y/o las muestras de líquidos corporales son de manera preferida de origen humano. En el caso de los líquidos corporales se puede tratar en particular de sangre u orina, de manera preferida de sangre.
- 35 Por ejemplo, las células del cultivo sintópico del primer compartimento pueden proceder de unas muestras de tejidos, al contrario de lo cual las células del segundo compartimento pueden proceder regularmente de unos líquidos corporales, de manera preferida de sangre.
- 40 Conforme al invento, puede estar previsto además que el sistema de cultivo de células contenga tanto unas células procedentes de unos linajes de células como también unas células procedentes de unas muestras de tejidos y/o de unas muestras de líquidos corporales. Convenientemente, los compartimentos del sistema de cultivo de células conforme al invento contienen en cada caso o bien células procedentes de unos linajes de células o células procedentes de unas muestras de tejidos y/o de unas muestras de líquidos corporales.
- 45 En el caso de las células sanguíneas cultivadas del segundo compartimento, se puede tratar de células sanguíneas de un tipo de células sanguíneas. De manera preferida, en el caso de las células sanguíneas se trata de unas células del sistema inmunitario, en particular de unas células de la sangre periférica. Por ejemplo, en el caso de las células sanguíneas se puede tratar de células mononucleares de la sangre periférica (en inglés "periferal blood mononuclear cells", PMBC). Además, las células sanguíneas del segundo compartimento pueden comprender varios tipos de células sanguíneas, en particular linfocitos, monocitos, macrófagos, trombocitos y/o eritrocitos. De manera preferida, en el caso del cultivo del segundo compartimento se trata de un cultivo de la sangre entera (un denominado cultivo de sangre entera). En un cultivo de la sangre entera se cultivan habitualmente todas las células sanguíneas que se presentan en la sangre natural.
- 50 En otra forma más amplia de realización, la sangre entera es de origen humano. De manera preferida, en el caso de la sangre entera se trata de sangre fresca (recientemente extraída). En una forma especialmente preferida de realización, el sistema de cultivo de células conforme al invento contiene exclusivamente células de origen humano. De esta manera, es posible realizar una simulación mejorada de las circunstancias fisiológicas en un cuerpo humano. Las células del sistema de cultivo de células conforme al invento proceden de manera preferida del mismo organismo, en particular del mismo paciente.
- 60 El cultivo de células sanguíneas del segundo compartimento es separado de manera preferida en un material sobrenadante y un sedimento. En el material sobrenadante está contenido habitualmente el plasma sanguíneo. En el sedimento del cultivo de sangre entera están contenidas en particular las células sanguíneas, por ejemplo, los eritrocitos, trombocitos y leucocitos.
- 65

En una forma especialmente preferida de realización, las células tisulares son activadas, de manera preferida modificadas inflamatoriamente. Las células tisulares se presentan en un estado activado en particular como consecuencia de unos activadores presentes en el sistema de cultivo de células, en particular de unos activadores proinflamatorios. Como activadores entran en consideración, por ejemplo, unos antígenos o unas partes de éstos, en particular unos epítomos. En el caso de los activadores se puede tratar también de unos superantígenos. Los activadores pueden ser de origen microbiano, en particular bacteriano. De manera preferida, en el caso de los activadores se trata de unos componentes de paredes celulares bacterianas. En el caso de los activadores se puede tratar en particular de glicanos, de manera preferida de péptido-glicanos, por ejemplo de zimosán. Además, como unos activadores adecuados entran en cuestión ciertos lipopolisacáridos. En el caso de los activadores se puede tratar por lo demás de unas toxinas, por ejemplo de endotoxinas. Mediante la activación de las células tisulares es posible realizar una simulación de procesos inflamatorios *in vivo*. Por ejemplo, mediante la activación de las células tisulares se pueden simular de un modo satisfactorio los procesos celulares en el caso de unas enfermedades que evolucionan de una manera inflamatoria. En los casos de las enfermedades simulables con ayuda del sistema de cultivo de células conforme al invento se puede tratar de una osteoartritis, una artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, una colitis ulcerosa y enfermedades inflamatorias de los pulmones.

De manera preferida, las células tisulares son activadas por sustancias mensajeras, en particular por proteínas y/o péptidos glicosiladas/os, de manera preferida por citocinas. En el caso de las sustancias mensajeras se trata de manera preferida de unos mediadores proinflamatorios, por ejemplo de interferones, interleucinas y/o factores de necrosis tumoral (TNF). Así, las células tisulares pueden ser activadas en particular por lo menos por una sustancia mensajera escogida entre el conjunto formado por el interferón  $\gamma$ , la interleucina-1, la interleucina-6 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Mediante la activación de las células tisulares, se pueden imitar eficazmente los procesos celulares en unos tejidos con enfermedades inflamatorias, en particular en unos órganos con enfermedades inflamatorias.

En una forma más amplia de realización, en el caso de las sustancias secretadas celularmente en el sistema de cultivo de células conforme al invento se trata por lo general de unos denominados indicadores (unos compuestos indicadores) de la actividad celular, en particular de unas sustancias mensajeras. De manera preferida, en el caso de las sustancias secretadas celularmente se trata de unas citocinas. Las sustancias secretadas celularmente se pueden difundir a través de la capa de separación, que es permeable para ellas, en ambos compartimentos del sistema de cultivo de células conforme al invento, y en particular pueden reaccionar con las células allí presentes. La reacción puede basarse, por ejemplo, en unas interacciones de las sustancias secretadas con unos receptores superficiales de las células que están presentes en el respectivo compartimento. Esto reduce no sólo la aparición de unas concentraciones no naturales, en particular de unas concentraciones excesivas no naturales, de ciertas sustancias en el sistema de cultivo de células conforme al invento. Más bien, de esta manera se pueden hacer visibles en general por primera vez de un modo relevante los efectos secundarios de las sustancias a ensayar. Esto es especialmente importante para la investigación de las relaciones entre dosis y efectos de las sustancias activas que deben de ser ensayadas.

En otra forma de realización, en el caso de las sustancias activas se trata de unas sustancias activas naturales y/o sintéticas. Además, en el caso de las sustancias activas se puede tratar de unos metabolitos de sustancias activas. Los metabolitos son producidos, por ejemplo, mediante una digestión celular de las sustancias activas, en particular con ayuda de hepatocitos. Las células utilizadas para la digestión celular, en particular los hepatocitos, pueden ser también una parte componente del sistema de cultivo de células. Además, las sustancias activas se pueden presentar en una adecuada forma de administración, por ejemplo, en común con un vehículo farmacéuticamente compatible. Las sustancias activas pueden ser, por ejemplo, unas partes componentes de cremas y/o pomadas.

La capa de separación permeable para las sustancias secretadas celularmente, que está situada entre los compartimentos primero y segundo, tiene convenientemente unas aberturas, en particular unos poros, con un diámetro comprendido entre 0,1 y 5  $\mu\text{m}$ , en particular entre 0,2 y 0,45  $\mu\text{m}$ . La capa de separación puede ser en particular una parte componente del compartimento primero o segundo. De manera preferida, en el caso de la capa de separación se trata del fondo del compartimento primero o segundo. Por lo demás la capa de separación puede estar estructurada en forma monolítica con el compartimento primero o segundo, en particular con el primer compartimento. Conforme al invento se prefiere especialmente que la capa de separación esté estructurada como una membrana o un diafragma. Los compartimentos del sistema de cultivo de células conforme al invento pueden estar constituidos a base de diferentes materiales. Como materiales preferidos entran en cuestión ciertos materiales sintéticos, en particular un poliestireno o un policarbonato. Los compartimentos del sistema de cultivo de células conforme al invento están estructurados de manera preferida en forma de unos recipientes, en particular como unas escudillas, unas cámaras o unas cavidades o unos pocillos (en inglés "wells"). Además, los compartimentos pueden ser una parte constituyente de un soporte, que tiene de manera preferida varios compartimentos. Así, en el caso del soporte se puede tratar de una placa perforada, en particular de una placa de 6 agujeros, 12 agujeros, 24 agujeros o 96 agujeros. En el caso del soporte se puede tratar además de un sistema de pocillos transversales (en inglés Trans Well System) por lo general comercialmente obtenible para cultivos concomitantes.

En una forma preferida de realización, en el caso del primer compartimento se trata de un compartimento superior y en el caso del segundo compartimento se trata de un compartimento del sistema de cultivo de células.

El presente invento se refiere además a un procedimiento para el ensayo preclínico de sustancias activas mediante utilización de un sistema de cultivo de células con unos compartimentos primero y segundo, que están comunicados entre sí a través de una capa de separación permeable para sustancias secretadas (excretadas) celularmente, que está situada entre los compartimentos primero y segundo, realizándose que el primer compartimento contiene un cultivo sintópico con células tisulares y células inmunitarias fagocitadoras, y el segundo compartimento contiene un cultivo con células sanguíneas (el cultivo de células sanguíneas), cuyo procedimiento comprende las siguientes etapas:

- una adición de sustancias activas al sistema de cultivo de células,
- una incubación del sistema de cultivo de células en presencia de las sustancias activas añadidas,
- una investigación de los indicadores de una actividad celular, que son detectables en el sistema de cultivo de células.

En una forma preferida de realización, las sustancias activas se añaden al cultivo sintópico del primer compartimento. En algunos casos, puede ser deseado investigar la influencia de ciertas sustancias activas sobre ciertos tejidos, cuando las sustancias activas llegan desde la circulación sanguínea al tejido pertinente. En estos casos, conforme al invento se prefiere añadir las sustancias activas al cultivo de células sanguíneas del segundo compartimento. De esta manera se simulan la circulación sanguínea fisiológica por medio del cultivo de células del segundo compartimento y el tejido pertinente por medio del cultivo sintópico del primer compartimento.

En una forma especialmente preferida de realización, se utiliza un cultivo sintópico a base de células tisulares y células inmunitarias fagocitadoras, de manera preferida monocitos y/o macrófagos.

En otra forma de realización, el sistema de cultivo de células, en particular el cultivo sintópico, antes de la incubación, de manera preferida antes de la adición de las sustancias activas, es sometido a una denominada cebadura. En otra forma de realización, la cebadura se puede llevar a cabo también después de la adición de las sustancias activas. Conforme al invento, también es posible someter al cultivo de células sanguíneas del segundo compartimento a una cebadura. Por lo demás, tanto el cultivo sintópico como también el cultivo de células sanguíneas pueden ser sometidos a una cebadura. La cebadura del cultivo sintópico y del cultivo de células sanguíneas se puede llevar a cabo en particular con diferentes sustancias en cada caso. Como sustancias para la cebadura entran en consideración en particular unos mediadores o activadores, en particular unos activadores inflamatorios. En lo que respecta a otras particularidades y características acerca de esto, se hace referencia a la descripción realizada hasta ahora.

El sistema de cultivo de células es incubado en particular durante un período de tiempo de 1 a 72 horas, de manera preferida de 2 a 48 horas. La incubación del sistema de cultivo de células se efectúa convenientemente a una temperatura comprendida entre 20 °C y 40 °C, en particular entre 35 °C y 40 °C, de manera preferida a una temperatura de aproximadamente 37 °C. Eventualmente, durante la incubación del sistema de cultivo de células se pueden añadir otros activadores.

En otra forma de realización del procedimiento conforme al invento, la investigación de los indicadores de una actividad celular, que son detectables en el sistema de cultivo de células, se lleva a cabo mediante ciertos métodos de biología molecular, en particular en el plano de la transcripción y/o traducción, de manera preferida en el plano posterior a la traducción.

En una forma más amplia de realización, para la investigación de los indicadores de una actividad celular, se investiga el medio de cultivo, en particular en forma de un líquido de cultivo, de los compartimentos primero y/o segundo. De manera preferida, se investigan unas sustancias secretadas por las células del sistema de cultivo de células. Para la investigación de las sustancias secretadas celularmente se determinan en particular las concentraciones de éstas. Así, por ejemplo, para la investigación de las sustancias secretadas celularmente pueden pasar a emplearse unos procedimientos de ELISA (acrónimo del inglés "enzyme-linked immunosorbent assay" = ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas) o unos procedimientos de electroforesis. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una electroforesis en gel, en particular una electroforesis bidimensional a través de un gel de poli(acrilamida) (2D PAGE). Además, se pueden utilizar unas tecnologías de matriz, en particular de matrices de perlas multiplexadas (en inglés "multiplex Bead-Arrays"). Fundamentalmente, entran en cuestión todos los ensayos biológicos habituales para un experto en la especialidad.

Por lo demás, se prefiere que para la investigación de los indicadores de una actividad celular se investiguen las células del sistema de cultivo de células. Conforme al invento, es conveniente que las células sean recuperadas para la realización de la investigación, de manera preferida después de la incubación del sistema de cultivo de células.

De manera preferida, para la investigación de los indicadores de una actividad celular se investigan unos parámetros de activación situados en las células. Por ejemplo, se puede medir el flujo de entrada de calcio en las células del sistema de cultivo de células. Además, las células pueden ser investigadas en lo que respecta a sus niveles de AMPc y GAMPc (los niveles de adenosina monofosfato cíclico y de guanidina-adenosina monofosfato cíclico).

Como un preferido parámetro de activación situado en las células sigue entrando en consideración la expresión de unos transductores de señales y/o receptores en y/o sobre las células del sistema de cultivo de células. De manera preferida, se determina la densidad de los transductores de señales y/o de los receptores en y/o sobre las células. Como métodos de investigación adecuados entran en consideración en particular unos análisis de marcadores superficiales, por ejemplo, unas tinciones histológicas o unos métodos de citometría de flujo.

Por lo demás, para la investigación de unos parámetros de activación situados en las células, las células del sistema de cultivo de células pueden ser investigadas en cuanto a una modificación, en particular en cuanto a una activación o inhibición o respectivamente una supresión, de sus genes. Por ejemplo, para el establecimiento del perfil de genes activados se adecuan unos análisis de borrón de transferencia Northern y/o Western. Además, entran en consideración unas tecnologías de matrices planas, en particular unos chips de genes. De manera preferida, los genes se investigan sobre la base de sus productos génicos. De manera preferida, se investiga el ARN (ácido ribonucleico), en particular el ARN mensajero (ARNm), formado por las células del sistema de cultivo de células. El ARN se aísla de manera conveniente a partir de las células y en particular se purifica. El aislamiento del ARN a partir de las células se puede efectuar, por ejemplo, mediante una extracción. Para la investigación ulterior, el ARN formado se somete de manera preferida a una amplificación, en particular a una reacción en cadena de la polimerasa, de manera preferida con una transcriptasa inversa (RT-PCR). La detección propiamente dicha del ARN se lleva a cabo habitualmente con ayuda de una técnica de borrón de transferencia Northern.

En otra forma de realización, para la investigación de los indicadores de una actividad celular se investigan unas proteínas expresadas por las células del sistema de cultivo de células. Así, por ejemplo, se pueden establecer, por ejemplo, unos modelos o respectivamente unos perfiles de expresión de las proteínas. Para la investigación de las proteínas se pueden aprovechar en particular unos métodos de espectroscopía de masas. En el caso de las proteínas se puede tratar en particular de unos transductores de señales y/o receptores. El empleo de unas tecnologías de matriz es asimismo posible. También es posible la caracterización de unas rutas de señales y procesos apópticas/os en el sistema de cultivo de células conforme al invento como puntos finales relevantes. Los procedimientos descritos en los párrafos precedentes son suficientemente conocidos para un experto en la especialidad, de tal manera que aquí se puede prescindir de una explicación más detallada.

En una forma especialmente preferida de realización del procedimiento conforme al invento, los indicadores de una actividad celular son investigados en relación con los indicadores de una actividad celular de un sistema de cultivo de células exento de sustancias activas, es decir de un sistema de cultivo de células, que es incubado sin sustancias activas. Los datos o respectivamente las informaciones obtenidos/as a partir de esto permiten una caracterización más detallada de las sustancias activas investigadas. En lo que respecta a otras particularidades y características se remite a la descripción proporcionada hasta ahora.

En el presente caso se describe un estuche para el ensayo preclínico de sustancias activas, que comprende por lo menos un compartimento, que contiene un cultivo sintópico con células tisulares y células inmunitarias fagocitadoras, en particular monocitos y/o macrófagos. De manera preferida, en el caso del cultivo sintópico se trata de un cultivo sintópico a base de células tisulares y de células inmunitarias fagocitadoras. El estuche puede comprender además un compartimento con un medio de cultivo, siendo adecuado el medio de cultivo de manera preferida para la cultivación de células sanguíneas. El medio de cultivo es en particular un líquido de cultivo, por ejemplo una solución de cultivo. Eventualmente, el estuche puede comprender un instrumental para la extracción de sangre. En lo que respecta a otras particularidades y características del estuche se remite a la descripción proporcionada hasta ahora.

El presente invento se refiere además a la utilización del sistema de cultivo de células para el ensayo preclínico de sustancias activas, en particular para la investigación de las relaciones entre dosis y efectos de las sustancias activas. Conforme al invento, está previsto en particular que se utilicen varios sistemas de cultivo de células, en particular en forma de una tanda paralela, para la validación preclínica de las sustancias activas. De esta manera se pueden ensayar, por ejemplo, varias sustancias activas en paralelo y en particular comparándolas. Asimismo, es posible someter a cada sistema de cultivo de células a una cebadura diferente. Conforme al invento, se puede prever además la investigación de los sistemas de cultivo de células que se han utilizado en una tanda paralela en cuanto a la existencia de diferentes indicadores de una actividad celular. De esta manera, en conjunto se puede generar una cantidad más grande de datos en lo que respecta a las sustancias activas que deben de ser investigadas, con lo cual se puede mejorar adicionalmente la caracterización de las sustancias activas. En lo que respecta a otras particularidades y características, se hace referencia a la descripción proporcionada hasta ahora.

Otras características y particularidades del invento se establecen a partir de las siguientes descripciones de las Figuras. En este caso, las características individuales pueden ser realizadas en cada caso por sí solas o a razón de

varias a la vez en combinación unas con otras. Las Figuras son convertidas en el contenido de la descripción expresamente mediante su referencia.

En las Figuras se reproducen esquemáticamente:

en la Figura 1: un sistema de cultivo de células,

en la Figura 2: la síntesis de una sustancia mensajera o respectivamente de unos mediadores en unos sistemas clásicos de cultivo concomitante de células y en un sistema de cultivo de células conforme al invento,

en la Figura 3: la influencia de diclofenac sobre la síntesis de una sustancia mensajera o respectivamente de unos mediadores en unos sistemas clásicos de cultivo concomitante de células y en un sistema de cultivo de células conforme al invento.

#### Descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra un sistema de cultivo de células 1 conforme al invento, que se compone de un recipiente superior 2 estructurado como un primer compartimento y de un recipiente inferior 3 estructurado como un segundo compartimento. El recipiente superior 2 contiene un cultivo sintópico a base de sinoviocitos 4 y monocitos o respectivamente macrófagos 5. Los sinoviocitos 4 son adherentes y cubren en una forma estratificada el fondo 6, estructurado como capa de separación, del recipiente superior 2. Los monocitos o respectivamente macrófagos 5 están situados sobre los sinoviocitos 4 y están en contacto directo con éstos. Los sinoviocitos 4 y los monocitos o respectivamente macrófagos 5 proceden de linajes de células de origen humano. El fondo 6 del recipiente superior 2 es permeable para sustancias secretadas celularmente. De esta manera es posible realizar un intercambio de sustancias entre el recipiente superior 2 y el recipiente inferior 3. El recipiente inferior 3 contiene un cultivo de sangre entera de origen humano con células sanguíneas 7 y 8. En el caso de las células sanguíneas se trata en particular de monocitos o respectivamente de macrófagos 5, linfocitos 7 y eritrocitos 8. El cultivo de sangre entera es separado en un material sobrenadante y un sedimento. Las células que están presentes en el sistema de cultivo de células 1, así como los flujos de sustancias que tienen lugar entre las células, hacen posible una simulación mejorada de los correspondientes procesos celulares en un organismo humano. Por lo tanto, el sistema de cultivo de células 1 se puede aprovechar de una manera especialmente adecuada para una investigación preclínica de sustancias activas. Los datos o respectivamente las informaciones que se obtienen a partir de esto, en particular en lo que respecta a un efecto principal medicinal, a unos eventuales efectos secundarios así como a una adecuada dosificación de sustancias activas, constituyen un fundamento fiable de valoración para la investigación clínica de las sustancias activas.

La Figura 2 muestra la influencia de diferentes estimulantes sobre la síntesis de sustancias mensajeras o respectivamente de mediadores tanto en el caso de unos clásicos sistemas de cultivo concomitante de células como también en el caso de un sistema de cultivo de células conforme al invento. En el caso de los clásicos sistemas de cultivo concomitante de células se trataba de unos sistemas de cultivo, que en su compartimento superior contenían o bien un cultivo con sinoviocitos ("Syn") o un cultivo con macrófagos ("MPh"), y en su compartimento inferior contenían un cultivo de la sangre entera (cultivo de sangre entera). El sistema de cultivo de células conforme al invento contenía en su compartimento superior un cultivo sintópico a base de sinoviocitos y macrófagos ("Syn + MPh") y en su compartimento inferior un cultivo de la sangre entera (cultivo de sangre entera). Los sistemas de cultivo fueron sometidos a tres diferentes condiciones de estimulación:

- ninguna estimulación ("0")
- una estimulación con un lipopolisacárido ("LPS")
- una estimulación con zimosán ("Zym").

En las ordenadas de las Figuras 2a hasta 2d se reproduce en cada caso la cantidad de la sustancia mensajera sintetizada investigada en picogramos por mililitro [pg/ml]. En las abscisas de las Figuras 2a hasta 2d se exponen las condiciones de estimulación.

Las Figuras 2a hasta 2d muestran que, en dependencia de las condiciones de estimulación, de los puntos finales medidos (la síntesis de MCP-1 en el caso de la Figura 2a, la síntesis de IL-10 en el caso de la Figura 2b, la síntesis de IL-8 en el caso de la Figura 2c y la síntesis de IL-6 en el caso de la Figura 2d) así como de los sistemas de cultivo utilizados, se sintetizaron diferentes cantidades de sustancias mensajeras.

La Figura 3 muestra la influencia de diclofenac (un analgésico no esteroide) sobre la síntesis de las sustancias mensajeras o respectivamente de los mediadores en el caso de unos sistemas clásicos de cultivo y de un sistema de cultivo de células conforme al invento. En lo que respecta a las características de los sistemas clásicos de cultivo concomitante y del sistema de cultivo de células conforme al invento se remite a la descripción de figura acerca de la Figura 2. Como unos puntos finales se midieron las síntesis de MCP-1 y de IL-6. Como condición de estimulación se

escogió una activación de las células por un lipopolisacárido. En las ordenadas de la Figura 3 se reproduce el denominado índice de estimulación. En las abscisas de la Figura 3 se exponen los puntos finales medidos.

5 Los resultados reproducidos en las Figuras 2 y 3 se obtuvieron mediante un análisis multiplexado sobre la base de un denominado ensayo de matriz de perlas con ayuda de la tecnología de Luminex(®). Para esto, se emplearon unas perlas codificadas con colores con unos anticuerpos específicos para la fijación de las sustancias mensajeras. El contenido de sustancias mensajeras se midió con ayuda de un segundo anticuerpo, que había sido marcado por fluorescencia.

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Sistema de cultivo de células, en particular para el ensayo preclínico de sustancias activas, que comprende unos compartimentos primero y segundo, los cuales están comunicados entre sí a través de una capa de separación que es permeable para sustancias secretadas celularmente, que está situada entre los compartimentos primero y segundo, conteniendo el primer compartimento un cultivo sintópico con células tisulares y células inmunitarias fagocitadoras, y el segundo compartimento un cultivo con células sanguíneas.
- 10 2. Sistema de cultivo de células de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que en el caso de las células inmunitarias se trata de monocitos y/o macrófagos.
3. Sistema de cultivo de células de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que en el caso de las células tisulares se trata de unas células, que se presentan en unos tejidos con una enfermedad inflamatoria.
- 15 4. Sistema de cultivo de células de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que en el caso de las células tisulares se trata de unas células, que se escogen entre:
- células epiteliales y/o células similares a las epiteliales,

20 - células bronquiales y/o células epiteliales intestinales,

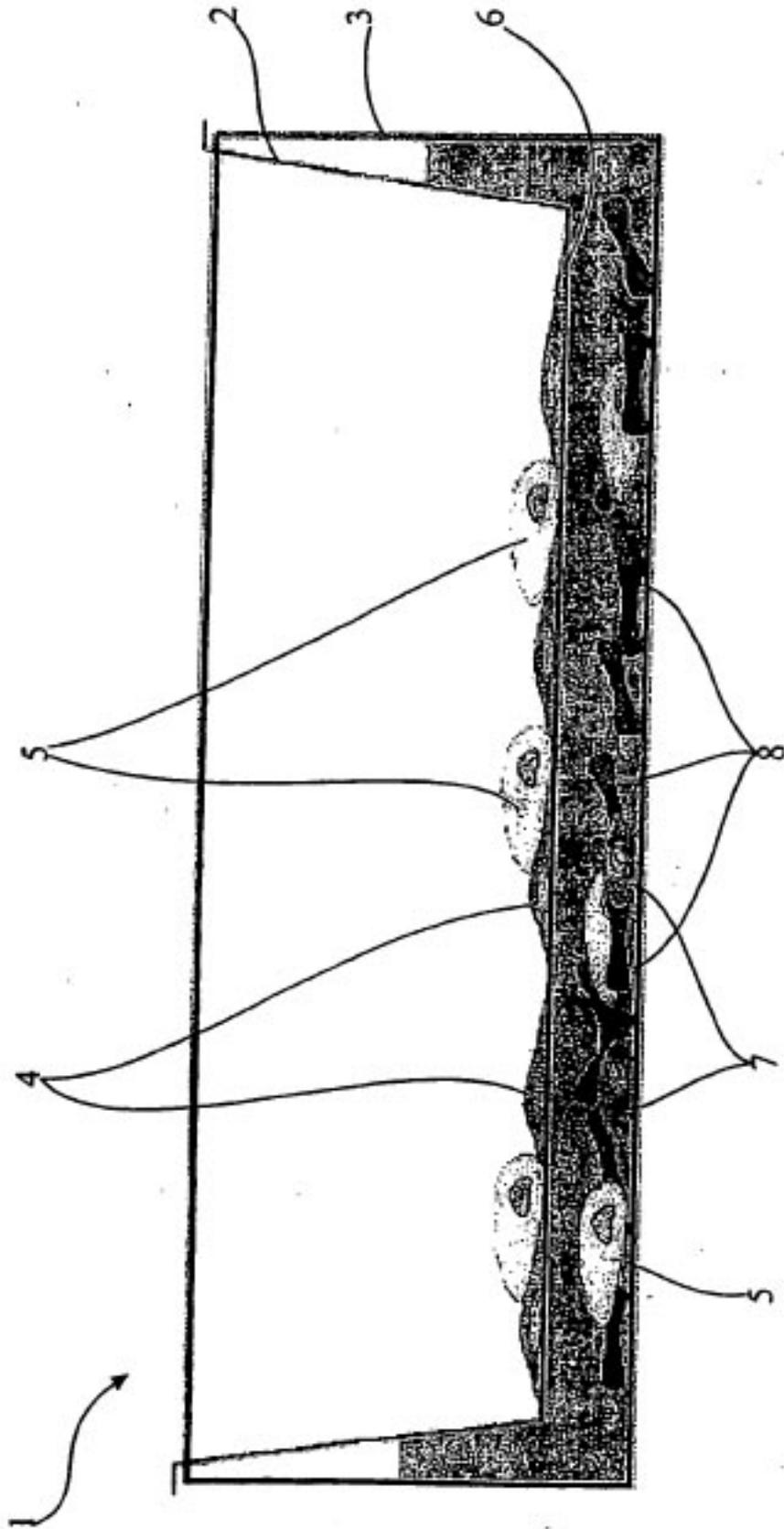
  - células endoteliales, de manera preferida unas células endoteliales de vasos sanguíneos,
  - células cutáneas, en particular células cutáneas de las articulaciones (sinoviocitos), y/o condrocitos.

25
5. Sistema de cultivo de células de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que las células del sistema de cultivo de células proceden de uno/a de los/las siguientes:
- linajes de células, de manera preferida de origen humano,

30 - muestras de tejidos y/o muestras de líquidos corporales.
6. Sistema de cultivo de células de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que en el caso del cultivo del segundo compartimento se trata de un cultivo de la sangre entera (cultivo de sangre entera), en particular de sangre fresca, de manera preferida de origen humano.
- 35 7. Sistema de cultivo de células de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que las células tisulares son activadas, en particular modificadas inflamatoriamente.
- 40 8. Sistema de cultivo de células de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que en el caso de las sustancias secretadas celularmente se trata de unos indicadores de una actividad celular, en particular de unas sustancias mensajeras, de manera preferida de unas citocinas.
- 45 9. Sistema de cultivo de células de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que en el caso de las sustancias activas, que deben de ser ensayadas, se trata de sustancias activas biológicas y/o sintéticas.
- 50 10. Sistema de cultivo de células de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la capa de separación tiene unas aberturas, en particular unos poros, con un diámetro comprendido entre 0,1 y 5  $\mu\text{m}$ , en particular comprendido entre 0,2 y 0,45  $\mu\text{m}$ .
- 55 11. Sistema de cultivo de células de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que los compartimentos del sistema de cultivo de células están estructurados en forma de unos recipientes, en particular como unas escudillas, unas cámaras, unas cavidades o unos pocillos (en inglés "wells").
- 60 12. Procedimiento para el ensayo preclínico de sustancias activas mediante utilización de un sistema de cultivo de células de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes 1 hasta 11, que comprende las etapas de:
- una adición de sustancias activas al sistema de cultivo de células,
  - una incubación del sistema de cultivo de células en presencia de las sustancias activas añadidas,
  - una investigación de los indicadores de una actividad celular, que son detectables en el sistema de cultivo de células.

13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado por que el sistema de cultivo de células, en particular el cultivo sintópico, es sometido a una cebadura antes de la incubación, de manera preferida antes de la adición de las sustancias activas.
- 5 14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado por que para la cebadura del sistema de cultivo de células se utilizan unos mediadores o activadores, en particular unos activadores inflamatorios.
- 10 15. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 hasta 14, caracterizado por que la investigación de los indicadores de una actividad celular se lleva a cabo mediante unos métodos de biología molecular, en particular en el plano de la transcripción y/o traducción, de manera preferida en el plano posterior a la traducción.
- 15 16. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 hasta 15, caracterizado por que para la investigación de los indicadores de una actividad celular de las células se investigan unas sustancias secretadas por las células del sistema de cultivo de células y/o las células del sistema de cultivo de células.
- 20 17. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado por que en el caso de la investigación de las células del sistema de cultivo de células, las células son recuperadas para la realización de la investigación.
- 25 18. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 hasta 17, caracterizado por que para la investigación de los indicadores de una actividad celular, se investigan unos parámetros de activación situados en la célula, en particular la expresión de transductores de señales y/o receptores en y/o sobre las células del sistema de cultivo de células.
- 30 19. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 hasta 18, caracterizado por que los indicadores de una actividad celular son investigados en relación con los indicadores de una actividad celular de un sistema de cultivo de células exento de sustancias activas.
20. Utilización de un sistema de cultivo de células de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 11 para el ensayo preclínico de sustancias activas, en particular para la investigación de las relaciones entre dosis y efectos de las sustancias activas.

Figura 1



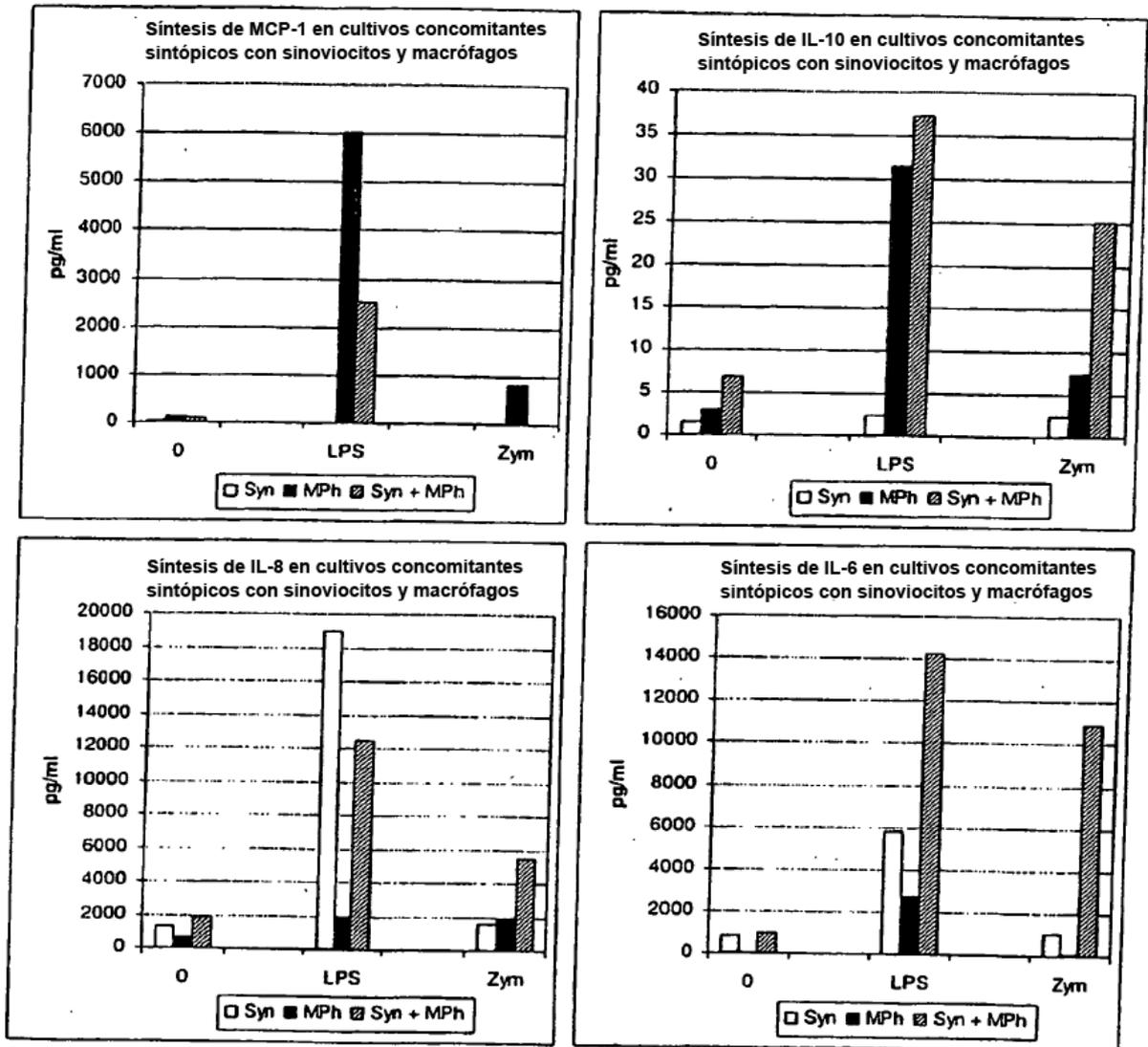


Figura 2: Investigaciones comparativas con sinoviocitos y macrófagos en unos cultivos sintópicos. Se escogieron tres diferentes condiciones de estimulación: ninguna estimulación ("0"), un ligando de TLR ("LPS") y un ligando específico para integrinas ("Zym"). El cultivo se llevó a cabo o bien solamente con sinoviocitos ("Syn"), con macrófagos ("MPh") o sino con ambos ("Syn + MPh"). Según sean la condición de estimulación y el punto final, la combinación de las células muestra diferentes efectos sobre la síntesis de ciertos mediadores.

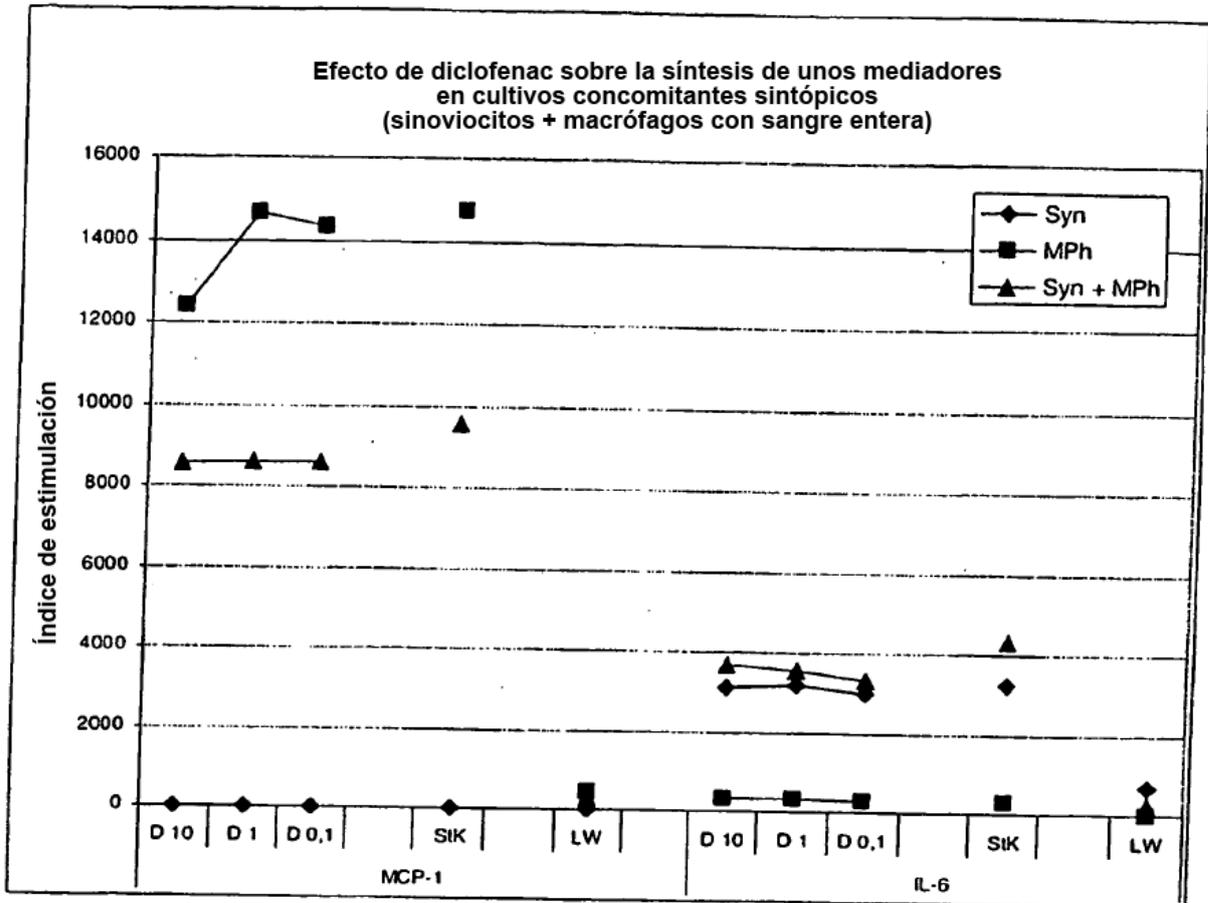


Figura 3: Investigación de diclofenac en diferentes variantes de cultivos concomitantes, que se componen de sangre entera en el compartimento inferior del cultivo, y o bien de sinoviocitos ("Syn") o macrófagos ("MPh") o, como una variante sintópica, de sinoviocitos + macrófagos ("Syn + MPh") en el compartimento superior. Los puntos finales fueron las síntesis de MCP-1 e IL-6 como respuesta a una activación por LPS, que abarca al compartimento tanto superior como también inferior de este cultivo concomitante.