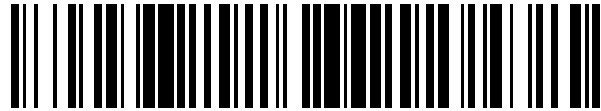


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 896**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2009 E 09792367 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 2353001**

54 Título: **Sistema de cultivo celular para determinar el efecto sensibilizante, alergénico y/o irritante de una sustancia**

30 Prioridad:

10.09.2008 US 95834 P

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

15.07.2014

73 Titular/es:

**RULES-BASED MEDICINE, INC. (100.0%)
3300 Duval Road
Austin, TX 78759, US**

72 Inventor/es:

SCHMOLZ, MANFRED

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 476 896 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 celular para determinar el efecto sensibilizante, alergénico y/o irritante de una sustancia

Antecedentes

5 La alergia es un trastorno del sistema inmunológico que incluye la atopía. Las reacciones alérgicas se producen en respuesta a sustancias ambientales conocidas como alérgenos; estas reacciones son adquiridas, predecibles y rápidas. La alergia se caracteriza por una activación excesiva de ciertos leucocitos, conocidos como células cebadas, y basófilos, por un tipo de anticuerpo, conocido como IgE, que provoca una respuesta inflamatoria extrema. Las reacciones alérgicas comunes incluyen eccema, urticaria, fiebre del heno, asma, alergias alimentarias, y reacciones al veneno de insectos que pican, tales como avispas y abejas.

10 Se conocen diferentes tipos de alérgenos. Los alérgenos inhalados incluyen polvo o aerosoles, por ejemplo, polen o polvo doméstico. Los alérgenos alimentarios son sustancias contenidas en los alimentos a las que el cuerpo reacciona mediante hipersensibilización (reacciones alérgicas). Los alérgenos de productos medicinales comprenden ciertas sustancias activas en productos medicinales, por ejemplo, antibióticos o analgésicos. Un grupo particularmente importante de sustancias alérgicas son los alérgenos por contacto. Estos pueden provocar una
15 reacción alérgica en los afectados a través del contacto con la piel. Ciertos metales y sustancias odoríferas pertenecen a los alérgenos por contacto.

En décadas recientes, en especial en los países occidentales industrializados, se ha observado un aumento repentino en el número de alérgenos. Muchas sustancias alérgicas son ingredientes en cosméticos u otras sustancias de aplicación tópica (composiciones para la aplicación externa local). Los cosméticos o agentes tópicos
20 se ensayan por sus propiedades alérgicas mediante experimentos en animales. Por tanto, los descubrimientos obtenidos solo tienen un valor limitado, porque los animales experimentales no siempre reaccionan a los mismos alérgenos que los seres humanos y viceversa. Esta situación con frecuencia produce resultados falsos positivos y falsos negativos. Además, también existen problemas prácticos y éticos asociados con el ensayo en animales.

25 El documento US 2001/0049115 describe un ensayo *in vitro* para ensayar el efecto inmunomodulador de un material de ensayo, que comprende colocar un soporte microporoso que tiene una monocapa de células epiteliales contenida en él, para que se ponga en contacto con un medio nutriente en un pocillo de cultivo.

En vista del estado de los ensayos para la actividad alergénica, son necesarias nuevas herramientas y métodos eficaces para determinar la actividad alergénica.

Sumario

30 La presente invención se refiere en general a un sistema de cultivo celular para determinar el efecto sensibilizante, alergénico y/o irritante de diversas sustancias.

En una realización, la presente invención se dirige a un sistema de cultivo celular para determinar el efecto sensibilizante, alergénico y/o irritante de sustancias, que comprende: a) un primer compartimento que comprende un modelo de epidermis; y b) un segundo compartimento que comprende un cultivo celular basado en células
35 inmunológicas, en el que el primer y segundo compartimento están separados por una capa intermedia permeable, y en el que un alérgeno o agente irritante introducido en el primer compartimento activa a las células inmunológicas del segundo compartimento. En una realización concreta, las células inmunológicas son células presentadoras de antígenos, por ejemplo, macrófagos y/o células dendríticas. En una realización concreta, las células inmunológicas son linfocitos, en particular linfocitos B y/o linfocitos T. En una realización concreta, las células inmunológicas presentan antígenos de compatibilidad tisular concordantes. En una realización concreta, el cultivo de células
40 inmunológicas está sustancialmente exento de células tisulares. En una realización concreta, las células inmunológicas se derivan de un ser humano. En una realización concreta, las células inmunológicas se aíslan a partir de sangre. En una realización concreta, el modelo de epidermis tiene una estructura en capas. En una realización concreta, el modelo de epidermis tiene múltiples capas, por ejemplo, el modelo de epidermis puede comprender al
45 menos una capa de epidermis seleccionada del grupo que consiste en estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal. En una realización concreta, el modelo de epidermis comprende células epidérmicas vivas, por ejemplo, queratinocitos. En una realización concreta, el modelo de epidermis está sustancialmente exento de células inmunológicas. En una realización concreta, el modelo de epidermis es un modelo de epidermis animal, por ejemplo, un modelo de epidermis humana. En una realización concreta, dicha una o más sustancias comprenden al menos un agente cosmético. En una realización concreta, dicha una o más
50 sustancias comprenden al menos un agente medicinal farmacológicamente activo. En una realización concreta, el segundo compartimento se rellena con un medio acuoso.

En una realización, la presente invención se dirige a un método para utilizar cualquiera de los sistemas de cultivo celular descritos en la presente para estudiar el efecto sensibilizante, alergénico o irritante de una o más sustancias,
55 que comprende poner en contacto el primer compartimento con la sustancia, y detectar una respuesta alérgica en el segundo compartimento.

En una realización, la presente invención se dirige a un método para estudiar el efecto sensibilizante, alergénico y/o irritante de un agente, que comprende: a) poner en contacto la superficie de un modelo de epidermis contenido en un primer compartimento, con el agente; y b) determinar la actividad de un cultivo celular de células inmunológicas contenido en un segundo compartimento, en el que el primer compartimento y el segundo compartimento están separados por una capa intermedia permeable, en el que la presencia de una célula inmunológica activada en el segundo compartimento indica que el agente es un alérgeno o un agente irritante. En una realización concreta, las células inmunológicas se aíslan de la sangre. En una realización concreta, el cultivo celular comprende células presentadoras de antígenos y linfocitos. En una realización concreta, las células presentadoras de antígenos se derivan de monocitos bajo condiciones de diferenciación. En una realización concreta, se determina la actividad de las células inmunológicas estudiando el sobrenadante del cultivo celular. En una realización concreta, se determina la actividad de las células inmunológicas ensayando las sustancias producidas por las células inmunológicas activadas. En una realización concreta, las sustancias producidas por las células inmunológicas activadas se seleccionan del grupo que consiste en transductores de señales, receptores, enzimas y anticuerpos. En una realización concreta, se determina la actividad de las células inmunológicas ensayando las sustancias mensajeras procedentes de los queratinocitos del modelo de epidermis. En una realización concreta, se determina la actividad de las células inmunológicas identificando la proliferación de las células inmunológicas. En una realización concreta, se determina la actividad de las células inmunológicas midiendo los marcadores de superficie de las células inmunológicas. En una realización concreta, se determina la actividad de las células inmunológicas midiendo los componentes de transducción de señales de las células inmunológicas. En una realización concreta, se determina la actividad de las células inmunológicas midiendo las citoquinas intracelulares de las células inmunológicas. En una realización concreta, se determina la actividad de las células inmunológicas analizando los niveles de ARN mensajero dentro de las células inmunológicas.

Descripción detallada

La presente invención se dirige a proporcionar un modelo de investigación extracorporal que es específico para alérgenos. Tal como se emplea en la presente, un "alérgeno" es un antígeno no parasitario capaz de estimular una reacción de hipersensibilidad en individuos. En la presente se describen materiales y métodos que imitan, de forma satisfactoria, la compleja situación fisiológica en un sujeto, por ejemplo, un ser humano, que puede conducir a una alergia, mientras que se evita la desventaja conocida del estado actual de la técnica, pero al mismo tiempo se toman en cuenta los actuales desarrollos en el campo de los ensayos aprobados para cosméticos y agentes tópicos.

En la presente se describe un sistema de cultivo celular útil para investigar el efecto sensibilizante, alergénico y/o irritante de sustancias, que comprende un primer y un segundo compartimento, de modo que se permite la comunicación entre el primer y el segundo compartimento. El primer compartimento contiene un modelo de epidermis, y el segundo compartimento contiene células inmunológicas. La comunicación entre los dos compartimentos es posible separando los compartimentos con una capa intermedia permeable. Tal como se emplea en la presente, la "comunicación" se refiere a la comunicación molecular entre células de los dos compartimentos, por ejemplo, a través del paso de mensajeros o moléculas de señalización, por ejemplo, quimioquinas, citoquinas o sustancias sensibilizantes, alérgicas y/o irritantes, entre los dos compartimentos. En una realización, el primer compartimento contiene solo el modelo de epidermis, y el segundo compartimento contiene solo el cultivo celular a base de las células inmunológicas.

La invención proporciona un sistema de cultivo celular que es principalmente adecuado para investigar los irritantes y alérgenos por contacto. Para este fin, el modelo de epidermis del primer compartimento es particularmente ventajoso como estructura de modelo para la piel natural. En esta situación, el modelo de epidermis con la capa intermedia permeable proporciona un modelo para evaluar la actividad de los alérgenos por contacto. Si se introduce una sustancia en el primer compartimento que comprende el modelo de epidermis, y la sustancia es un alérgeno, entonces la sustancia, o señales activadas por esa sustancia, serán enviadas hacia el segundo compartimento para activar a las células inmunológicas. Tal como se emplea en la presente, "activar" significa cualquiera de una serie de alteraciones en el estado de la célula de modo que imita a una célula inmunológica activada *in vivo* (por ejemplo, la expansión de la población de células inmunológicas, la producción y/o la liberación de señales moleculares específicas, el cambio en el contenido de receptores de la superficie celular, el cambio en los patrones de expresión génica, y otros cambios mensurables conocidos por los expertos en la técnica).

La activación de las células inmunológicas puede determinarse evaluando, por ejemplo, la proliferación de células inmunológicas y la producción y excreción de sustancias mensajeras e inmunoglobulinas, en especial la inmunoglobulina E (IgE). Cuando las células inmunológicas del sistema de cultivo celular se han puesto en contacto con las sustancias que se van a estudiar, su presencia en el segundo compartimento, suponiendo que tienen naturaleza alérgica, provoca que la reacción inmunológica descrita anteriormente se haga más intensa. Estos procesos pueden registrarse y evaluarse para identificar un alérgeno o un grado de alergenidad.

En el sistema de cultivo celular, la proximidad del modelo de epidermis a las células inmunológicas es un reflejo de la configuración natural de la piel y el sistema inmunológico. En el sistema de cultivo celular, las células inmunológicas del segundo compartimento están separadas del modelo de epidermis en el primer compartimento por la capa intermedia. Esta disposición puede evitar reacciones inadvertidas entre el modelo de epidermis y las células inmunológicas que, de otra forma, podrían interferir con el estudio de las sustancias. Por tanto, el modelo de

epidermis celular y las células inmunológicas pueden tener orígenes diferentes y, en particular, pueden originarse a partir de diferentes donantes.

- 5 En una realización, las células inmunológicas son células presentadoras de antígenos (APC), por ejemplo, macrófagos y/o células dendríticas. Las APC son útiles porque están implicadas en la presentación de alérgenos a otras células del sistema inmunológico. La presentación de alérgenos provoca la activación de linfocitos específicos de alérgeno. Una activación de este tipo se manifiesta, en particular, como una proliferación de células y por la producción y excreción de sustancias mensajeras e inmunoglobulinas, en especial IgE. Los linfocitos T específicos de alérgeno, junto con la IgE, contribuyen a la identificación inicial o, si resulta apropiado, a la reidentificación, de sustancias alérgicas.
- 10 Las células inmunológicas del segundo compartimento pueden ser células precursoras de APC. Los monocitos, por ejemplo, pueden considerarse células precursoras adecuadas, si se deja que se diferencien bajo condiciones específicas en APC. Los expertos en la técnica que estén familiarizados con el cultivo de monocitos sabrán que las células precursoras pueden hacerse madurar en células útiles en el sistema de cultivo celular. Para lograr la diferenciación, por ejemplo, las células precursoras pueden incubarse en presencia de diversas citoquinas conocidas por inducir específicamente la diferenciación. Las células precursoras pueden incubarse, por ejemplo, para producir macrófagos en presencia de M-CSF o G-CSF. Con el fin de lograr la diferenciación en células dendríticas, las células precursoras pueden incubarse en presencia, entre otros, de GM-CSF e IL-4, u otros. La diferenciación puede llevarse a cabo, por ejemplo, a lo largo de un periodo de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 días, a lo largo de un periodo de aproximadamente 7 a 18 días, o a lo largo de un periodo de aproximadamente 10 a 14 días.
- 15 Las células inmunológicas del segundo compartimento pueden ser linfocitos, por ejemplo, linfocitos B y/o linfocitos T. Tanto los linfocitos B como los linfocitos T son importantes para la identificación inicial y para la reidentificación de sustancias alérgicas. En una realización, el cultivo celular del segundo compartimento comprende APC, linfocitos B y linfocitos T.
- 20 Las células inmunológicas pueden mostrar, por ejemplo, antígenos de compatibilidad de tejido concordantes (antígenos del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC)). Esto permite evitar respuestas de rechazo entre las células inmunológicas. Las respuestas de rechazo de este tipo, por lo demás, dificultarían la investigación de las respuestas sensibilizantes, alérgicas y/o irritantes que puedan estar produciéndose. Además, una correcta presentación de antígenos solo se produce si los antígenos MHC de las APC y de los linfocitos B y T que se van sensibilizar son de hecho idénticos, por ejemplo, derivados del mismo donante.
- 25 El cultivo celular del segundo compartimento puede comprender células de tejidos. Las células de tejidos adecuadas son, por ejemplo, queratinocitos y/o fibroblastos. Las células de tejidos también pueden ser aislados primarios. Como alternativa, el cultivo celular del segundo compartimento puede estar sustancialmente exento de células de tejidos.
- 30 Las células inmunológicas pueden derivarse, por ejemplo, de un donante, en particular de uno y el mismo donante. En una realización concreta, las células inmunológicas se aíslan de la sangre, principalmente de la sangre de un paciente. Las células inmunológicas pueden aislarse de la sangre de personas sanas o de personas que tienen disposición a las alergias.
- 35 En una realización concreta, el sistema de cultivo celular implica solo a células de origen humano. Esto hace posible simular la situación *in vivo* del organismo humano de una manera particularmente eficaz. De esta forma, es posible aumentar aún más la validez de los resultados obtenidos con la ayuda del sistema de cultivo celular con respecto a un efecto sensibilizante, alérgico y/o irritante sobre los seres humanos. Las células del sistema de cultivo celular, en particular las células del modelo de epidermis y/o las células inmunológicas, pueden propagarse como líneas celulares.
- 40 En una realización, las células inmunológicas se aíslan a partir de la sangre de un sujeto. En particular, las células inmunológicas pueden aislarse con la ayuda de herramientas y métodos conocidos en la técnica, en particular con la ayuda de técnicas de centrifugación. Una técnica de centrifugación que puede considerarse, por ejemplo, es la centrifugación de densidad. Sin embargo, también pueden emplearse otras técnicas de centrifugación. Como alternativa, las células inmunológicas pueden aislarse mediante métodos de clasificación adecuados, por ejemplo, esferas magnéticas y/o métodos de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS).
- 45 El modelo de epidermis celular puede comprender células epidérmicas individuales, por ejemplo, queratinocitos. El modelo de epidermis presenta una estructura en capas, por ejemplo, de múltiples capas. En particular, el modelo de epidermis puede presentar una estructura de múltiples capas diferenciadas. En otra versión, el modelo de epidermis presenta al menos una capa de epidermis del grupo del estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal. El modelo de epidermis incluye principalmente células epidérmicas vivas, en particular queratinocitos vivos. El modelo de epidermis puede consistir en una superficie córnea, con las capas de queratinocitos epidérmicos por debajo de esta. En una realización concreta, el modelo de epidermis está sustancialmente exento de células inmunológicas. El modelo de epidermis puede ser de origen animal, preferiblemente de origen humano.
- 50
- 55

Además de evaluar el efecto de sustancias sobre la activación de las células inmunológicas, ciertas sustancias con el potencial pertinente pueden activar otras reacciones, en particular en los queratinocitos del modelo de epidermis, que mejoren significativamente la detección de las reacciones de incompatibilidad.

5 Tal como se emplea en la presente, un efecto "sensibilizante" de una sustancia se refiere a la activación de un acontecimiento de sensibilización. La "sensibilización" en la presente se refiere a las reacciones inmunológicas que surgen en un organismo concreto tras el contacto inicial con la sustancia, en particular con un alérgeno. Principalmente, esto supone inicialmente la activación de unos pocos linfocitos B y linfocitos T, que después se multiplican mucho (respuesta primaria oligoclonal). Al final de este proceso de activación, la mayoría de los linfocitos son eliminados por el sistema inmunológico. Sin embargo, se forman células de memoria específicas de alérgeno que continúan existiendo a lo largo de periodos largos de tiempo en un número significativamente mayor que las células específicas de alérgeno originales.

15 Una alergia que surge como resultado de la sensibilización es una reacción de defensa excesiva del sistema inmunológico contra un alérgeno específico, que puede producirse después de un contacto repetido con el alérgeno pertinente. Por contraste con la sensibilización primaria, la reacción inmunológica secundaria excesiva está provocada por muchas células de memoria de linfocitos B y linfocitos T con receptores del antígeno concordantes (respuesta secundaria oligoclonal). Esto significa que esta reacción es reforzada con cada contacto renovado con el alérgeno.

20 Por contraste, surge un efecto irritante por el daño a las células del tejido activado por un irritante. En una primera fase de la irritación, las propias células del tejido liberan sustancias mensajeras, por ejemplo, el factor activador de linfocitos interleuquina-1 alfa (IL-1 α) y el péptido activador de neutrófilos derivado de linfocitos, también conocido como la quimioquina interleuquina-8 (IL-8). Las sustancias mensajeras liberadas atraen a las células del sistema inmunológico y las activan. Si el efecto irritante del irritante continúa y se hace más potente, las células del tejido mueren. Esto, a su vez, provoca la liberación de constituyentes intracelulares (en el sentido de un proceso necrótico). Esto potencia la activación secundaria de las células del sistema inmunológico. Los efectos que acompañan a la irritación son principalmente no específicos de antígeno. Principalmente, están implicados macrófagos y granulocitos.

25 La sustancia que se va a estudiar, es decir, el potencial agente alérgico o irritante, puede ser, por ejemplo, un extracto vegetal y/o aceite, cosméticos y/o sus constituyentes, o productos dermatológicos farmacológicamente activos (tópicos), en particular productos medicinales que se van a aplicar por vía tópica a la piel y/u otros constituyentes.

30 En otra versión, el primer compartimento se diseña como el compartimento superior, y el segundo compartimento como compartimento inferior del sistema de cultivo celular. El sistema de cultivo celular, por ejemplo, puede diseñarse según los sistemas disponibles en el mercado Transwell®. Al menos el segundo compartimento puede contener un medio acuoso.

35 En una realización concreta, la invención se dirige a un proceso para estudiar el efecto sensibilizante, alérgico y/o irritante de sustancias, en especial cuando se emplea el sistema de cultivo celular descrito en la presente. Este método puede comprender las etapas de a) la adición de la sustancia que se va a estudiar a la superficie de un modelo de epidermis que está en comunicación con un cultivo celular a base de células inmunológicas a través de una capa intermedia permeable, y b) el estudio del cultivo celular para detectar una respuesta sensibilizante, alérgica y/o irritante.

40 El sobrenadante del cultivo celular puede estudiarse, por ejemplo, para determinar el estado de actividad de las células inmunológicas. Las sustancias formadas por las células inmunológicas, por ejemplo, sustancias mensajeras, transductores de señales (moléculas de transducción de señales o componentes de transducción de señales), receptores, enzimas y/o anticuerpos, por ejemplo, pueden estudiarse en el sobrenadante del cultivo celular (medio de cultivo celular) o como componentes intracelulares. Las sustancias mensajeras (por ejemplo, mediadores) pueden ser, por ejemplo, citoquinas y/o quimioquinas. La concentración de las sustancias mensajeras se determina principalmente en el sobrenadante del cultivo y/o en las células. La densidad de los transductores de señales y/o receptores se determina, por ejemplo, sobre y/o en las células inmunológicas. Las sustancias mensajeras pueden ser, por ejemplo, interferón- γ (IFN γ), IL-4 y/o eotaxina. Los receptores adecuados pueden ser, por ejemplo, receptores de la superficie. Los receptores son receptores de la superficie de los linfocitos, por ejemplo, CD25, CD69, CD152 y CD154. Algunos ejemplos de transductores de señales son el factor nuclear kappa beta (NF κ B), la proteína asociada a zeta (ZAP-70), y el factor nuclear de células T activadas (NFAT). Las enzimas potencialmente adecuadas pueden ser, por ejemplo, fosfolipasas, ciclooxigenasas, proteína quinasas, poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP), metaloproteinasas de matriz (MMP), triptasas, caspasas, dipeptidil peptidasas, quinasas y/o otras enzimas importantes para la generación de señales. Los anticuerpos son principalmente IgE o IgG4.

55 Pueden evaluarse las características que indican la activación celular por células epidérmicas localizadas en el modelo de epidermis, en particular queratinocitos. Los métodos de investigación adecuados incluyen, por ejemplo, procesos electroforéticos, reacción en cadena de polimerasa (PCR), cromatografía líquida de alta presión (HPLC), tecnologías de matrices, métodos radiométricos, técnicas de tinción histológica, métodos de citometría de flujo y/o

diversos métodos de transferencias diferentes. Los métodos electroforéticos incluyen, por ejemplo, electroforesis en gel, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (PAGE-2D). También puede utilizarse un análisis de la transferencia Western como método de detección. También es posible combinar métodos electroforéticos con métodos de transferencia. Las tecnologías de matrices incluyen, por ejemplo, el chip Immuno Solid-phase Allergen Chip (ISAC).

Los anticuerpos formados por las células inmunológicas pueden detectarse mediante inmunoensayos apropiados. Los ejemplos de inmunoensayos incluyen, por ejemplo, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el ensayo radioalergoadsorbente (RAST).

Las sustancias segregadas por las células inmunológicas también pueden detectarse para determinar el estado de activación de las células inmunológicas. Las sustancias segregadas pueden ser, por ejemplo, proteínas y/o péptidos. Las proteínas pueden ser, por ejemplo, receptores y/o proteínas con actividad enzimática. Las sustancias segregadas pueden ser, por ejemplo, proteínas y/o péptidos glicosilados. Las sustancias segregadas pueden ser, por ejemplo, sustancias mensajeras. Las sustancias mensajeras pueden ser compuestos de bajo o alto peso molecular. Las sustancias mensajeras pueden ser, por ejemplo, compuestos de radicales de oxígeno, compuestos lipídicos, aminas biogénicas, citoquinas, factores del crecimiento y/o quimioquinas, receptores solubles, o incluso vesículas de membranas (por ejemplo, exosomas).

La detección de los compuestos segregados puede realizarse determinando la concentración de las sustancias segregadas en el sobrenadante del cultivo celular. Las técnicas para detectar las sustancias segregadas son conocidas por los expertos en la técnica. Las sustancias segregadas pueden detectarse a nivel transcripcional, a nivel traduccional y/o a nivel postraduccional. Las sustancias excretadas pueden estudiarse con ayuda de las tecnologías de matrices, en especial con la ayuda, por ejemplo, de matrices de esferas múltiplex o matrices planares.

La determinación del estado de activación de las células inmunológicas puede lograrse, por ejemplo, detectando la proliferación de las células inmunológicas, en particular linfocitos. Un primer contacto o un contacto repetido con un alérgeno estimula, particularmente, a los linfocitos B y los linfocitos T para que proliferen.

El sistema de cultivo celular descrito en la presente evalúa la gravedad de la alergenidad mostrada por un alérgeno potencial. Los métodos descritos en la presente para identificar alérgenos pueden ser cuantitativos. Los datos recogidos de diversos antígenos/alérgenos pueden compilarse, por ejemplo, para determinar una escala de referencia de alergenidad. La gravedad de una respuesta alérgica se determina mediante un modelo de respuesta alérgica, determinándose la gravedad midiendo los factores descritos en la presente, por ejemplo, expansión celular, detección de factores de liberación, etc. La comparación de la reacción alérgica producida por un alérgeno potencial con la escala alérgica de referencia, por ejemplo, permite a los expertos en la técnica determinar el grado de alergenidad provocado por el alérgeno potencial.

En último término, la presente invención se refiere al uso del sistema de cultivo celular según la invención para estudiar el efecto sensibilizante, alérgico y/o irritante de sustancias. Existe un beneficio especial que hace que el sistema de cultivo celular sea adecuado para discriminar entre una alergia activada por las sustancias estudiadas y la irritación. De igual forma, el sistema de cultivo celular según la invención es adecuado para realizar estudios paralelos utilizando múltiples sistemas de cultivo celular.

Ejemplo

Para preparar queratinocitos recién aislados, un material de la piel obtenido por medios quirúrgicos se somete a un proceso de digestión enzimática. Los queratinocitos, por ejemplo, obtenidos de esta manera después se trasladan a placas con un fondo de membrana (por ejemplo, Millipore Millicells®) que actúan como compartimentos. Estos recipientes de cultivo contienen un medio de cultivo apropiado que contiene suero de ternera fetal, penicilina, estreptomycin, aminoácidos no esenciales y factores del crecimiento para cultivar queratinocitos. El medio de cultivo se refresca de modo regular durante el cultivo de las células hasta que se haya producido una diferenciación tridimensional suficiente en una epidermis equivalente. La epidermis diferenciada incluye múltiples capas de células, en particular capas de células en proliferación, en no proliferación y córneas.

Para la preparación de las células inmunológicas, se obtienen leucocitos, por ejemplo, a partir de la sangre periférica de un sujeto. Las células se enriquecen mediante un gradiente de Ficoll. Los leucocitos después se propagan en placas de múltiples pocillos, que actúan como compartimentos. Cada placa de múltiples pocillos contiene un medio de proliferación adecuado que presenta los aditivos necesarios, tales como, por ejemplo, plasma o suero, vitaminas y/u otros componentes esenciales, tales como, por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos y antibióticos (por ejemplo, penicilina, estreptomycin, etc.).

Los compartimentos con los cultivos de epidermis diferenciada se introducen en los compartimentos con los cultivos de leucocitos, formando un sistema de cultivo celular. El sistema de cultivo celular es un cocultivo con dos poblaciones de células diferentes (por ejemplo, células epidérmicas y leucocitos), por lo cual el compartimento con el cultivo de epidermis representa el compartimento superior, y el compartimento con los leucocitos el compartimento inferior. Se aplica una sustancia (por ejemplo, un irritante o agente potencialmente alérgico) que se va a estudiar a

la superficie del cultivo de epidermis del compartimento superior. El cocultivo después se incuba durante un tiempo específico. Para determinar el potencial sensibilizante se mide la proliferación de linfocitos, la síntesis de mediadores de los linfocitos y/o los parámetros de la activación de células de los leucocitos en el compartimento inferior. Además, el compartimento superior puede estudiarse para determinar parámetros para una irritación.

5 Otras realizaciones

Otras realizaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Debe entenderse que la anterior descripción detallada se proporciona solo como aclaración y simplemente es un ejemplo.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para estudiar el efecto sensibilizante, alergénico y/o irritante de un agente, que comprende:
- a) poner en contacto la superficie de un modelo de epidermis contenido en un primer compartimento, con el agente; y
- 5 b) determinar la actividad de un cultivo celular de células inmunológicas contenido en un segundo compartimento, en el que el primer compartimento y el segundo compartimento están separados por una capa intermedia permeable, en el que la presencia de una célula inmunológica activada en el segundo compartimento indica que el agente es un alérgeno o un agente irritante, y
- 10 en el que la actividad de las células inmunológica se determina realizando una o más de las siguientes etapas: identificar la proliferación de las células inmunológicas; medir los marcadores de superficie de las células inmunológicas; medir los componentes de transducción de señales de las células inmunológicas; medir las citoquinas intracelulares de las células inmunológicas; y analizar los niveles de ARN mensajero dentro de las células inmunológicas.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en el que las células inmunológicas se aíslan a partir de sangre.
- 15 3.- El método de la reivindicación 1, en el que el cultivo celular comprende células presentadoras de antígenos y linfocitos.
- 4.- El método de la reivindicación 3, en el que las células presentadoras de antígenos proceden de monocitos bajo condiciones de diferenciación.
- 20 5.- El método de la reivindicación 1, en el que la actividad de las células inmunológicas se determina estudiando el sobrenadante del cultivo celular.
- 6.- El método de la reivindicación 1, en el que la actividad de las células inmunológicas se determina ensayando para detectar sustancias producidas por las células inmunológicas activadas.
- 7.- El método de la reivindicación 6, en el que las sustancias producidas por las células inmunológicas activadas se seleccionan del grupo que consiste en transductores de señales, receptores, mensajeros, enzimas y anticuerpos.
- 25 8.- El método de la reivindicación 1, en el que la actividad de las células inmunológicas se determina ensayando para detectar sustancias mensajeras procedentes de los queratinocitos del modelo de epidermis.