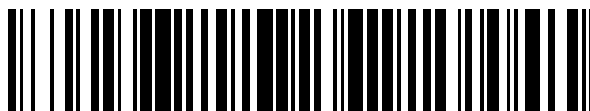


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 588**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2006** **E 11003878 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014** **EP 2360479**

54 Título: **Ensayo de activación de monocitos perfeccionado capaz de detectar contaminantes pirogénicos no endotoxínicos en productos médicos**

30 Prioridad:

22.12.2005 US 752970 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2014

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (33.3%)

One Baxter Parkway

Deerfield, IL 60015, US;

BAXTER HEALTHCARE SA (33.3%) y

THE SECRETARY OF STATE FOR HEALTH

(33.3%)

72 Inventor/es:

POOLE, STEPHEN y

PATEL, MEHUL

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 477 588 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

Ensayo de activación de monocitos perfeccionado capaz de detectar contaminantes pirogénicos no endotoxínicos en productos médicos.

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 En general, la presente invención se refiere a un ensayo de activación de monocitos perfeccionado capaz de detectar pirógenos no endotoxínicos en productos médicos, donde se incuba una muestra con un reactivo que contiene monocitos en un sistema de ensayo que incluye al menos una superficie que comprende polipropileno. La invención también se refiere a sistemas de ensayo para su uso en estas pruebas, que incluyen al menos un pocillo de microtitulación con al menos una superficie interior que comprende polipropileno y que presenta una forma tal que el reactivo que contiene monocitos se concentra en el pocillo para proporcionar un mayor contacto entre célula y célula. La invención también se refiere a un kit de diagnóstico útil para analizar la presencia de pirógenos no endotoxínicos en una muestra. La invención se presenta en las reivindicaciones.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 Cuando determinados compuestos químicos o biológicos entran en contacto con el sistema circulatorio de humanos u otros mamíferos, pueden provocar una respuesta sistémica conocida como respuesta inflamatoria o inflamación. La respuesta inflamatoria es un mecanismo de defensa para proteger el cuerpo contra infecciones y/o lesiones; la inflamación aumenta el flujo sanguíneo en el lugar de la infección o lesión, aportando fluidos necesarios, proteínas y glóbulos blancos (leucocitos) para favorecer el proceso de curación. Por ejemplo, un síntoma asociado a la respuesta inflamatoria es un aumento de la temperatura corporal o fiebre, que actúa como un mecanismo de defensa para los patógenos que provoca un sobrecalentamiento. La respuesta inflamatoria se puede asociar a diversos síntomas "similares a los de la gripe", incluyendo fiebre, escalofríos, fatiga, dolores de cabeza, pérdida de apetito y rigidez muscular. Los compuestos químicos o biológicos que provocan fiebre se denominan históricamente como "pirógenos" o compuestos "pirogénicos", en referencia a la respuesta febril que pueden provocar estos compuestos. No obstante, algunos compuestos químicos o biológicos son generalmente proinflamatorios y pueden provocar o no fiebre como parte de la respuesta inflamatoria causada por los mismos.

- 25 En algunos casos, dependiendo de la sensibilidad del individuo y del tipo y concentración del pirógeno al que éste está expuesto, después de quedar expuesto a un pirógeno el individuo puede desarrollar síntomas de tipo colapso con peligro para la vida. Los productos médicos que pueden ser inhalados, inyectados o administrados por infusión y los dispositivos médicos tales como membranas o materiales implantados presentan un riesgo particular de pirogenicidad. Incluso los nutrientes pueden presentar riesgo de pirogenicidad. Los pirógenos contenidos en productos médicos y nutrientes se denominan pirógenos *exógenos*; en cambio, los pirógenos *endógenos* son compuestos mensajeros del sistema inmunológico que inducen una respuesta inflamatoria del individuo a pirógenos *exógenos*. Además de la naturaleza pirogénica de un producto en sí o de productos secundarios de su producción, con frecuencia una contaminación del producto puede provocar pirogenicidad. La pirogenicidad debida a la contaminación de un producto puede estar causada por uno cualquiera de un grupo de pirógenos diversos derivados de bacterias, virus, hongos o incluso del huésped. Este problema puede persistir incluso si el producto se "esteriliza" térmicamente o por métodos químicos. Un compuesto pirogénico comúnmente encontrado, la endotoxina bacteriana (que consiste principalmente en un lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de bacterias Gram negativas), puede permanecer después de la destrucción de las bacterias. Por consiguiente, para garantizar la seguridad de diversas sustancias farmacéuticas, nutrientes y productos médicos de administración parenteral, es necesario analizar la presencia de pirógenos en estos productos.

- 30 Normalmente, los compuestos que actúan como pirógenos lo hacen estimulando la producción de pirógenos endógenos, como prostaglandinas y citoquinas proinflamatorias, en monocitos, después de un contacto con tejido, células o fluidos corporales. Son estos pirógenos producidos de forma endógena los que influyen en la respuesta inflamatoria en el organismo afectado. Los más importantes y conocidos de estos pirógenos endógenos son las citoquinas interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8) y factor de necrosis tumoral (TNF) y el mediador de lípido de bajo peso molecular prostaglandina E2 (PGE₂). Estos compuestos se ensayan rutinariamente mediante ELISA o ensayos inmunoadsorción enzimática (en el caso de la IL-1, la IL-6 o el TNF) y mediante EIA o inmunoensayo enzimático (en el caso de la PGE₂).

- 45 Con el fin de evitar una reacción pirogénica y garantizar la seguridad de cualquier fármaco o producto farmacéutico administrado vía parenteral es necesario controlar la contaminación pirogénica para identificar lotes individuales contaminados con contaminantes bacterianos. Actualmente se utilizan rutinariamente dos métodos farmacológicos basados en animales, el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), también denominado ensayo de endotoxinas bacterianas (BET), y el ensayo de pirógenos en conejos, para controlar la contaminación por pirógenos en productos farmacéuticos fabricados a granel.

El ensayo en conejos es un ensayo *in vivo* que consiste en inyectar el compuesto de muestra a una cantidad estadísticamente significativa de conejos y observar el aumento medio de la temperatura corporal provocado en los animales de ensayo. Aunque el ensayo en conejos responde a un amplio espectro de agentes pirógenos, incluyendo pirógenos no endotoxínicos, dicho ensayo presenta una sensibilidad relativamente baja (ng endotoxina/ml) en comparación con otros ensayos de pirógenos (pg endotoxina/ml en el caso del ensayo LAL). Además, la correlación de las respuestas pirogénicas a los compuestos entre especies es aproximada en el mejor de los casos. Por ejemplo, se ha documentado que la dosis de endotoxina bacteriana que provoca una respuesta pirogénica varía hasta en un factor 10.000 entre especies. La sensibilidad relativamente baja, los malos resultados cuantitativos, la variabilidad entre especies de conejos y los aspectos éticos que implican los ensayos con animales han provocado la desaprobación del ensayo en conejos en los últimos años.

A diferencia del ensayo en conejos, que detecta una amplia gama de pirógenos, el ensayo LAL solo detecta pirógenos endotoxínicos. La endotoxina bacteriana, por ejemplo lipopolisacárido (LPS), que procede de la pared celular de bacterias Gram negativas, es uno de los compuestos pirogénicos mejor descritos (Moltz y col., Neurosci. Biobehav. Rev., 1993, 17, 237-269; Tilders y col., Psychoneuroendocrinology, 1994, 19, 209-232; Rothwell, Crit. Rev. Neurobiol., 1994, 8, 1-10; Zeisberger y Roth, Neuropsychobiology, 1993, 28, 106-109). Por ello, generalmente se ha considerado útil sustituir los experimentos con conejos, que son costosos y requieren mucho tiempo, por un ensayo LAL directo para la endotoxina bacteriana. Este método tiene limitaciones obvias. El ensayo LAL es un ensayo *in vitro* muy sensible; sin embargo, sólo detecta endotoxinas de bacterias Gram negativas y da falsos resultados negativos con determinados productos que pueden estimular monocitos para producir citoquinas pirogénicas. El ensayo LAL es también susceptible de interferencia, por ejemplo por altos niveles proteínicos de sustancias de ensayo o por glucanos (Roslansky y Novitsky, J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 2477; Fennrich y col., Dev. Biol. Stand., 1999, 101, 131). Por otro lado, el ensayo de Limulus es tan sensible que es muy propenso a dar falsos resultados positivos debido a impurezas que no son importantes para la calidad del producto (Fujiwara y col., Yakugaku Zasshi, 1990, 110, 332-340).

Por consiguiente, existe la necesidad de un sistema de ensayo no basado en animales que se caracterice por una alta sensibilidad, una alta especificidad y capacidad para detectar una amplia gama de pirógenos. Con este propósito y con un mejor entendimiento de la respuesta inflamatoria humana se han desarrollado sistemas de ensayo basados en la activación *in vitro* de monocitos humanos. Hace unos 20 años, algunos investigadores utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para detectar endotoxina mediante el control de la liberación de citoquinas pirogénicas (Dinarello y col., J. Clin. Microbiol., 1984, 20, 323; Duff y Atkins, J. Immunol. Methods, 1982, 52, 323). Desde entonces se han desarrollado varios sistemas de ensayo diferentes utilizando diferentes fuentes de monocitos humanos, incluyendo sangre total (WB) periférica humana, PBMC o líneas celulares monocíticas, como MONOMAC-6 (MM6) (Ziegler-Heitbrock y col., Int. J. Cancer, 1988, 41, 456) o THP-1 (Tsuchiya y col., Int. J. Cancer, 1980, 26, 171), y diversas lecturas, incluyendo las citoquinas pirogénicas factor de necrosis tumoral alfa TNF- α , IL-6, IL-1 β y el metabolito no pirogénico neopterinina (Hartung y col., The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 43, 2001, 29, 99; Poole y Gaines Das, Eur J Parenteral Sciences, 2001, 6, 63; Poole y col., J. Immunol. Methods, 2003, 274, 209; Gaines Das y col., J Immunol Methods, 2004, 288, 165). Recientemente, en un estudio europeo colectivo, el Estudio Humano, se han evaluado seis de los ensayos de activación de monocitos más destacados, utilizando cada uno de ellos una combinación diferente de las fuentes celulares y lecturas arriba descritas, en cuanto a la capacidad para detectar endotoxina en productos médicos sembrados con diversas concentraciones de endotoxina pura.

En cinco de los seis ensayos, las células se cultivaron en placas de poliestireno de 96 pocillos con pocillos de fondo plano (Hoffmann y col., J. Immunol. Methods, 2005, 298, 161). En los seis ensayos (basados en Fennrich y col., Dev. Biol. Stand., 1999; Fennrich y col., ALTEX, 1999; Hartung y col., 2001) se utilizaron tubos de centrifugación Eppendorf (1,2 ml) de poliestireno con fondos cónicos, para la mayor parte de la evaluación y, una vez iniciado el estudio, Charles River Laboratories, el fabricante del kit Endosafe® In vitro Pyrogen Test (IPT) utilizado en este estudio, sustituyó los tubos de polietileno por tubos de polipropileno (1,5 ml) de fondo redondo. No se notificó que esta sustitución tuviera ningún efecto significativo en el ensayo, siendo sustituidos los propios tubos de polipropileno después por placas de 96 pocillos de poliestireno de fondo plano cuando Charles River Laboratories modificó el Endosafe® IPT para volúmenes reducidos. En este ensayo, la fuente de monocitos era sangre total y la lectura consistía en IL-1 β . La sangre total se incubó con diversos fármacos que presentaban diferentes concentraciones de endotoxinas.

Carlin y Viitanen describen un ensayo de activación de monocitos basado en sangre total o células MONOMAC-6 como fuente de monocitos e IL-6 como lectura, para evaluar la pirogenicidad inherente de la vacuna Infanrix, que contiene antígenos Gram positivos y Gram negativos, incluyendo diversos pirógenos no endotoxínicos, esto es toxoide *Diphtheria*, toxoide *Pertussis* y toxoide *Tetanus* (Pharmeuropa, 2003, 15, 3, 418-423). Las células se cultivaron a baja densidad celular en tubos de calidad Eppendorf Bio-Pure libres de endotoxinas de composición no identificada. La pirogenicidad de la vacuna no era resultado de una contaminación de la vacuna durante su producción o almacenamiento. Hartung y Wendel describen un ensayo de activación de monocitos basado en sangre total como fuente de monocitos e IL-1 β como lectura preferente para detectar pirógenos endotoxínicos y no

endotoxínicos en sus formas puras, es decir LPS de *Salmonella abortus equi*, estreptolisina O (SLO) de *Streptococcus pyrogens*, y muramil dipéptido (MDP) (Hartung y Wendel, *In Vitro Toxicology*, 1996, 9, 4, 353-359; Patente US N° 5.891.728). Las células se cultivaron en tubos de polipropileno.

5 Yamamoto y col. describen un ensayo de activación de monocitos basado en sangre total o células de diferentes líneas celulares humanas, siendo preferente la línea celular 28SC, como fuente de monocitos/células monocíticas e IL-6 como lectura preferente, para detectar pirógenos endotoxínicos (*Jpn. J. Infect. Dis.*, 2003, 56, 93-100). Dicho documento indica que el ensayo de endotoxina predice la posibilidad de un sinergismo *in vivo* entre la endotoxina y un fármaco parenteral, en particular interferón, de modo que el fármaco aumenta los efectos pirogénicos de la endotoxina. Las células se cultivaron con endotoxina en su forma pura o con una mezcla de endotoxina en su forma pura e interferón humano. Las células de la línea celular se cultivaron en placas de 96 pocillos de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las células sanguíneas se cultivaron en tubos de material no especificado.

10 Nakagawa y col. describen un ensayo de activación de monocitos basado en sangre total o células MM6-CA8 (un subclón de MONOMAC-6) como fuente de monocitos e IL-6 como lectura preferente, para detectar pirógenos endotoxínicos y no endotoxínicos en sus formas puras, es decir, LPS de *E. coli* O55:B5 y peptidoglicano (PG) insoluble derivado de *S. aureus* (*Clinical and Diagnostic Laboratory Immunol.*, 2002, 9, 3, 588-597). Las células MM6-CA8 se cultivaron en placas de 96 pocillos de poliestireno. Las células sanguíneas se cultivaron en tubos de polipropileno; los volúmenes utilizados (225 µl de sangre, 25 µl de solución de ensayo, 750 µl de solución salina) impidieron el uso de placas de 96 pocillos estándar (250 µl/pocillo).

15 Últimamente, diversas fuentes indican que en los ensayos de pirógenos se debe evitar el polipropileno. Por ejemplo, Charles River Laboratories recomienda evitar el polipropileno porque la naturaleza hidrófoba de la superficie de polipropileno podría conducir a la adsorción de endotoxina sobre una superficie de este tipo debido a los dominios hidrófobos asociados al componente lipídico A de LPS (Charles River Laboratories, *Endosafe Times*, Sept. 2004). Harlan Sera-Lab, un fabricante de ensayos de bioseguridad, señala que los tubos de polipropileno pueden interferir con el ensayo LAL (Harlan Sera-Lab, Catálogo de 2004). Además, la European Dialysis and Transplant Nurses Association y la European Renal Care Association recomiendan evitar el polipropileno y utilizar poliestireno en ensayos de endotoxina, ya que el poliestireno normalmente no adsorbe endotoxina (directrices EDTNA/ERCA).

Por consiguiente, existe la necesidad de un ensayo de pirógenos no basado en animales caracterizado por una alta sensibilidad, una alta especificidad y capacidad de detectar una amplia gama de contaminantes pirogénicos en productos médicos.

30 SUMARIO DE LA INVENCION

Los solicitantes han desarrollado un ensayo de pirógenos *in vitro* que es sensible y detecta contaminantes pirogénicos presentes en productos médicos. En general, la presente invención se refiere a un método para detectar pirógenos no endotoxínicos en una muestra mediante la combinación de monocitos, es decir, en forma de un reactivo que contiene monocitos, y la muestra a analizar, en un primer sistema de ensayo que incluye al menos una superficie que comprende polipropileno, de modo que los monocitos están en contacto con dicha superficie. Los monocitos y la muestra se incuban de modo que los monocitos producen una citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria durante la incubación. El contenido del primer sistema de ensayo se transfiere a un segundo sistema de ensayo que incluye al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citoquina o un mediador endógeno o marcador de la respuesta inflamatoria. En el segundo sistema de ensayo se analiza la presencia de citoquina o mediador endógeno unido al anticuerpo sobre la superficie. Cuando los monocitos utilizados en este método son PBMC o células de líneas celulares monocíticas, los monocitos están presentes en los sistemas de ensayo en una alta densidad celular. Los ensayos son tal como se expone en las reivindicaciones.

La presente invención también se refiere en general a un método para detectar pirógenos no endotoxínicos en un producto médico administrado vía parenteral mediante la combinación de sangre total, como reactivo que contiene monocitos, y el producto médico a ensayar, en un primer sistema de ensayo que incluye al menos una superficie que comprende polipropileno, de modo que la sangre está en contacto con dicha superficie. La sangre y el producto médico se incuban de modo que la sangre produce la citoquina IL-6 durante la incubación. El contenido del primer sistema de ensayo se transfiere a un segundo sistema de ensayo que incluye al menos una superficie tratada con un anticuerpo para IL-6. El segundo sistema de ensayo se analiza en cuanto a la presencia de IL-6 unida al anticuerpo sobre la superficie.

Se proporciona un método de cultivo de monocitos, es decir, en forma de un reactivo que contiene monocitos, a utilizar en un ensayo de pirógenos no consistentes en endotoxina mediante la combinación de los monocitos y una muestra a analizar en un sistema de ensayo que incluye al menos una superficie que comprende polipropileno de modo que los monocitos están en contacto con dicha superficie.

55 Se proporciona un método para cultivar monocitos como parte de un ensayo de pirógenos no consistentes en endotoxina mediante la combinación de los monocitos y una muestra en un sistema de ensayo que incluye al menos

una placa de microtitulación configurada de modo que el reactivo que contiene monocitos está concentrado en comparación con un pocillo de microtitulación de fondo plano, comprendiendo una superficie del pocillo polipropileno, de modo que los monocitos están en contacto con dicha superficie. Cuando los monocitos utilizados en estos métodos de cultivo son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o células de líneas celulares monocíticas, los monocitos se presentan en los sistemas de ensayo en una alta densidad celular.

La invención también se refiere a un método para detectar pirógenos no endotoxínicos en un producto médico administrado vía parenteral mediante la combinación de sangre total, como reactivo que contiene monocitos, y el producto médico a probar en un sistema de ensayo que incluye al menos una superficie que comprende polipropileno y al menos una superficie tratada con un anticuerpo para IL-6, de modo que la sangre está en contacto con la superficie que comprende polipropileno, y el análisis del sistema de ensayo en cuanto a la presencia de IL-6 unida al anticuerpo sobre la superficie.

La invención también proporciona un kit de diagnóstico que contiene una placa de microtitulación que comprende múltiples pocillos de microtitulación configurados de modo que el medio de cultivo contenido en cada pocillo está concentrado en comparación con un pocillo de microtitulación de fondo plano, comprendiendo una superficie de cada pocillo polipropileno, y monocitos criopreservados, es decir, en forma de reactivo que contiene monocitos criopreservados, contenidos en los pocillos de la placa de microtitulación, de modo que los monocitos están en contacto con las superficies de los pocillos. Cuando los monocitos del kit son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o células de líneas celulares monocíticas, los monocitos están presentes en los pocillos en una alta densidad celular. El kit es tal como se expone en las reivindicaciones.

La invención también proporciona un kit de diagnóstico que contiene un sistema de ensayo para detectar pirógenos no endotoxínicos en un producto médico administrado vía parenteral, comprendiendo el sistema de ensayo una placa de microtitulación que incluye múltiples pocillos de microtitulación configurados de modo que el medio de cultivo contenido en cada pocillo está concentrado en comparación con un pocillo de microtitulación de fondo plano, comprendiendo una superficie de cada pocillo polipropileno, sangre total criopreservada, como reactivo que contiene monocitos criopreservados, contenidos en los pocillos de la placa de microtitulación de modo que los monocitos están en contacto con las superficies de los pocillos, y un anticuerpo para IL-6. El kit es tal como se expone en las reivindicaciones.

Otros objetos y características de esta invención en parte se evidencian y en parte se indican más abajo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: gráfico que muestra la respuesta de IL-6 de muestras de ensayo a cuatro densidades celulares diferentes (1 millón, 0,5 millones, 0,25 millones y 0,13 millones de PBMC por pocillo de 250 μ l) en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con células mononucleares de sangre periférica en placas de polipropileno con pocillos de fondo redondo, con IL-6 como lectura. Las respuestas de IL-6 son con respecto al control positivo de patrón de endotoxina (1 unidad de endotoxina por ml) de Extraneal® (es decir, un lote de este producto contaminado con pirógeno no consistente en endotoxina).

Figura 2: gráfico que ilustra la respuesta de IL-6 de muestras de ensayo con baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con sangre total sobre placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas de IL-6 son con respecto a LPS, control negativo de Extraneal® (es decir, un lote limpio de este producto), control positivo de Extraneal®, control negativo de hemoglobina (Hb) (es decir, un lote limpio de este producto), y control positivo de hemoglobina (Hb) (es decir, un lote de este producto contaminado con pirógeno no consistente en endotoxina).

Figura 3: gráfico que ilustra la respuesta de IL-6 de muestras de ensayo con baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con células mononucleares de sangre periférica sobre placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas de IL-6 son con respecto a LPS, controles positivo y negativo de Extraneal® y controles positivo y negativo de Hb.

Figura 4: gráfico que ilustra la respuesta de IL-6 de muestras de ensayo con baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con células MONOMAC6 sobre placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas de IL-6 son con respecto a LPS, controles positivo y negativo de Extraneal® y controles positivo y negativo de Hb.

Figura 5: gráfico que representa la respuesta de IL-6 de muestras de ensayo con baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con células THP-1 sobre placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas de IL-6 son con respecto a LPS, controles positivo y negativo de Extraneal® y controles positivo y negativo de Hb.

Figura 6: gráfico que ilustra las respuestas de TNF- α de muestras de ensayo con baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con células THP-12A9 sobre placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas de TNF- α son con respecto a LPS, controles positivo y negativo de Extraneal® y controles positivo y negativo de Hb.

- Figura 7: gráfico que ilustra la respuesta de IL-6 de muestras de ensayo con baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con células clónicas MONOMAC6-CA8 sobre placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas de IL-6 son con respecto a LPS y controles positivo y negativo de Extraneal®.
- 5 Figura 8: gráfico que ilustra las respuestas de IL-6 de muestras de ensayo con baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con células 28SC sobre placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas de IL-6 son con respecto a LPS y controles positivo y negativo de dextrano.
- 10 Figura 9: gráfico que representa la respuesta de IL-6 de muestras de ensayo con alta densidad celular en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con células mononucleares de sangre periférica sobre placas de polipropileno con pocillos de fondo redondo. Las respuestas de IL-6 son con respecto a LPS, controles positivo y negativo de Extraneal® y controles positivo y negativo de dextrano.
- 15 Figura 10: gráfico que representa la respuesta de IL-6 de muestras de ensayo con baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con sangre total sobre placas de polipropileno con pocillos de fondo redondo. Las respuestas de IL-6 son con respecto a LPS y controles positivo y negativo de Extraneal®.
- 20 Figura 11A: gráfico que representa la respuesta de IL-6 en caso de placas de polipropileno (columnas negras) y placas de poliestireno (columnas grises) en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con células mononucleares de sangre periférica (1 millón de células por pocillo). Las respuestas de IL-6 son con respecto a LPS, controles positivo y negativo de Extraneal® y controles positivo y negativo de Hb.
- 25 Figura 11B: gráfico que representa las respuestas de IL-1 β en caso de placas de polipropileno (columnas negras) y placas de poliestireno (columnas grises) en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con células mononucleares de sangre periférica (1 millón de células por pocillo). Las respuestas de IL-1 β son con respecto a LPS, controles positivo y negativo de Extraneal® y controles positivo y negativo de Hb.
- 30 Figura 12A: gráfico que ilustra la respuesta de IL-6 de muestras de ensayo con alta densidad celular en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con células mononucleares de sangre periférica sobre placas de polipropileno con pocillos de fondo redondo. Las respuestas de IL-6 son con respecto a LPS y controles positivo y negativo de Extraneal®.
- 35 Figura 12B: gráfico que ilustra la respuesta de IL-6 de muestras de ensayo con baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con células mononucleares de sangre periférica sobre placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas de IL-6 son con respecto a LPS y controles positivo y negativo de Extraneal®.
- 40 Figura 13A: gráfico que ilustra la respuesta de IL-6 de muestras de ensayo con alta densidad celular en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con células mononucleares de sangre periférica sobre placas de polipropileno con pocillos de fondo redondo. Las respuestas de IL-6 son con respecto a LPS y controles positivo y negativo de Extraneal®.
- 45 Figura 13B: gráfico que ilustra la respuesta de IL-6 de muestras de ensayo con alta densidad celular en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con células mononucleares de sangre periférica sobre placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas de IL-6 son con respecto a LPS y controles positivo y negativo de Extraneal®.
- 50 Figura 14A: gráfico que ilustra la respuesta de IL-6 de muestras de ensayo con alta densidad celular en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con células mononucleares de sangre periférica sobre placas de polipropileno con pocillos de fondo redondo. Las respuestas de IL-6 son con respecto a LPS y controles positivo y negativo de Extraneal®.
- 55 Figura 14B: gráfico que ilustra la respuesta de IL-6 de muestras de ensayo con alta densidad celular en un ensayo de activación de monocitos llevado a cabo con células mononucleares de sangre periférica sobre placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas de IL-6 son con respecto a LPS y controles positivo y negativo de Extraneal®.
- Figura 15: gráfico que ilustra la respuesta de IL-1 β de muestras de ensayo con alta densidad celular en un ensayo de ITP comercial llevado a cabo con sangre total sobre placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas de IL-1 β son con respecto a LPS, controles positivo y negativo de Extraneal®, controles positivo y negativo de hemoglobina, control salino y control Gram positivo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los pirógenos estimulan monocitos sanguíneos (y también otros leucocitos) y macrófagos para producir y liberar numerosos mediadores pirogénicos endógenos de la respuesta inflamatoria, incluyendo citoquinas (por ejemplo TNF- α , IL-1 β e IL-6). La liberación de estos mediadores pirogénicos en la circulación provoca una cascada de sucesos que conduce a una respuesta inflamatoria en el individuo afectado. El ensayo de activación de monocitos de la presente invención se basa en la medición de estos pirógenos endógenos como un marcador para una respuesta inflamatoria. De acuerdo con una realización preferente de la presente invención, se incuba una muestra

con un reactivo que contiene monocitos en un primer sistema de ensayo que comprende una superficie consistente en polipropileno, estando presente el reactivo que contiene monocitos en el sistema de ensayo en una alta densidad celular. El contenido del primer sistema de ensayo se transfiere después a un segundo sistema de ensayo que comprende una superficie revestida con anticuerpos anticitoquina, analizándose el segundo sistema de ensayo en cuanto a la presencia de citoquinas unidas a la superficie por los anticuerpos. El ensayo es tal como se expone en las reivindicaciones.

Los ensayos de pirógenos de la presente invención se utilizan para detectar pirógenos no endotoxínicos, es decir, bacterias Gram positivas (por ejemplo *Staphylococcus aureus*) o sus componentes (por ejemplo muropéptido, ácido lipoteicoico, enterotoxinas, estreptolisina), estimuladores inmunes tales como fitohemaglutimina o ésteres de forbol, así como endotoxinas. Dado que el ensayo utiliza la respuesta citoquímica de monocitos a diversos pirógenos en lugar de una respuesta específica a endotoxina bacteriana Gram negativa, con el ensayo de la presente invención se puede detectar una amplia gama de agentes pirogénicos.

Se ha demostrado que los ensayos de pirógenos de la presente invención son más eficaces para detectar pirógenos no endotoxínicos en lotes contaminados de un producto médico en comparación con los ensayos convencionales. Los ejemplos que aquí se ofrecen demuestran que estos ensayos convencionales no permiten distinguir muestras de control positivo de solución de diálisis peritoneal Extraneal®, hemoglobina o dextrano, de muestras de control negativo de las mismas sustancias parenterales. La muestra de control positivo de Extraneal® se obtuvo de un lote de producto contaminado con pirógeno no endotoxínico; el lote contaminado provocó reacciones adversas en humanos, pero dio resultado negativo en cuanto a la presencia de pirógenos de acuerdo con el ensayo LAL, que sólo analiza en relación con pirógenos endotoxínicos (Martí y col., Lancet, 365(9459), 588). La muestra de control positivo de hemoglobina también se obtuvo de un lote de producto contaminado con pirógeno no endotoxínico; el lote contaminado provocó respuestas de fiebre en conejos, pero dio resultado negativo en cuanto a la presencia de pirógenos de acuerdo con el ensayo LAL. El control positivo de dextrano consistía en una preparación de dextrano que había provocado fiebre en humanos, pero que dio resultado negativo en cuanto a la presencia de pirógenos de acuerdo con el ensayo LAL. La capacidad del ensayo para detectar contaminantes no endotoxínicos en productos médicos tiene un gran valor, ya que permite identificar lotes de productos médicos contaminados antes de que sean puestos en circulación para su uso con pacientes. Algunos ensayos conocidos funcionan bien en el contexto de detectar pirógenos no endotoxínicos y endotoxínicos puros, es decir, peptidoglicano (PG) de *S. aureus* y LPS de *E. coli*, tal como dan a conocer Nakagawa y col., como se indica más arriba, o la siembra de endotoxina en productos, es decir, varios fármacos se sembraron con diferentes concentraciones de endotoxina en los seis ensayos del Estudio Humano, tal como se indica más arriba. Los ensayos LAL funcionan eficazmente a condición de que un producto esté contaminado con endotoxina (Mascoli, C. C., Weary, M. E., J Parenter Drug Assoc. 2003, 33, 81; Mascoli, C. C., Weary, M.E., Prog Clin Biol Res. 2003, 29, 387). Sin embargo, cuando un producto médico está contaminado con un pirógeno no endotoxínico, dichos ensayos no detectan el pirógeno. Sin ningún compromiso con una teoría en particular, se cree que el pirógeno no endotoxínico interactúa con el producto médico, lo que conduce a un "enmascaramiento" del pirógeno y a la incapacidad para detectar contaminantes no endotoxínicos.

Los ensayos de pirógenos de la presente invención superan este efecto de enmascaramiento y son capaces de detectar contaminantes no endotoxínicos en productos médicos: por ejemplo, en una realización preferente, en la que se cultivaron PBMC con una alta densidad celular en pocillos de polipropileno de fondo redondo, el ensayo de pirógenos de la presente invención permitió distinguir entre muestras de control positivo y negativo de solución Extraneal® y dextrano (véase la Figura 9). Ninguno de los kits disponibles ensayados permitió distinguir entre controles positivos y negativos de Extraneal® o hemoglobina (véanse las Figuras 1-8). De nuevo, sin ningún compromiso con una teoría en particular, se cree que una alta densidad celular proporciona más células para un mayor contacto entre célula y célula. Un mayor contacto entre célula y célula facilita una mayor comunicación entre las células y, por consiguiente, conduce a un aumento de la respuesta inflamatoria a un contaminante pirogénico. Las células se comunican entre sí a través de mediadores solubles, como citoquinas, y a través del contacto entre célula y célula, en el que también pueden participar citoquinas. Un pocillo de fondo redondo, o un pocillo configurado de modo general para que las células se concentren, proporciona un mayor contacto entre célula y célula en comparación con un pocillo de fondo plano. También se cree que el polipropileno aumenta la biodisponibilidad de pirógenos no endotoxínicos. De nuevo, sin ningún compromiso con una teoría en particular, se cree que el tratamiento superficial de placas de poliestireno tal como se utilizan convencionalmente en cultivos celulares hace que la superficie de éstas sea menos hidrófoba y tenga más capacidad para unirse a células, pero también hace que dicha superficie se una a pirógenos no endotoxínicos y los neutralice. La placa de polipropileno no está tratada superficialmente, con lo que sigue siendo más hidrófoba que la placa de poliestireno y menos propensa a neutralizar pirógenos no endotoxínicos.

1. Componentes del ensayo de pirógenos

Un ensayo de pirógenos caracterizado por alguna combinación de los tres elementos arriba descritos, alta densidad celular, fondo redondo (u otra forma diferente apropiada) y polipropileno, es decir PBMC, presentes con una alta densidad celular en un pocillo de poliestireno de fondo redondo, posibilita una mejor detección de contaminación no endotoxínica en productos médicos. Los ensayos de pirógenos de la presente invención se pueden utilizar para

analizar una variedad de productos médicos en cuanto a la presencia de contaminación no endotoxínica, incluyendo productos sanguíneos, productos médicos para la administración parenteral, líquidos de diálisis, vacunas, soluciones intravenosas y cualquier fluido que entre en contacto con el cuerpo o con fluidos corporales.

A. Citoquina o mediador endógeno de la respuesta inflamatoria

5 Como base para el ensayo de pirógenos de la presente invención se puede utilizar cualquier mediador endógeno de la respuesta inflamatoria segregado por el reactivo que contiene monocitos que sea detectable. No obstante, preferentemente se emplea un marcador de citoquina o endotelina porque éstas son fáciles de detectar mediante el método de la invención. Se ha comprobado que los monocitos de sangre total incubados con pirógeno endotoxínico o no endotoxínico producen diversas clases de citoquinas, incluyendo, de forma no exclusiva, citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6), citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-13, IL-1ra, TGF), Th1 (IL-2, IFN, IL-12), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13), IL-10, IL-1ra, IL-8 y PGE₂. Los marcadores de citoquina preferentes para su uso en la invención incluyen TNF- α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8 y PGE₂. La IL-6 es un marcador de citoquina particularmente preferente para el ensayo de la presente invención. La IL-6 se produce en cantidades detectables en un período de incubación relativamente corto. La IL-6 inmunorreactiva, a diferencia de la IL-1 β y el TNF- α inmunorreactivos, se segrega exclusivamente en el medio acondicionado de células/sangre, en grandes cantidades, lo que permite su estimación completa. En cambio, el TNF- α y la IL-1 β inmunorreactivos permanecen en gran medida en situación intracelular, dando lugar a la posibilidad de que los preparados de ensayo que afectan a la permeabilidad celular puedan interferir más fácilmente en el ensayo con TNF- α o IL-1 β (inmunorreactivos) como lectura, más que la IL-6 (véanse las Figuras 2 y 3). No obstante, también sería posible utilizar TNF- α o IL-1 β como marcador de citoquina en la presente invención. El TNF- α se produce antes que la IL-6 en la respuesta a pirógenos monocíticos. Por consiguiente, en una realización de la invención en la que se ensaye TNF- α se utilizará un tiempo de incubación más corto (~ 1 a 2 horas) que en realizaciones en las que se ensaye IL-6. Diferentes contaminantes pirogénicos pueden provocar diferentes respuestas de citoquina en el cultivo celular. Por consiguiente, la invención se puede adaptar para detectar la formación de citoquinas particulares cuando sea probable que un producto farmacéutico presente contaminación con un pirógeno particular que provoca la secreción de dichas citoquinas.

B. Anticuerpo para la citoquina o mediador endógeno

Una vez determinada la citoquina a ensayar, se debe preparar un anticuerpo para dicha citoquina para su uso en la presente invención. Los anticuerpos policlonales purificados bajo condiciones rigurosas, tal como se describe en el Ejemplo 1 de la Patente US nº 6.696.261, funcionan bien en el ensayo de pirógenos. Dado que la sangre animal de la que se aíslan los anticuerpos policlonales está naturalmente libre de pirógenos (si se extrae de animales sanos), simplemente se ha de prevenir la contaminación de las materias primas con pirógenos durante su purificación para obtener un producto libre de pirógenos. Tal como se describe en el Ejemplo 1 de la Patente US nº 6.696.261, para obtener anticuerpos policlonales libres de pirógenos se utilizan tampones libres de pirógenos y fases sólidas en columnas de cromatografía de afinidad. Alternativamente se pueden utilizar anticuerpos monoclonales de cultivos de hibridomas. Sin embargo, cuando se utilizan anticuerpos monoclonales se debe poner especial cuidado para aislar los anticuerpos de cualquier pirógeno contaminante que pueda estar presente en el cultivo celular de hibridomas.

Para su uso en la presente invención, el anticuerpo para la citoquina se aplica a una superficie en un sistema de ensayo. Los métodos, tal como el revestimiento, para unir anticuerpos a la superficie de un sistema de ensayo, tal como un pocillo de microtitulación, son bien conocidos en la técnica bioquímica. Existen muchos sistemas de ensayo comerciales, y el fabricante normalmente proporciona materiales e instrucciones para aplicar por revestimiento anticuerpos sobre una superficie del sistema. Debido a su facilidad de lectura y al pequeño volumen de muestra requerido, en una realización preferente de la presente invención se utilizan pocillos de microtitulación en los que una parte de la superficie interior del pocillo está revestida con el anticuerpo. Con el fin de aprovechar por completo las ventajas de la invención, es preferible que el pocillo de microtitulación forme parte de una placa de microtitulación consistente en una disposición plana de pocillos similares, situados de tal modo que la disposición de pocillos puede ser leída con un equipo automático de lectura de placas de inmunoensayo (véase, por ejemplo, la Patente US nº 5.281.540). Los equipos automáticos tales como los lectores de placas ELISA (por ejemplo el Ultramark Microplate Reader, disponible en Bio-Rad Laboratories, Inc.) automatizan el proceso de evaluación del ensayo y disminuyen en gran medida el coste por ensayo. Si así se desea, las placas de pocillos de microtitulación se pueden librar de pirógenos (si no se suministran ya libres de pirógenos) mediante lavado a fondo con un tampón libre de pirógenos. En una realización particularmente preferente de la presente invención, sobre los pocillos de una placa ELISA se aplican por revestimiento anticuerpos policlonales anti-IL-6. No obstante, otros formatos de ensayo de inmunodiagnóstico (por ejemplo, en los que el anticuerpo se aplica por revestimiento sobre una perla o varilla de inmersión) también son aceptables para su uso en la presente invención.

55 Además del anticuerpo "de captura", al preparar sistemas de placa de microtitulación a utilizar en la presente invención se pueden emplear otros anticuerpos y reactivos para ensayar la citoquina. Por ejemplo, una vez que el anticuerpo de captura ha sido aplicado sobre la placa de microtitulación, los sitios de unión restantes de la placa se pueden "bloquear" con otra proteína. Después del bloqueo, sobre la placa de microtitulación se puede aplicar un

anticuerpo de detección marcado (tal como un anticuerpo biotinilado o anticuerpo marcado con enzima), junto con un compuesto de vidrio protector. De este modo, cuando se incuba una muestra en la placa de microtitulación, tal como se describe más abajo, la citoquina liberada es capturada por el anticuerpo de captura unido al pocillo y marcado por el anticuerpo de detección simultáneamente durante el período de incubación de la muestra.

5 C. Reactivo que contiene monocitos

Como primer paso del ensayo de pirógenos de la presente invención, las células contenidas en un reactivo que contiene monocitos se cultivan combinando el reactivo que contiene monocitos y una muestra a ensayar en un sistema de ensayo. El reactivo que contiene monocitos de la presente invención se selecciona de entre el grupo consistente en PBMC, células de líneas celulares monocíticas, sangre total o cualquier línea celular que exprese o que se pueda hacer que exprese los receptores de tipo Toll (TLR) que pueden intervenir en la mediación de respuestas a agentes proinflamatorios y pirogénicos, incluyendo células en las que se han inducido o clonado estos receptores. Preferentemente, la línea celular monocítica se selecciona de entre el grupo consistente en MONOMAC-6 (MM6), THP-1 y 28SC. Los monocitos del reactivo que contiene monocitos son preferentemente monocitos de la misma especie a la que se le va a administrar el producto ensayado (es decir, humano en caso de productos farmacéuticos; gato, perro, caballo, etc. en caso de productos veterinarios). No obstante, también se pueden utilizar monocitos de otras especies con la reactividad pirogénica deseada. En determinadas realizaciones preferentes, el reactivo que contiene monocitos comprende PBMC.

En una realización de la invención, el reactivo que contiene monocitos es sangre total y el sistema de ensayo incluye al menos una superficie que comprende polipropileno, de modo que el reactivo que contiene monocitos está en contacto con la superficie.

En otra realización, el reactivo que contiene monocitos es PBMC presente en una alta densidad celular, y el sistema de ensayo incluye al menos una superficie que comprende polipropileno, polietileno, poliestireno u otro material similar en contacto con PBMC.

Cuando el reactivo que contiene monocitos es PBMC o células de línea celular, el reactivo está presente en el sistema de ensayo en una alta densidad celular para facilitar un mayor contacto entre célula y célula, tal como se describe arriba más detalladamente. En determinadas realizaciones, el reactivo que contiene monocitos está presente en el sistema de ensayo en una densidad celular por pocillo de al menos aproximadamente 125.000 células, al menos aproximadamente 250.000, 500.000, 600.000, 700.000, 800.000, 900.000, 1.000.000, 1.100.000, 1.200.000, 1.300.000, 1.400.000, 1.500.000, 1.600.000, 1.700.000, 1.800.000, 1.900.000 o 2.000.000 células por pocillo. El experto medio en la técnica reconocerá que la densidad celular máxima se sobrepasa cuando el volumen de reactivo dentro del pocillo presenta una cantidad insuficiente de nutrientes celulares para mantener apropiadamente las células que se encuentran dentro del pocillo.

Cuando el reactivo que contiene monocitos es sangre total, el reactivo puede estar presente en el sistema de ensayo en una densidad celular menor que en el caso de las PBMC o las células de línea celular. En determinadas realizaciones en las que el reactivo que contiene monocitos es sangre, el reactivo está presente en el sistema de ensayo en una densidad celular de al menos aproximadamente 100.000 células mononucleares de sangre periférica por pocillo, al menos aproximadamente 200.000, 210.000, 220.000, 230.000, 240.000, 250.000, 260.000, 270.000, 280.000, 290.000, 300.000, 310.000, 320.000, 330.000, 340.000, 350.000, 360.000, 370.000, 380.000, 390.000 o 400.000 PBMC por pocillo. Sin ningún compromiso con una teoría en particular, se cree que la sangre total puede ser utilizada en una densidad celular más baja que en el caso de las PBMC o las células de línea celular porque los monocitos están en su entorno natural y todos los componentes del suero que pueden influir en su respuesta a pirógenos están presentes en solución. Además, cuando el reactivo que contiene monocitos comprende sangre total, la lectura utilizada para el ensayo de pirógenos es IL-6.

Preferentemente, cuando se utiliza sangre como reactivo que contiene monocitos, la sangre es fresca o tiene menos de 24 horas, preferiblemente menos de 4 horas. Además, cuando se utiliza sangre total se pueden incluir anticoagulantes para retardar o prevenir la coagulación sanguínea. Anticoagulantes adecuados incluyen citrato (por ejemplo, en una concentración final del 0,38%), heparina (heparinato sódico) o fragmin (heparina de bajo peso molecular). Los aditivos anticoagulantes pueden ser utilizados sin influir en la respuesta de los monocitos a pirógenos en la muestra de ensayo. La sangre total también se puede diluir con un tampón apropiado u otro diluyente, como medio de cultivo celular RPMI o solución salina fisiológica. La sangre total se diluye preferentemente al menos al 50%, de forma especialmente preferente en una proporción entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 25%, y de forma totalmente preferente aproximadamente al 20% del volumen final para la incubación (véase la Figura 1 de la Patente US nº 6.696.261). Mediante la dilución de la sangre total, la curva de respuesta de IL-6 de la mayoría de los donantes se puede llevar a un margen estrecho que puede ser utilizado para cuantificar una gama más amplia de concentraciones de contaminación por pirógenos (véase la Figura 3 de la Patente US nº 6.696.261).

2. Sistema de dos ensayos

En determinadas realizaciones de la presente invención, el ensayo de pirogenicidad se lleva a cabo en un sistema de dos recipientes de ensayo, de modo que los pasos de incubación de muestras con el reactivo que contiene monocitos y la captura de citoquina(s) producida(s) por el reactivo que contiene monocitos tienen lugar en dos sistemas de recipiente de ensayo diferentes. El paso de incubación tiene lugar a continuación del paso de cultivo descrito más arriba; la incubación de la muestra de ensayo con el reactivo que contiene monocitos (como PBMC) se lleva a cabo en el mismo sistema de ensayo que el paso de cultivo. El tiempo de incubación óptimo del ensayo de pirógenos de la presente invención variará en función de las condiciones de ensayo, es decir, de la citoquina ensayada. Por ejemplo, cuando se incuba sangre total con endotoxina y la lectura es IL-6, el reactivo que contiene monocitos ha producido una cantidad mínima de citoquina adicional después de 6 horas de incubación; después de 4 horas de incubación, el reactivo ha segregado una cantidad suficiente de IL-6 para posibilitar la cuantificación del contaminante pirógeno. Cuando se incuba sangre total con pirógeno no endotoxínico y se utiliza cualquier lectura, después de aproximadamente 16-24 horas de incubación el reactivo ha segregado una cantidad suficiente de IL-6 para posibilitar la cuantificación del contaminante pirógeno. Para una realización de la presente invención en la que se analiza la producción de IL-6, es preferible un tiempo de incubación de aproximadamente 6 a aproximadamente 24 horas, de forma especialmente preferente de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 horas y de forma totalmente preferente de aproximadamente 16 a aproximadamente 24 horas. Si se ensaya otra citoquina, el período de incubación se debe optimizar para producir dicha citoquina en particular. Esta optimización entra dentro de las capacidades del experto en la técnica. Si la citoquina a ensayar no es liberada por los monocitos, las células se pueden someter a lisis mediante congelación-descongelación, o mediante la adición de un detergente al final del período de incubación a una concentración que no altere la unión de ligandos con anticuerpos.

Una vez completado el paso de incubación, el contenido del sistema de ensayo (primer sistema de ensayo), es decir el reactivo que contiene monocitos y la muestra de ensayo, se transfiere a un segundo sistema de ensayo que comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria, por ejemplo endotelina. El segundo sistema de ensayo se analiza en cuanto a la presencia de citoquina o mediador endógeno sobre la superficie revestida con el anticuerpo anticitoquina o mediador antiendógeno. Preferentemente, en el procedimiento se mantienen en todo momento unas condiciones estériles rigurosas antes de analizar la superficie revestida con anticuerpo para detectar la citoquina unida. Si como realización de la presente invención se utiliza una placa ELISA revestida con un anticuerpo de captura, la placa ELISA se lava y se le añade un segundo anticuerpo anticitoquina conjugado con una enzima (a no ser que el segundo anticuerpo “de detección” marcado haya sido añadido inicialmente a la placa antes del vidriado o junto con el contenido del primer sistema de ensayo). La placa ELISA se lava de nuevo y la adición de un sustrato a la placa ELISA producirá un color. Después de un breve período de incubación, la reacción finaliza y la densidad óptica de la solución se mide en un lector de placas ELISA. Este proceso se describe más detalladamente en el Ejemplo 2 de la Patente US nº 6.696.261. Alternativamente se pueden utilizar técnicas de inmunoensayo no enzimático. Por ejemplo, el segundo anticuerpo del inmunoensayo “en sándwich” se puede marcar con una fracción fluorescente o un isótopo radiactivo. Después de lavado, la cantidad de citoquina capturada en el pocillo se puede cuantificar detectando la cantidad de fluorescencia o radiación presente en el pocillo. Existen diversos sistemas de ensayo de base enzimática y no enzimática comerciales, pudiendo éstos modificarse fácilmente por el experto en la técnica para utilizarlos en la presente invención.

3. Sistema de un ensayo

En determinadas realizaciones de la presente invención, el ensayo de pirogenicidad se lleva a cabo en un sistema de un recipiente de ensayo, de modo que los pasos de incubación de la muestra con el reactivo que contiene monocitos y la captura de citoquina(s) producida(s) por el reactivo que contiene monocitos tienen lugar en el mismo sistema de recipiente de ensayo. El sistema de ensayo incluye al menos una superficie que comprende polipropileno y al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria. El paso de incubación tiene lugar a continuación del paso de cultivo descrito más arriba y se lleva a cabo en el mismo sistema de ensayo que el paso de cultivo. Tal como se describe más arriba en el contexto del sistema de dos recipientes de ensayo, el tiempo de incubación óptimo a utilizar en el ensayo de pirógenos de la presente invención variará en función de las condiciones de ensayo, es decir de la citoquina ensayada. En general, las instrucciones referentes al paso de incubación descritas con respecto al sistema de dos recipientes de ensayo también son aplicables al sistema de un recipiente de ensayo. El período de incubación se debe optimizar para producir una citoquina particular y esta optimización entra dentro de las capacidades del experto en la técnica. Si la citoquina a ensayar no es liberada por los monocitos, las células se pueden someter a lisis mediante congelación-descongelación, o mediante la adición de un detergente al final del período de incubación a una concentración que no altere la unión de ligandos con anticuerpos.

Una vez completo el paso de incubación, el sistema de ensayo, que comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria, por ejemplo endotelina, se analiza en cuanto a la presencia de citoquina o mediador endógeno sobre la superficie revestida con el anticuerpo anticitoquina o mediador antiendógeno. Preferentemente, en el procedimiento se mantienen en todo momento

condiciones estériles rigurosas antes de analizar la superficie revestida con anticuerpo para detectar la citoquina unida. En general, la descripción referente al paso de análisis de sistema de dos recipientes de ensayo, es decir, la descripción de las técnicas con placa ELISA y las técnicas de inmunoensayo no enzimático, también es aplicable al sistema de un recipiente de ensayo.

- 5 En general, el sistema de un recipiente de ensayo y el sistema de dos recipientes de ensayo son intercambiables.

4. Recipientes de ensayo

Los sistemas de ensayo de la presente invención comprenden al menos una superficie en contacto con el reactivo que contiene monocitos. El sistema o los sistemas de ensayo incluyen al menos un pocillo de microtitulación, consistiendo dicha superficie en al menos una parte del interior del pocillo de microtitulación. La superficie del pocillo de microtitulación comprende un revestimiento de polipropileno o todo el pocillo de microtitulación está compuesto por polipropileno. En determinadas realizaciones en las que el sistema de ensayo comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria, la superficie sobre la que se aplica el anticuerpo consiste en al menos una parte del interior del pocillo de microtitulación. El pocillo de microtitulación está configurado de modo que el reactivo que contiene monocitos está concentrado en comparación con un pocillo de microtitulación de fondo plano.

En determinadas realizaciones, el pocillo o los pocillos de microtitulación comprenden una parte superior abierta, una zona superior que se extiende hacia abajo desde la parte superior abierta y una pared de fondo cuyo diámetro se va reduciendo desde un lugar situado por encima del punto más bajo hasta el punto más bajo.

En determinadas realizaciones, el pocillo o los pocillos de microtitulación comprenden una parte superior abierta, una zona superior que se extiende hacia abajo desde la parte superior abierta y que presenta un extremo superior y un extremo inferior y una zona inferior que presenta un extremo superior y el punto más bajo, extendiéndose la zona inferior desde el extremo inferior de la zona superior de modo que su diámetro se reduce más rápidamente que en la zona superior desde el extremo superior de la zona inferior hacia el punto más bajo.

La pared de fondo de dicho pocillo de microtitulación no es plana, sino que preferentemente es curva, a veces parabólica. En determinadas realizaciones particulares, los lados del pocillo de microtitulación están inclinados hacia adentro o la pared de fondo se extiende hacia abajo.

5. Kit de diagnóstico

Cualquiera de las realizaciones arriba descritas puede ser incorporada en un kit de diagnóstico para la realización de ensayos de pirógenos. El kit se utiliza para detectar diversos pirógenos no endotoxínicos, incluyendo bacterias Gram positivas (por ejemplo *Staphylococcus aureus*) o sus componentes (por ejemplo muropéptido, ácido lipoteicoico, enterotoxinas, estreptolisina), así como pirógenos endotoxínicos en una variedad de productos médicos, incluyendo productos sanguíneos u otras sustancias parenterales, como líquidos de diálisis, vacunas y soluciones intravenosas. En general, dicho kit incluye una placa de microtitulación que comprende múltiples pocillos de microtitulación configurados de modo que el medio de cultivo contenido en cada pocillo está concentrado en comparación con un pocillo de microtitulación de fondo plano, incluyendo los pocillos al menos una superficie que comprende polipropileno. Los pocillos de la placa de microtitulación contienen un reactivo que incluye monocitos criopreservados que comprende sangre total criopreservada, células mononucleares de sangre periférica criopreservadas o células de líneas celulares monocíticas criopreservadas, que están en contacto con la superficie de los pocillos. En determinadas realizaciones, los pocillos de la placa de microtitulación comprenden polipropileno. Cuando el reactivo que contiene monocitos criopreservados comprende células mononucleares de sangre periférica criopreservadas o células de líneas celulares monocíticas criopreservadas, el reactivo está presente en los pocillos a una alta densidad celular. Los kits que contienen sangre total criopreservada como reactivo que contiene monocitos también contienen anticuerpo para IL-6, ya que la IL-6 es la lectura preferente.

En realizaciones particulares, los pocillos incluyen una barrera impermeable a monocitos. La barrera comprende al menos una superficie consistente en un material libre de pirógenos, y es típicamente una membrana, una rejilla, un tamiz o una criba. Preferentemente, la barrera es estéril. En la técnica se conocen materiales barrera adecuados para su uso con placas de microtitulación. La barrera, que es permeable a los fluidos, permite lavar las células criopreservadas sin retirarlas de los pocillos. El sulfóxido de dimetilo (DMSO), que baña las células criopreservadas y actúa como conservante, se puede retirar para que no interfiera en el ensayo. Las muestras de ensayo se añaden encima de la barrera, penetran por la barrera, entran en contacto con las células situadas por debajo de la barrera y potencialmente estimulan estas células para que produzcan citoquinas. Las citoquinas liberadas por las células se difunden en el medio por encima de la barrera. Normalmente, las soluciones situadas por encima y por debajo de la barrera se mezclan a fondo mediante aspiración de las mismas. A continuación, una parte alícuota de medio bien mezclado de la parte situada por encima de la barrera se analiza en cuanto a la presencia de citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria.

6. Interpretación de los datos de producción de citoquina

A. Método de curva estándar

Con el fin de interpretar apropiadamente los datos de producción de citoquinas generados en el ensayo de pirógenos de la presente invención, se genera una curva estándar de endotoxina incubando el reactivo que contiene monocitos con endotoxina USP estándar. El objetivo es cuantificar la respuesta de producción de citoquina medida para una muestra de ensayo en términos de la respuesta observada en caso de un pirógeno conocido. Se puede obtener una curva estándar a partir de cualquier cantidad estadísticamente significativa de puntos de datos generados con concentraciones considerablemente diferentes de estándar de endotoxina utilizando un *software* de análisis de datos de ajuste óptimo estándar. Los métodos para generar estas curvas estándar son bien conocidos en la técnica. Los solicitantes han comprobado que los puntos de datos de 10, 4, 1, 0,25, 0,06, 0,03 y 0 EU/ml de endotoxina son adecuados para generar una curva estándar, pero también sería adecuada cualquier otra cantidad estadísticamente significativa de concentraciones en un intervalo similar. Una vez generada una curva estándar, la concentración equivalente no endotoxínica (cuantificada en equivalentes de unidad de endotoxina) se puede interpolar a partir de la respuesta de citoquina utilizando la curva estándar. Dado que la respuesta de los reactivos que contienen monocitos basados en sangre total puede variar de forma muy significativa de un donante a otro, es importante generar una curva estándar para cada grupo de ensayos realizados con un lote particular de reactivo que contiene monocitos. No obstante, dado que la realización preferente de la invención con placas ELISA utiliza cantidades muy pequeñas de sangre humana (aproximadamente 40 µl/pocillo), una sola unidad de sangre donada puede ser utilizada para varios cientos de pocillos. La curva estándar generada utilizando la endotoxina USP ayuda a normalizar los datos en términos de relación con unidades de endotoxina (EU, de acuerdo con la definición de la USP/FDA, que son idénticas a las IU, unidades internacionales, de acuerdo con la definición de la OMS), que es la norma común para expresar la contaminación por endotoxinas/pirógenos.

B. Método de lote de referencia

Alternativamente, los datos de producción de citoquina generados en el ensayo de pirógenos de la presente invención pueden ser interpretados comparando las respuestas de citoquina provocadas por lotes de ensayo de un producto con las provocadas por lotes de referencia de un producto, un lote de referencia contaminado y un lote de referencia no contaminado. En primer lugar se identifican los dos lotes de referencia de un producto médico: los lotes de referencia se someten a ensayo de pirógenos y se miden las respuestas de citoquina provocadas por estos lotes. Después, los lotes de ensayo se someten a ensayo de pirógenos y las respuestas provocadas por estos lotes se comparan con las de los lotes de referencia. En general, un lote de ensayo se considerará no contaminado si provoca una respuesta menor que la del lote de referencia contaminado y similar a la del lote de referencia no contaminado. Cada lote de ensayo se puede ensayar una o varias veces. Por ejemplo, de acuerdo con un método de lote de referencia, un producto se consideraba no contaminado si provocaba la liberación de a lo sumo el doble de IL-6 que el lote de referencia no contaminado en cuatro de cuatro donantes o en siete de ocho donantes. El ensayo se llevó a cabo por cuadruplicado utilizando sangre de cuatro donantes diferentes. En un artículo de Gaines-Das y col., 2004, se describe un método de lote de referencia preferente en el que se requiere que la muestra de ensayo estimule la liberación de menos IL-6 que la referencia. De acuerdo con dicho artículo se requiere que el preparado de ensayo pase el ensayo con las PBMNC de cuatro donantes diferentes. Si el preparado de ensayo pasa el ensayo con las PBMNC de tres de los cuatro donantes, el ensayo continúa con las PBMNC de otros cuatro donantes, no habiendo proporcionado ninguno de ellos las PBMNC para el primer ensayo, y el preparado de ensayo ha de pasar el ensayo con las PBMNC de siete de los ocho donantes diferentes.

Ventajosamente, los ensayos de activación de monocitos de la presente invención permiten detectar mejor la presencia de una amplia gama de pirógenos, incluyendo pirógenos no endotoxínicos, en productos médicos tales como productos sanguíneos, soluciones intravenosas y vacunas.

45 DEFINICIONES

Tal como se utiliza aquí, el concepto pirógeno endotoxínico o no endotoxínico "puro" o pirógeno en su "forma pura" se refiere a una endotoxina de la que se ha eliminado su proteína asociada. La endotoxina pura también es conocida como lipopolisacárido (LPS).

50 El concepto "reactivo que contiene monocitos" significa cualquier solución de células de leucocitos monocíticos del sistema inmunológico. Preferentemente, estas células se derivan del organismo al que se debe administrar el producto ensayado (es decir, humano en caso de productos farmacéuticos; gato, perro, caballo, etc. en caso de productos veterinarios). La sangre total humana es un ejemplo de reactivo que contiene monocitos.

55 El concepto "sistema de ensayo" significa cualquier recipiente y superficie que puedan ser utilizados en un ensayo de activación de monocitos, incluyendo un recipiente en el que se cultivan e incuban células con una muestra de ensayo así como un recipiente y una superficie con anticuerpo unido que pueden ser utilizados en un inmunoensayo. Preferentemente, en relación con la realización de un inmunoensayo, estos recipientes son placas de pocillos de

microtitulación con anticuerpos unidos a una superficie del pocillo, en las que se puede realizar en paralelo una gran cantidad de inmunoensayos colorimétricos ligados a enzimas y que pueden ser evaluadas automáticamente mediante una máquina de lectura de placas ELISA. No obstante, también están previstos otros sistemas de inmunoensayo, en especial sistemas en los que la superficie revestida no forma parte necesariamente de la pared del recipiente. Por ejemplo, en la presente invención se podría utilizar un tubo de ensayo más grande que contiene una perla de poliestireno o una varilla de inmersión revestida con el anticuerpo.

El concepto "línea celular monocítica" incluye cualquier línea celular que tenga receptores CD14 y/o tipo Toll (TLR) endógenos o que haya sido transfectada con CD14 y/o TLR y/o genes indicadores para mediadores inflamatorios/pirógenos. No es necesario que la línea celular sea monocítica siempre que tenga o haya sido transfectada con los componentes de los "receptores de pirógenos" presentes en monocitos: estos componentes incluyen TLR y CD14. Por ejemplo, las células humanas renales embrionarias (HEK) ya tienen la mayoría de los TLR y pueden ser transfectadas de forma estable con los TLR que no tienen (TLR2 y TLR4) y también con CD14 con el fin de que se parezcan suficientemente a un monocito para funcionar en los métodos de la invención.

EJEMPLOS

15 Ejemplo 1

Preparación de PBMC. Se aislaron PBMC de sangre periférica humana heparinizada que no tenía más de 4 horas de antigüedad mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll Paque Plus (Pharmacia #17-1440-02). Las células se lavaron dos veces con una solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin calcio ni magnesio (Gibco #14190) resuspendida en Minimum Essential Media (MEM (Gibco #11090), tampón HEPES (Gibco #15630) y 5 µl del plasma inactivado por calor del propio donante (es decir, el 2% de la concentración final). Las PBMC se diluyeron a las densidades celulares requeridas (8 millones, 4 millones, 2 millones y 1 millón de PBMC por ml).

Cultivo de células. Se llevaron a cabo cultivos celulares por cuadruplicado en las siguientes placas de microtitulación: Coming Costar #3790, #3359. En cada pocillo se introdujeron 125 µl de suspensión celular que contenía 1 millón, 0,5 millones, 0,25 millones o 0,13 millones de células, seguidos de 125 µl de la muestra de ensayo o estándar de endotoxina (0,0064-20 EU/ml). Los 250 µl de mezcla se mezclaron suavemente y se incubaron a 37±1°C, en 5% CO₂ y en aire humidificado. La duración del cultivo fue de 16 a 24 horas, tras lo cual se obtuvieron partes alícuotas del fluido de cultivo, diluidas 1 a 2 y 1 a 50, que se analizaron en cuanto a IL-6.

ELISA para IL-6. Se revistieron placas de 96 pocillos (Immunol 4, Dynex #011-010-3855) con 150 µl de 3 µg/ml de IgG monoclonal de ratón (R&D Systems #MAB206 disuelto en tampón bicarbonato, pH 9,5) mediante incubación durante una noche a 2-8°C. Las placas se lavaron tres veces con 300 µl de tampón de lavado (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Los sitios de unión no específica en las placas se bloquearon mediante la adición de 200 µl de solución de bloqueo (0,02 g/l de seroalbúmina bovina, fracción V, libre de proteasa). Las placas se lavaron de nuevo tres veces con 300 µl del mismo tampón de lavado y en cada pocillo se añadieron 100 µl de muestras (previamente diluidas 1 a 2 y 1 a 50 en diluyente de muestras) o de sustancias estándar (7,8-1000 pg/ml de estándar internacional OMS para IL-6 #89/548). En cada pocillo no utilizado se añadieron 100 µl de diluyente de muestras. La placa se cubrió con sellador (Falcon #3073) y se incubó con agitación (aproximadamente 300 rpm) durante 1 hora ± 5 minutos.

Después, la placa se aspiró y se lavó cinco veces con 300 µl de tampón de lavado. Luego se añadieron a cada pocillo 100 µl de 0,2 µg/ml de anticuerpo IL-6 antihumano de cabra biotinilado (R&D Systems, #BAF206) y la placa se cubrió de nuevo con sellador y se incubó con agitación (aproximadamente 300 rpm) durante 1 hora ± 5 minutos.

Después, la placa se aspiró y se lavó cinco veces con 300 µl de tampón de lavado. Luego se añadieron a cada pocillo 100 µl de 0,02 µg/ml de fosfatasa alcalina (Rockland #S000-05) y la placa se cubrió de nuevo con sellador y se incubó con agitación (aproximadamente 300 rpm) durante 1 hora ± 5 minutos.

Después, la placa se aspiró y se lavó cinco veces con 300 µl de tampón de lavado. Luego se añadieron a cada pocillo 200 µl de 1 mg/ml de pNPP en tampón de dietanolamina con MgCl₂ 0,5 mM. La placa se cubrió de nuevo con sellador y se incubó con agitación (aproximadamente 300 rpm) a temperatura ambiente hasta que la mayor concentración de la curva estándar de IL-6 (1000 pg/ml) presentó una densidad óptica entre aproximadamente 2,5 y 3,0 a 405 nm, momento en el que la reacción se interrumpió mediante la adición de 50 µl de NaOH 2M a cada pocillo. La densidad óptica de cada pocillo se determinó en un plazo de 30 minutos de la reacción interrumpida utilizando un lector de microplacas ajustado a 405 nm.

La Figura 1 muestra el efecto de la densidad celular en la respuesta de IL-6 a estándar de endotoxina (1 EU/ml) y control positivo de Extraneal®. El control positivo de Extraneal® estaba contaminado con pirógenos no endotoxínicos y provocaba una reacción adversa en humanos receptores de este lote del fármaco, pero daba un resultado negativo en el ensayo LAL (Martis y col., 2005). Los valores son promedios ± error estándar de la media de

cuatro pocillos repetidos. Las densidades celulares de 0,25 a 1 millón de PBMC por pocillo respondieron similarmente a 1 EU/ml de estándar de endotoxina. La muestra de control positivo se detectó mejor utilizando 1 millón > 0,5 millones > 0,25 millones >> 0,13 millones de células por pocillo.

Ejemplo 2 - Ensayos de pirógenos comparativos

- 5 Los métodos aquí descritos como estado actual de la técnica se reprodujeron con exactitud. Ninguno de estos métodos distingue los controles de producto positivos para solución de diálisis Extraneal®, hemoglobina y/o dextrano de los controles de producto negativos.

Los ensayos de Hoffman y col., 2005, se reprodujeron con exactitud tal como se describe en dicho documento utilizando placas de microtitulación de poliestireno con pocillos de fondo plano y lectura de IL-6. El reactivo que contiene monocitos se utilizó en una baja densidad celular y era sangre total (75.000 células por pocillo), PBMC (100.000 células por pocillo), MONOMAC6 (250.000 células por pocillo) o THP (250.000 células por pocillo) en las Figuras 2-5, respectivamente. Obsérvese que en la Figura 5 la lectura de IL-6 fue sustituida por neopterina porque la IL-6 es un pirógeno endógeno (a diferencia de la neopterina) y una lectura más fuerte en los métodos de la invención. En la Figura 6, como reactivo que contiene monocitos se utilizaron células THP-12A9 en una baja densidad celular (250.000 células por pocillo) y la lectura fue TNF.

El ensayo de Nakagawa y col. se reprodujo con exactitud tal como se describe en dicho documento utilizando 1.000.000 de células clónicas MONOMAC-CA8 por ml como reactivo que contiene monocitos, lectura IL-6, y placas de microtitulación de poliestireno con pocillos de fondo plano. Véase la Figura 7.

20 El ensayo de Yamamoto y col. se reprodujo con exactitud tal como se describe en dicho documento utilizando 1.000.000 de células 28C por ml como reactivo que contiene monocitos, lectura IL-6, y placas de microtitulación de poliestireno con pocillos de fondo plano. Véase la Figura 8. Sin embargo, las células 28C se cebaron con calcitriol (100 ng/ml) en lugar de interferón gamma, porque este último no proporcionaba ninguna curva dosis-respuesta para estándar de endotoxina.

Ejemplo 3 - Ensayo de pirógenos de la invención

25 En unas placas de polipropileno de 96 pocillos de fondo plano (Costar #3790, Coming Incorporated, EEUU) se llevaron a cabo cultivos (200 µl) de sangre total humana al 20% (40 µl = aproximadamente 60.000 PBMC/pocillo = aproximadamente 300.000 PBMC/ml) por cuadruplicado. Las adiciones en cada pocillo fueron: MEM-HEPES (60 µl), sangre de un solo donante (40 µl), estándar de endotoxina o muestras de Extraneal® diluidas 1:1 con MEM-HEPES (100 µl, es decir, la solución de Extraneal® estaba en una dilución final de 1 a 4 en el pocillo). Los contenidos de los pocillos se mezclaron removiendo suavemente (sin contaminación cruzada de pocillos) y se incubaron sin vibración (para permitir que las células se sedimentaran) a 37°C durante 16-24 horas en una atmósfera de un 5% de CO₂ en aire. Al final de la incubación del cultivo tisular se tomaron partes alícuotas de 100 µl de sobrenadante claro de cada pocillo para la realización del análisis de IL-6 mediante ELISA.

35 La metodología utilizada para las muestras de dextrano fue similar a la arriba descrita en el Ejemplo 1. El aislamiento y cultivo celular fueron similares, excepto que la densidad celular era de 400.000 células por pocillo y que la dilución de la muestra utilizada en el ELISA era de 1 a 10. El ELISA de IL-6 se diferenciaba en que se utilizaron placas revestidas con anticuerpos monoclonales Clone 16 (para la captura de IL-6) y un anticuerpo policlonal de oveja conjugado con peroxidasa de rábano picante como anticuerpo de detección. El ELISA se utilizó en el ensayo de sangre total/IL-6 (NIBSC) y el ensayo PBMC/IL-6 (Novartis), tal como se describe en el documento de Hoffmann y col., 2005.

45 La Figura 9 ilustra los resultados comparativos de la muestra de control negativo de Extraneal® y la muestra de control positivo de Extraneal®, y de la muestra de control negativo de dextrano y la muestra de control positivo de dextrano. Se puede observar que el ensayo de pirógenos de la invención permite diferenciar fácilmente entre estos controles positivos y negativos. El ensayo se llevó a cabo por cuadruplicado de acuerdo con el protocolo arriba descrito, con sangre de un solo donante. Los valores son promedios ± error estándar de la media de cuatro pocillos repetidos.

50 La Figura 10 ilustra resultados comparativos de la muestra de control negativo de Extraneal® y la muestra de control positivo de Extraneal®. Se puede observar que el ensayo de pirógenos de la invención permite diferenciar fácilmente entre estos controles positivos y negativos. El ensayo se llevó a cabo por cuadruplicado de acuerdo con el protocolo arriba descrito, con sangre de un solo donante. Los valores son promedios ± error estándar de la media de cuatro pocillos repetidos. Obsérvese que una baja densidad celular fue suficiente para diferenciar los controles positivos de Extraneal de los negativos cuando el reactivo que contiene monocitos era sangre total y se utilizaron pocillos de polipropileno de fondo redondo.

Ejemplo 4 - Ensayo de pirógenos de la invención: resultados comparativos entre placas de polipropileno y placas de poliestireno y entre IL-6 e IL-1 β en caso de un solo donante

Las muestras de ensayo se prepararon de acuerdo con el método del Ejemplo 1, excepto que se utilizaron densidades celulares de 1 millón de células por pocillo, algunas muestras se sometieron a lectura de IL-1 β , y algunas muestras se dispusieron en placas de microtitulación de poliestireno con pocillos de fondo plano. La Figura 11A muestra que las respuestas de IL-6 a controles positivos se distinguían claramente de los controles negativos en el caso de los ensayos realizados en placas de polipropileno, pero no se distinguían en el caso de los realizados en placas de poliestireno. Los valores son promedios \pm error estándar de la media de cuatro pocillos repetidos. La Figura 11B muestra que las respuestas de IL-1 β a controles positivos se distinguían claramente de los controles negativos en el caso de los ensayos realizados en placas de polipropileno, pero no se distinguían en el caso de los realizados en placas de poliestireno. Sin embargo, la magnitud de la respuesta en la Figura 11B fue mucho menor que la de la Figura 11A, lo que indica que la IL-1 β es una lectura pobre en comparación con la IL-6. Los valores son promedios \pm error estándar de la media de cuatro pocillos repetidos.

Ejemplo 5 - Ensayo de pirógenos de la invención: resultados comparativos entre placas de polipropileno y placas de poliestireno en caso de múltiples donantes

Las muestras de ensayo se prepararon de acuerdo con el método del Ejemplo 1, excepto que se utilizaron densidades celulares de 0,88 y 1 millón de células por pocillo, se emplearon tres donantes, algunas muestras se dispusieron en placas de microtitulación de poliestireno con pocillos de fondo plano, y las placas utilizadas para ELISA de IL-6 se revistieron con anticuerpo monoclonal Clone 16 y un anticuerpo policlonal de oveja conjugado con peroxidasa de rábano picante como anticuerpo de detección tal como se describe en el documento de Hoffmann y col., 2005. Las Figuras 12A y 12B ilustran la respuesta de IL-6 en caso de placas de microtitulación de polipropileno con pocillos de fondo redondo y placas de microtitulación de poliestireno con pocillos de fondo plano, con una densidad de células de PBMC de 0,88 millones de células por pocillo en el caso del donante A, respectivamente. En el caso del donante A, el ensayo de pirógenos no permitía distinguir entre controles positivos y negativos cuando se utilizaban placas de poliestireno, pero sí permitía distinguir entre estos controles cuando se utilizaban placas de polipropileno. Las Figuras 13A y 13B ilustran la respuesta de IL-6 en caso de placas de microtitulación de polipropileno con pocillos de fondo redondo y placas de microtitulación de poliestireno con pocillos de fondo plano, con una densidad de células de PBMC de 1 millón de células por pocillo en el caso del donante B, respectivamente. Aunque en el caso del donante B los dos ensayos de pirógenos permitían distinguir entre controles positivos y negativos, la respuesta de IL-6 para el control positivo era aproximadamente 6 veces mayor que la del control negativo cuando se utilizaban las placas de polipropileno, pero sólo aproximadamente 2 veces mayor que la del control negativo cuando se utilizaban placas de poliestireno. Las Figuras 14A y 14B ilustran la respuesta de IL-6 en caso de placas de microtitulación de polipropileno con pocillos de fondo redondo y placas de microtitulación de poliestireno con pocillos de fondo plano, con una densidad de células de PBMC de 0,88 millones de células por pocillo en el caso del donante C, respectivamente. Aunque en el caso del donante B los dos ensayos de pirógenos permitían distinguir entre controles positivos y negativos, la respuesta de IL-6 para el control positivo era aproximadamente dos veces mayor cuando se utilizaban las placas de polipropileno que cuando se utilizaban placas de poliestireno. Se ha de señalar que, en polipropileno, la respuesta al control positivo de Extraneal $\text{\textcircled{R}}$ sobrepasa la respuesta a la dosis más alta de estándar LPS, es decir, 0,4 EU/ml, mientras que, en poliestireno, la respuesta al control positivo de Extraneal $\text{\textcircled{R}}$ es menor que la respuesta a la dosis más baja de estándar LPS, es decir, 0,1 EU/ml.

Ejemplo 6 - Ensayo de pirógenos comparativo: IPT (Charles River Laboratories)

La metodología utilizada para la realización de este ensayo se describe en la hoja de instrucciones del Endosafe $\text{\textcircled{R}}$ -IPT InVitro Pyrogen Test (disponible comercialmente en Charles River Laboratories (PIIPT10002)) usando el procedimiento de ensayo para estimulación de sangre total mediante el empleo de IL-1 β y placas de microtitulación de poliestireno. La Figura 15 muestra que el ensayo IPT no permitió distinguir entre controles positivos y negativos de Extraneal $\text{\textcircled{R}}$ y hemoglobina, aunque el kit respondió a estándar LPS y a un control positivo de kit de ácido lipoteicoico de una bacteria Gram positiva.

Ejemplo 7 - Ensayo de pirógenos de la invención utilizando células criopreservadas

Una suspensión celular (por ejemplo 1 millón de PBMC o células monocíticas) en plasma y sulfóxido de dimetilo (o en sangre total y sulfóxido de dimetilo) se introduce en cada pocillo de una placa de polipropileno de 96 pocillos con pocillos de 250 μ l de fondo redondo, que después se sella y criopreserva.

El día del ensayo, la placa se descongela y se lleva a temperatura ambiente, se retira el sello y la pieza de inserción de 96 pocillos se empuja firmemente a su posición correspondiente. La pieza de inserción tiene paredes de polipropileno y un fondo plano que constituye una barrera para el paso de células pero no de líquidos.

El DMSO se elimina de las células por lavado rellenando la pieza de inserción con medio fresco y aspirando el medio arriba y abajo para mezclar las soluciones situadas encima y debajo de la barrera celular antes de aspirar y desechar la solución situada encima de la barrera celular. Repitiendo este paso de lavado 5 veces, las células quedan lavadas y esencialmente libres de DMSO y conservadas en un volumen conocido de medio fresco.

- 5 A la pieza de inserción se le añade muestra de ensayo o estándar y más medio fresco y, mediante la aspiración de esta solución arriba y abajo para mezclar las soluciones situadas encima y debajo de la barrera celular, se permite que el pirógeno de la muestra o el estándar (pirógeno) entre en contacto con las células.

- 10 La placa se incuba a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, en dióxido de carbono gas al 5% en aire humidificado durante 16-24 horas. Durante la incubación, las células se sedimentan, lo que permite que éstas entren en contacto entre sí, facilitando de este modo la liberación de IL-6 estimulada por pirógenos. Al final del período de incubación, las soluciones situadas encima y debajo de la barrera celular se mezclan a fondo aspirando arriba y abajo la solución situada encima de la barrera celular, antes de tomar una parte alícuota de medio acondicionado con células para analizar la IL-6.

- 15 Las PBMC criopreservadas resultan ventajosas porque pueden ser transportadas por todo el mundo en hielo seco. A diferencia del poliestireno, el polipropileno resiste el nitrógeno líquido sin agrietarse. Al llegar, las PBMC sólo deben ser descongeladas y separadas del DMSO mediante lavado para estar listas para el uso en un ensayo, junto con la pieza de inserción de placa suministrada. Mediante el transporte de las células en la cantidad óptima por pocillo y el uso de las células junto con la pieza de inserción de placa, se proporciona un kit de ensayo mejorado para el usuario final. Con un kit convencional, las células se transportan en un tubo y, una vez descongeladas, deben lavarse por centrifugación, lo que provoca una granulación de las células que permite que éstas se dispersen en el medio limpio.
- 20 Normalmente las células se lavan dos o tres veces de este modo. Después, las células deben ser contadas y resuspendidas en la densidad celular requerida antes de poder repartirlas en pocillos. El ensayo de pirógenos de la presente invención requiere menos trabajo, menos tiempo y es mucho menos traumático para las células que los ensayos convencionales, que pueden conducir a pérdidas de células, activación y muerte celular.

- 25 Cuando se presentan elementos de la presente invención o de la realización o realizaciones preferentes de la misma, los vocablos “un”, “una”, “el”, “la”, “dicho” y “dicha” significan que hay uno o más de estos elementos. Los conceptos “que comprende”, “que incluye” y “que tiene” son inclusivos y significan que puede haber elementos adicionales además de los elementos enumerados. Dado que se pueden realizar diversos cambios en los métodos y composiciones arriba indicados sin salirse del alcance de la invención, toda la materia incluida más arriba en la descripción ha de ser interpretada como ilustrativa y no en un sentido limitativo.

30 Aspectos de la invención

1. Un método para detectar pirógenos no endotoxínicos en una muestra, que incluye los pasos de:

- 35 combinar un reactivo que contiene monocitos y la muestra a ensayar en un primer sistema de ensayo que incluye al menos una superficie que incluye polipropileno, y el reactivo que contiene monocitos células mononucleares de sangre periférica o células de líneas celulares monocíticas está en contacto con dicha superficie y está presente en dicho sistema de ensayo en una alta densidad celular;

incubar el reactivo que contiene monocitos y la muestra, produciendo el reactivo que contiene monocitos una citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria;

transferir el contenido del primer sistema de ensayo a un segundo sistema de ensayo que comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria; y

- 40 analizar el segundo sistema de ensayo en cuanto a la presencia de citoquina o mediador endógeno unido al anticuerpo sobre la superficie; indicando un nivel elevado de citoquina o mediador endógeno unido a la superficie la presencia de pirógenos en la muestra analizada.

2. Un método para detectar pirógenos no endotoxínicos en un producto médico administrado por vía parenteral, que incluye los pasos de:

- 45 combinar un reactivo que contiene monocitos y el producto médico a ensayar en un primer sistema de ensayo que incluye al menos una superficie que comprende polipropileno, reactivo que contiene monocitos que comprende sangre total y está en contacto con dicha superficie;

incubar el reactivo que contiene monocitos y el producto médico, con lo que el reactivo que contiene monocitos produce IL-6;

- 50 transferir el contenido del primer sistema de ensayo a un segundo sistema de ensayo que comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para IL-6; y

analizar el segundo sistema de ensayo en cuanto a la presencia de IL-6 unida al anticuerpo sobre la superficie; indicando un nivel elevado de IL-6 unida a la superficie la presencia de pirógenos en el producto médico analizado.

3. Un método para detectar pirógenos no endotoxínicos en un producto médico administrado por vía parenteral, que incluye los pasos de:

- 5 combinar un reactivo que contiene monocitos y el producto médico a ensayar en un sistema de ensayo que incluye al menos una superficie que comprende polipropileno y al menos una superficie tratada con un anticuerpo para IL-6, reactivo que contiene monocitos que comprende sangre total y está en contacto con dicha superficie que comprende polipropileno; y

10 analizar el sistema de ensayo en cuanto a la presencia de IL-6 unida al anticuerpo sobre la superficie; indicando un nivel elevado de IL-6 unida a la superficie la presencia de pirógenos en el producto médico analizado.

4. Un método para cultivar células incluidas dentro de un reactivo que contiene monocitos para su uso en un ensayo de pirógenos no endotoxínicos, que incluye los pasos de:

- 15 combinar el reactivo que contiene monocitos y una muestra a ensayar en un sistema de ensayo que incluye al menos una superficie que comprende polipropileno, reactivo que contiene monocitos que comprende células mononucleares de sangre periférica o células de líneas celulares monocíticas, está en contacto con dicha superficie y está presente en dicho sistema de ensayo en una alta densidad celular.

20 5. Un método según el aspecto 4, en el que el sistema de ensayo comprende al menos una placa de microtitulación configurada de modo que el reactivo que contiene monocitos está concentrado en comparación con un pocillo de microtitulación de fondo plano, comprendiendo al menos una superficie de dicho pocillo polipropileno y estando presente el reactivo que contiene monocitos en dicho pocillo en una alta densidad celular.

6. Un método según el aspecto 1 o 2, en el que al menos el primer o el segundo sistema de ensayo incluye al menos una placa de microtitulación, y en el que la o las superficies consisten al menos en una parte del interior del pocillo de microtitulación.

25 7. Un método según el aspecto 3 o 4, en el que el sistema de ensayo incluye al menos un pocillo de microtitulación, y la o las superficies consisten al menos en una parte del interior del pocillo de microtitulación.

8. Un método según uno cualquiera de los aspectos 5-7, en el que el pocillo está configurado de modo que el reactivo que contiene monocitos está concentrado para proporcionar un mayor contacto entre célula y célula en comparación con un pocillo de microtitulación de fondo plano.

30 9. Un método según uno cualquiera de los aspectos 5-7 en el que el pocillo de microtitulación comprende una parte superior abierta, una zona superior que se extiende hacia abajo desde la parte superior abierta y una pared de fondo cuyo diámetro se va reduciendo desde un lugar situado por encima del punto más bajo hasta el punto más bajo.

35 10. Un método según uno cualquiera de los aspectos 5-7, en el que el pocillo de microtitulación comprende una parte superior abierta, una zona superior que se extiende hacia abajo desde la parte superior abierta y que presenta un extremo superior y un extremo inferior, y una zona inferior que presenta un extremo superior y el punto más bajo, extendiéndose la zona inferior desde el extremo inferior de la zona superior de modo que su diámetro se reduce más rápidamente que en la zona superior desde el extremo superior de la zona inferior hacia el punto más bajo.

11. Un método según el aspecto 9, en el que la pared de fondo de dicho pocillo de microtitulación no es plana, es curvada, parabólica o se extiende hacia abajo.

40 12. Un método según uno cualquiera de los aspectos 5-7, en el que los lados de dicho pocillo de microtitulación están inclinados hacia adentro.

13. Un método según el aspecto 5, en el que el sistema de ensayo comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citoquina y la superficie sobre la que se aplica el anticuerpo consiste al menos en una parte del interior de dicho pocillo de microtitulación.

45 14. Un método según el aspecto 13, en el que el anticuerpo es un anticuerpo para un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria.

15. Un método según el aspecto 14, en el que el mediador endógeno es endotelina.

16. Un método según el aspecto 5, que adicionalmente comprende el paso de analizar el sistema de ensayo en cuanto a la presencia de citoquina o mediador endógeno unido al anticuerpo sobre la superficie, indicando un nivel elevado de citoquina o mediador endógeno unido a la superficie la presencia de pirógenos en la muestra analizada.
- 5 17. Un método según uno cualquiera de los aspectos 1, 13 o 16, en el que la citoquina se selecciona de entre el grupo consistente en interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-1 ra (IL-1 ra), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8) y factor de necrosis tumoral α (TNF α).
18. Un método según el aspecto 17, en el que la citoquina es IL-6.
19. Un método según uno cualquiera de los aspectos 1-18, en el que el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
20. Un método según uno cualquiera de los aspectos 1-18, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 10 21. Un método según uno cualquiera de los aspectos 1-20, en el que el sistema o los sistemas de análisis consisten en un ensayo colorimétrico de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un inmunoensayo radiomarcado o un inmunoensayo marcado con fluorescencia.
22. Un método según uno cualquiera de los aspectos 1 o 4-21, en el que la línea celular monocítica es una línea celular monocítica humana.
- 15 23. Un método según el aspecto 22, en el que la línea celular monocítica es MONOMAC-6, THP-1 o 28SC.
24. Un método según uno cualquiera de los aspectos 1 y 4-21, en el que la línea celular monocítica es una línea celular que tiene receptores CD14 y/o tipo Toll (TLR) endógenos o que ha sido transfectada con receptores CD14 y/o tipo Toll y/o genes indicadores para mediadores inflamatorios o pirogénicos.
- 20 25. Un método según uno cualquiera de los aspectos 1 y 4-24, en el que la muestra es un producto médico de administración parenteral.
26. Un método según uno cualquiera de los aspectos 2, 3 y 25, en el que el producto médico de administración parenteral se selecciona entre el grupo consistente en un producto sanguíneo, solución de diálisis, vacuna y expansor de plasma.
- 25 27. Un método según uno cualquiera de los aspectos 1 y 4-26, en el que el reactivo que contiene monocitos está presente en dicho sistema de ensayo en una densidad celular de al menos aproximadamente 250.000, 500.000, 600.000, 700.000, 800.000, 900.000, 1.000.000, 1.100.000, 1.200.000, 1.300.000, 1.400.000, 1.500.000, 1.600.000, 1.700.000, 1.800.000, 1.900.000 o 2.000.000 células por pocillo.
28. Un método según uno cualquiera de los aspectos 1 y 4-27, en el que las células mononucleares de sangre periférica son células mononucleares de sangre periférica humana.
- 30 29. Un método según uno cualquiera de los aspectos 2, 3, 6-12, 19-21 y 26, en el que el reactivo que contiene monocitos comprende adicionalmente un diluyente.
30. Un método según la reivindicación 29, en el que el diluyente es medio RPMI.
31. Un método según uno cualquiera de los aspectos 2, 3, 6-12, 19-21, 26, 29 y 30, en el que el reactivo que contiene monocitos comprende adicionalmente un anticoagulante.
- 35 32. Un método según uno cualquiera de los aspectos 2, 3, 6-12, 19-21, 26 y 29-31, en el que la sangre total es sangre total humana.
33. Un método según uno cualquiera de los aspectos 2, 3, 6-12, 19-21, 26 y 29-31, en el que el reactivo que contiene monocitos está presente en dicho sistema de ensayo en una densidad celular mayor de aproximadamente 100.000, 200.000, 210.000, 220.000, 230.000, 240.000, 250.000, 260.000, 270.000, 280.000, 290.000, 300.000, 310.000, 320.000, 330.000, 340.000, 350.000, 360.000, 370.000, 380.000, 390.000 o 400.000 células mononucleares de sangre periférica por pocillo.
- 40 34. Un Kit de diagnóstico que comprende:
- 45 una placa de microtitulación que comprende múltiples pocillos de microtitulación configurados de modo que las células contenidas en cada pocillo están concentradas en comparación con un pocillo de microtitulación de fondo plano, comprendiendo una superficie de dicho pocillo polipropileno; y

un reactivo que contiene monocitos criopreservados contenido en los pocillos de dicha placa, reactivo que contiene monocitos que comprende células mononucleares de sangre periférica criopreservadas o células de líneas celulares monocíticas criopreservadas, que está en contacto con las superficies de dichos pocillos y que está presente en dicho pocillo en una alta densidad celular.

5 35. Un Kit de diagnóstico que comprende:

un sistema de ensayo para detectar pirógenos no endotoxínicos en un producto médico de administración vía parenteral, comprendiendo dicho sistema de ensayo una placa de microtitulación que comprende múltiples pocillos de microtitulación configurados de modo que las células contenidas en cada pocillo están concentradas en comparación con un pocillo de microtitulación de fondo plano, comprendiendo una superficie de dicho pocillo polipropileno;

10

un reactivo que contiene monocitos criopreservados contenido en los pocillos de dicha placa, reactivo que contiene monocitos que comprende sangre total criopreservada y está en contacto con las superficies de dichos pocillos; y un anticuerpo para IL-6.

15 36. Un Kit según el aspecto 34 o 35, en el que dicho pocillo comprende además una barrera que es impermeable a monocitos.

37. Un Kit según el aspecto 36, en el que dicha barrera comprende una membrana, una rejilla, un tamiz o una criba.

REIVINDICACIONES

1. Ensayo de pirógenos *in vitro* que comprende los pasos de:
 - 5 a) combinar un reactivo que contiene monocitos y una muestra a ensayar en un primer sistema de ensayo que incluye una placa de microtitulación que comprende múltiples pocillos de microtitulación configurados de modo que el reactivo que contiene monocitos está concentrado, para proporcionar un mayor contacto entre célula y célula en comparación con un pocillo de microtitulación de fondo plano, comprendiendo cada pocillo de microtitulación una pared de fondo no plana, sino curva, parabólica o que se extiende hacia abajo, y comprendiendo la superficie de cada pocillo de microtitulación un revestimiento de polipropileno o estando compuesto todo el pocillo de microtitulación por polipropileno;
 - 10 b) incubar el reactivo que contiene monocitos y la muestra donde, cuando la muestra incluye un pirógeno, el reactivo que contiene monocitos produce una citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria;
 - 15 c) transferir el contenido del primer sistema de ensayo a un segundo sistema de ensayo que comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para la citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria; y
 - d) analizar el segundo sistema de ensayo en cuanto a la presencia de citoquina o mediador endógeno unido al anticuerpo sobre la superficie, indicando un nivel elevado de la citoquina o mediador endógeno unido a la superficie la presencia de pirógenos en la muestra ensayada.

2. Ensayo de pirógenos *in vitro*, que comprende los pasos de:
 - 20 (a) combinar un reactivo que contiene monocitos y una muestra a ensayar en un primer sistema de ensayo que incluye (i) una placa de microtitulación que comprende múltiples pocillos de microtitulación configurados de modo que el reactivo que contiene monocitos está concentrado para proporcionar un mayor contacto entre célula y célula en comparación con un pocillo de microtitulación de fondo plano, comprendiendo cada pocillo de microtitulación una pared de fondo que no plana, sino curva, parabólica o que se extiende hacia abajo, y comprendiendo la superficie de cada pocillo de microtitulación un revestimiento de polipropileno o estando compuesto todo el pocillo de microtitulación por polipropileno, donde, cuando la muestra incluye un pirógeno, el reactivo que contiene monocitos produce una citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria, y (ii) al menos una superficie tratada con un anticuerpo para la citoquina o mediador endógeno de la respuesta inflamatoria;
 - 25 (b) incubar el reactivo que contiene monocitos y la muestra; y
 - 30 (c) analizar el sistema de ensayo en cuanto a la presencia de citoquina o mediador endógeno unido al anticuerpo sobre la superficie, indicando un nivel elevado de la citoquina o mediador endógeno unido a la superficie la presencia de pirógenos en la muestra ensayada.

3. Ensayo de pirógenos *in vitro* según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la muestra es un producto farmacéutico, un nutriente o un producto médico.

4. Ensayo de pirógenos *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la citoquina o el mediador endógeno de la respuesta inflamatoria es una citoquina proinflamatoria o una citoquina Th1.

5. Ensayo de pirógenos *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la citoquina o el mediador endógeno de la respuesta inflamatoria es IL-2, IFN, IL-1, IL-1ra, IL-6, IL-8, TNF- α o endotelina.

6. Ensayo de pirógenos *in vitro* según la reivindicación 1, caracterizado porque los lados de dicho pocillo de microtitulación están inclinados hacia adentro.

7. Ensayo de pirógenos *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el reactivo que contiene monocitos comprende células mononucleares de sangre periférica o células de líneas celulares monocíticas, opcionalmente, comprendiendo la línea celular monocítica una línea celular monocítica humana seleccionada de entre el grupo consistente en: MONOMAC-6, THP-1, 28SC, y una línea celular que tiene receptores CD14 y/o tipo Toll endógenos o que ha sido transfectada con receptores CD14 y/o tipo Toll y/o genes indicadores para mediadores inflamatorios o pirogénicos.

8. Ensayo de pirógenos *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el reactivo que contiene monocitos comprende una cantidad de células suficiente para proporcionar al menos o aproximadamente 125.000 células por pocillo del primer sistema de ensayo.

- 5
10
15
9. Kit de diagnóstico para su uso en el ensayo de pirógenos *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende (i) un sistema de ensayo que incluye una placa de microtitulación que comprende múltiples pocillos de microtitulación, estando configurado cada pocillo de modo que cuando un reactivo que contiene monocitos está presente en los pocillos de microtitulación, el reactivo que contiene monocitos está concentrado para proporcionar un mayor contacto entre célula y célula en comparación con un pocillo de fondo plano, comprendiendo cada pocillo de microtitulación una pared de fondo no plana, sino curva, parabólica o que se extiende hacia abajo, y comprendiendo la superficie de cada pocillo un revestimiento de polipropileno o estando compuesto todo el pocillo de microtitulación por polipropileno, y (ii) un reactivo que contiene monocitos criopreservados que comprende sangre total criopreservada, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) criopreservadas, o células de líneas celulares monocíticas criopreservadas; donde o bien el sistema de ensayo comprende adicionalmente una superficie tratada con un anticuerpo para una citoquina o un mediador endógeno de una respuesta inflamatoria, o bien el kit comprende un segundo sistema de ensayo que incluye al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citoquina o un mediador endógeno de una respuesta inflamatoria, consistiendo la citoquina o el mediador endógeno en una citoquina o un mediador endógeno producidos por el reactivo que contiene monocitos.
- 20
10. Kit de diagnóstico según la reivindicación 9, caracterizado porque la citoquina o el mediador endógeno de una respuesta inflamatoria es IL-2, IFN, IL-1, IL-1 ra, IL-6, IL-8, TNF- α o endotelina.
- 25
11. Kit de diagnóstico según la reivindicación 9, caracterizado porque cada pocillo de microtitulación de la placa de microtitulación comprende monocitos criopreservados, opcionalmente en la cantidad óptima de células por pocillo.
12. Kit de diagnóstico según la reivindicación 9, caracterizado porque las células mononucleares de sangre periférica criopreservadas o las células de líneas celulares monocíticas criopreservadas están presentes en un pocillo de la placa de microtitulación en una densidad celular de al menos aproximadamente 250.000 células por pocillo.
13. Kit de diagnóstico según la reivindicación 9, caracterizado porque la sangre total criopreservada está presente en un pocillo de la placa de microtitulación en una densidad celular de al menos aproximadamente 100.000 PBMC por pocillo.

FIG. 1

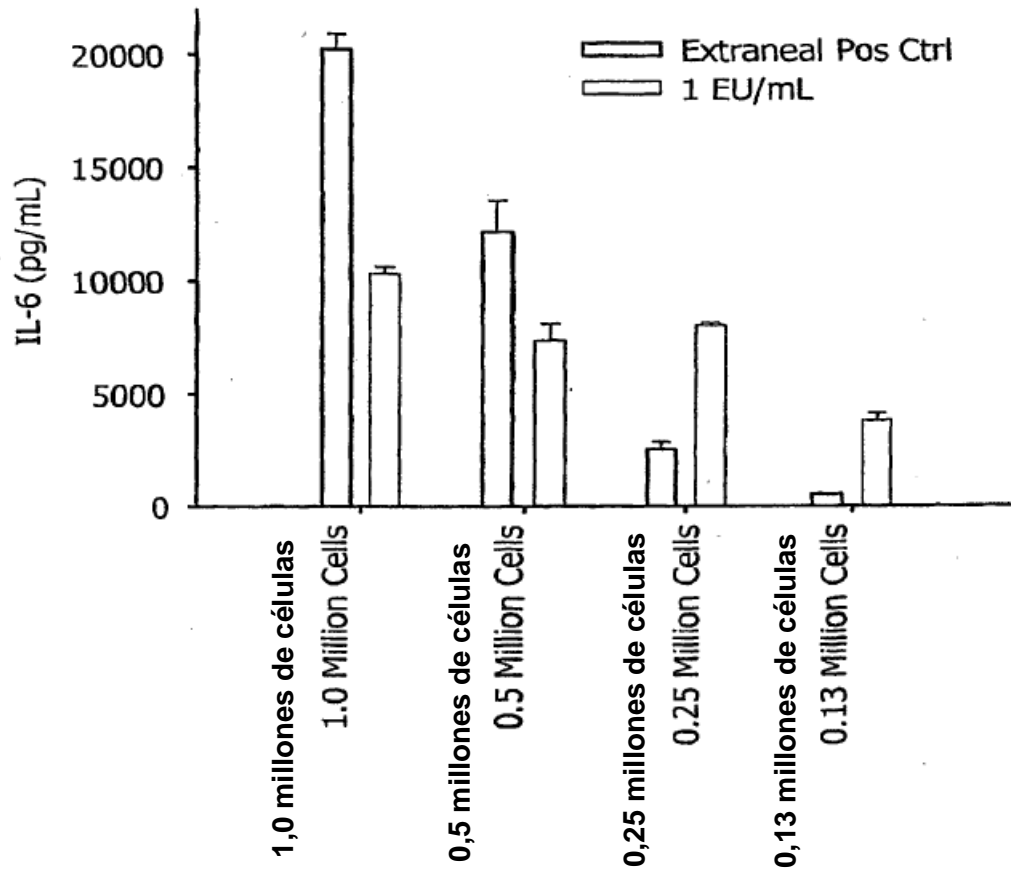


FIG. 2

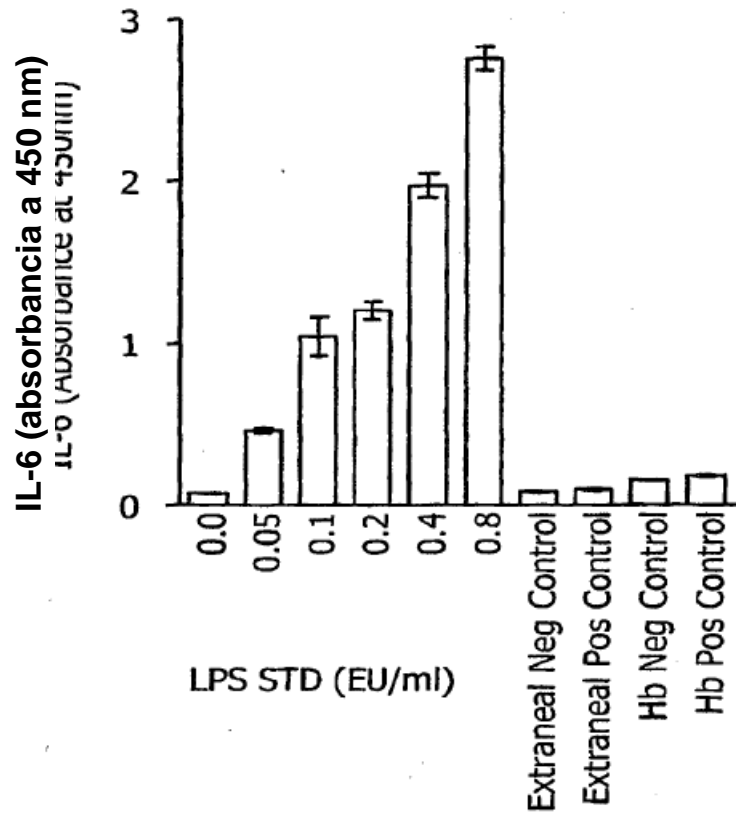


FIG. 3

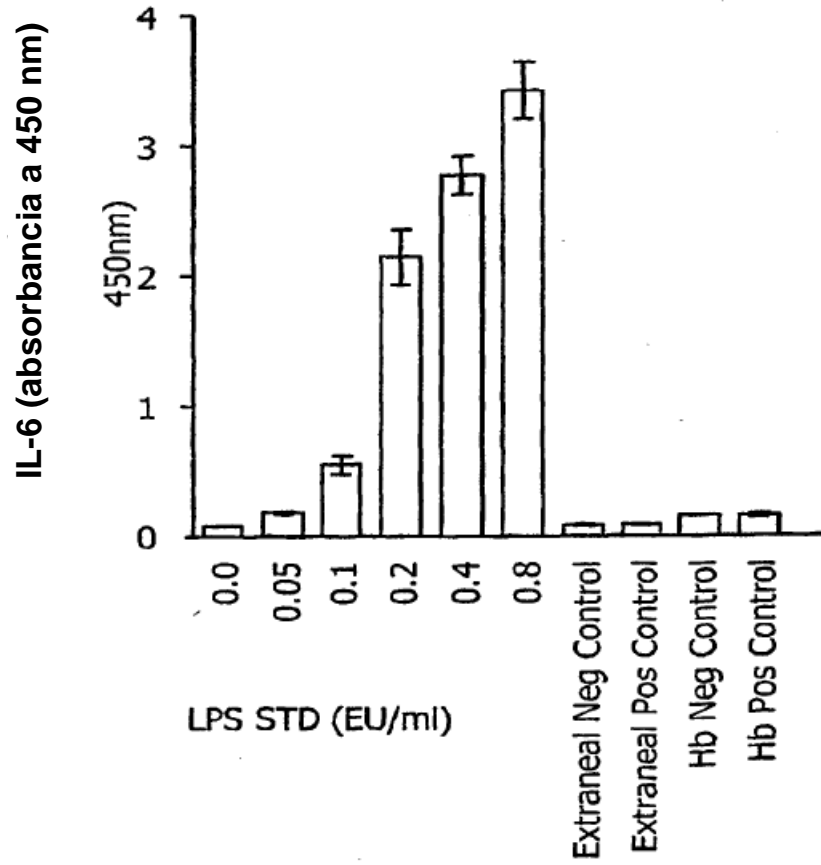


FIG. 4

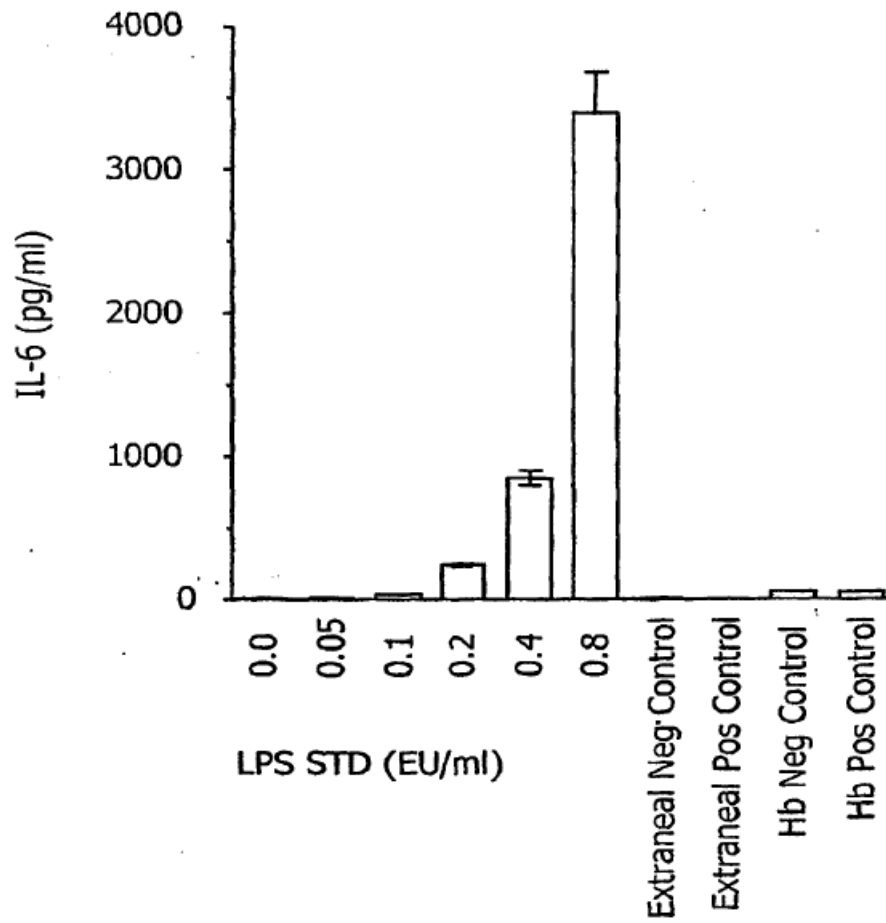


FIG. 5

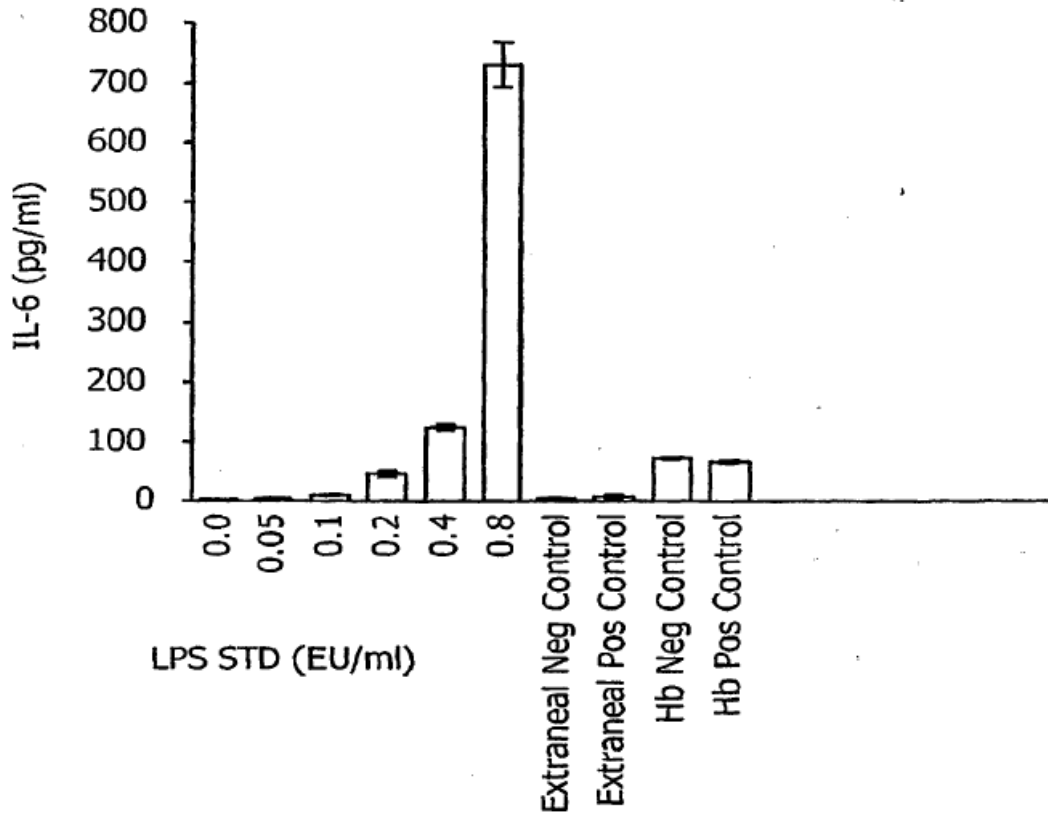


FIG. 6

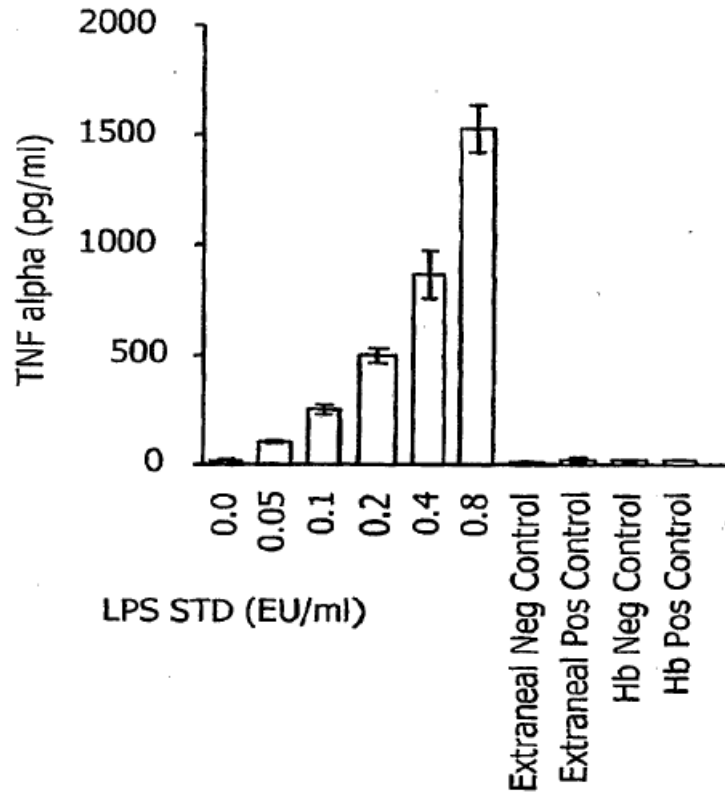


FIG. 7

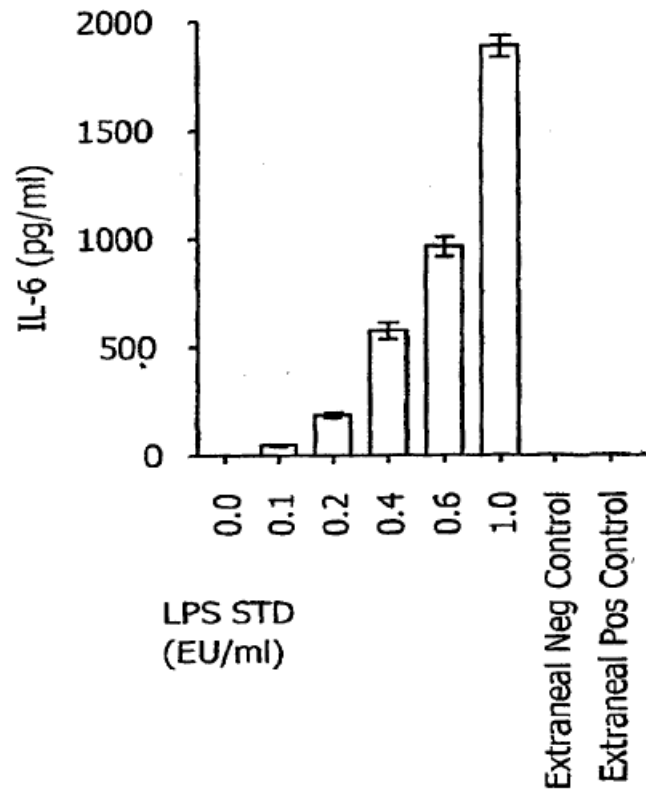


FIG. 8

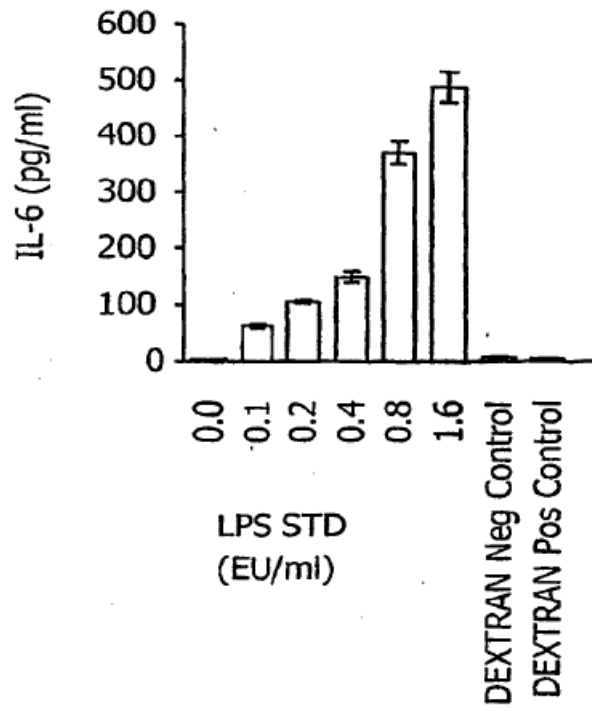


FIG. 9

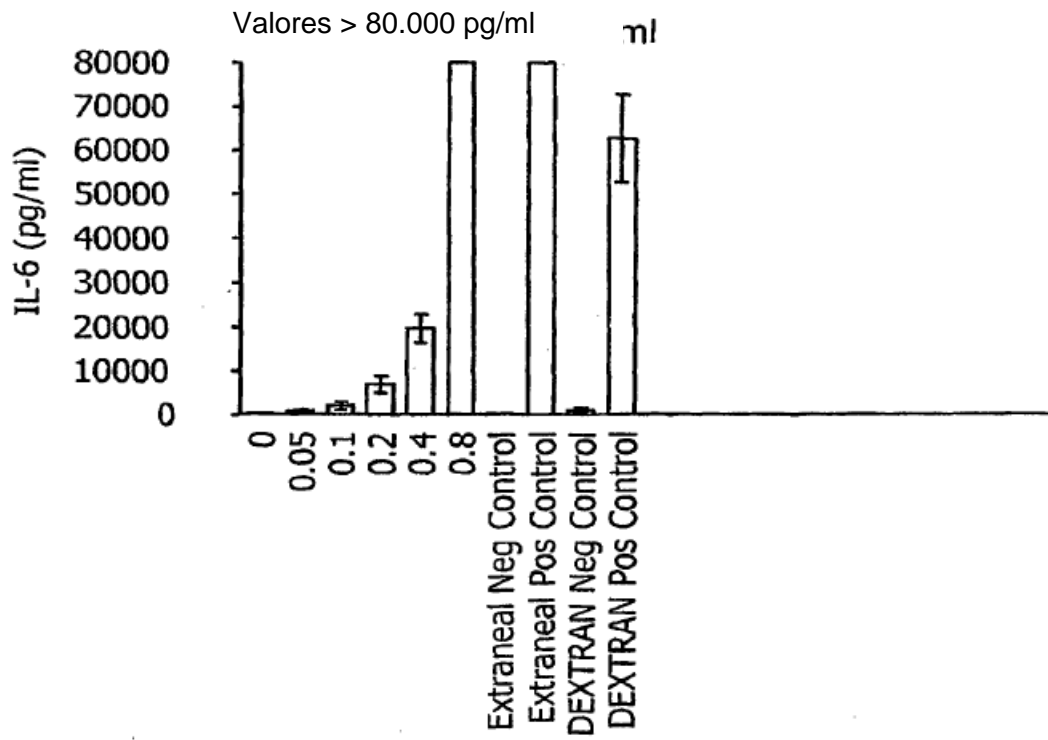


FIG. 10

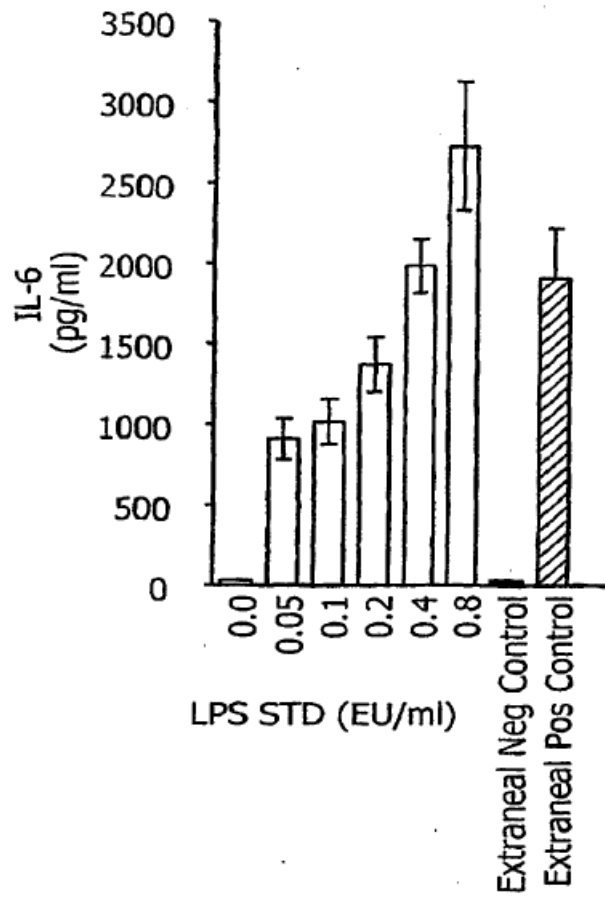
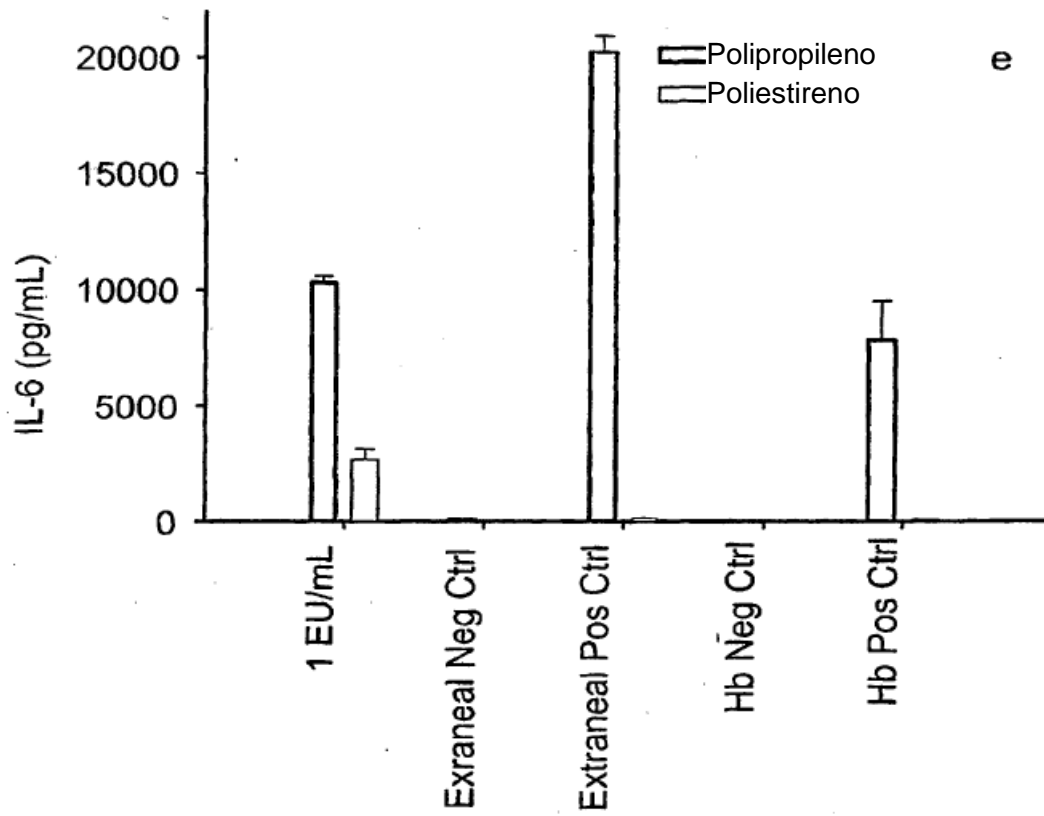


FIG. 11A



e

FIG. 11B

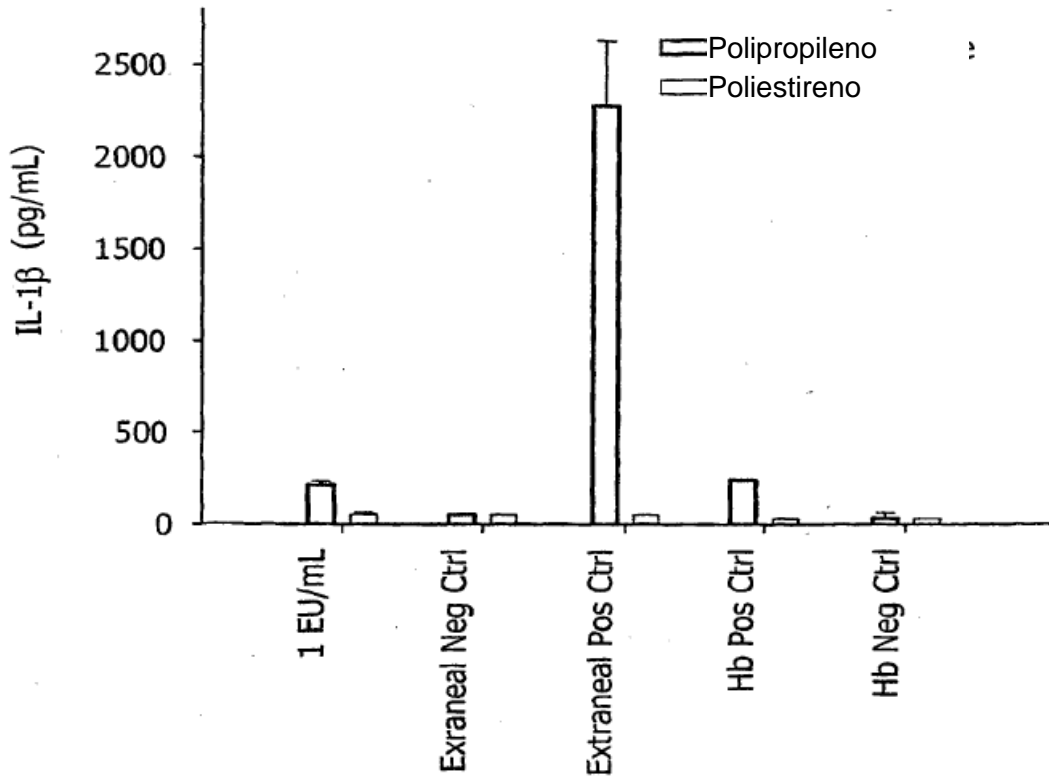


FIG. 12A

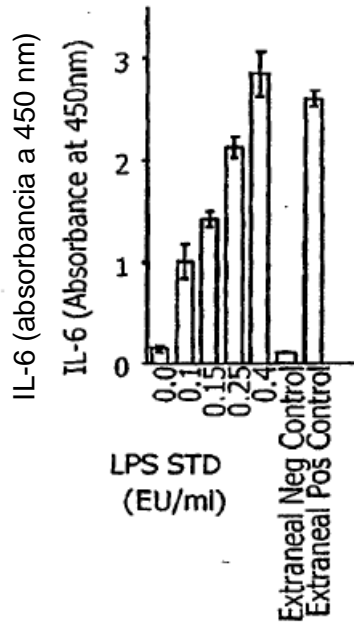


FIG. 12B

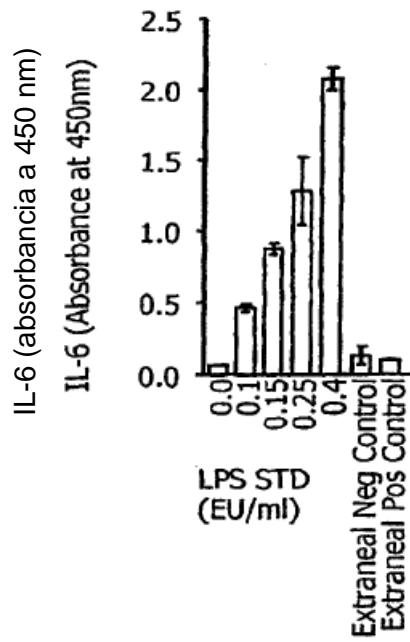


FIG. 13A

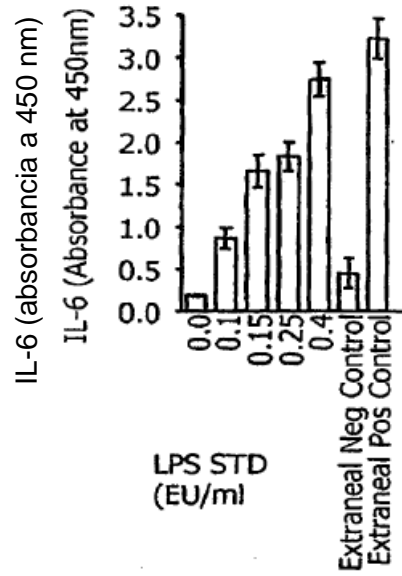


FIG. 13B

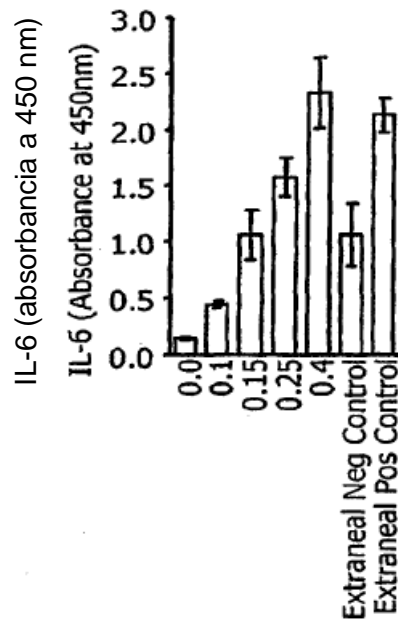


FIG. 14A

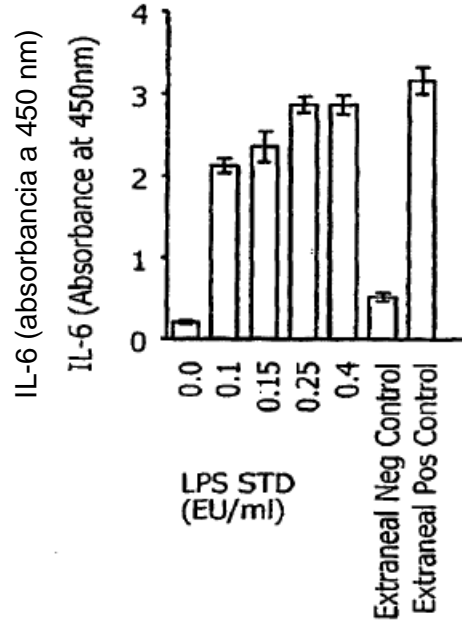


FIG. 14B

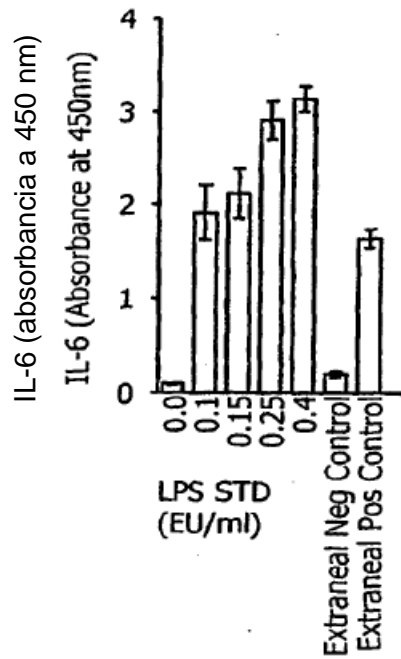


FIG. 15

