

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 956**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2009 E 09700218 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2238447**

54 Título: **Dispositivos y métodos para modelar el sistema inmune**

30 Prioridad:

10.01.2008 US 20310 P

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

19.05.2015

73 Titular/es:

**L'OREAL, S.A. (100.0%)
14 rue Royale
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**YARMUSH, MARTIN, L.;
FREEDMAN, ROBERT;
DEL BUFALO, AURELIA;
TEISSIER, SILVIA y
MEUNIER, JEAN-ROCH**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 535 956 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

Dispositivos y métodos para modelar el sistema inmune

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N°: 61/020.310, presentada el 20 de enero de 2008.

Antecedentes de la invención

10 En un aspecto, el sistema inmune de un organismo sirve para protegerlo de infecciones, generalmente mediante un sistema inmune innato y un sistema inmune adaptativo. A un nivel sencillo, el organismo se basa en barreras físicas para evitar que los patógenos, tales como bacterias y virus, entren en ellos. En caso de que un patógeno traspase estas barreras, el sistema inmune innato está preparado para proporcionar una respuesta inmediata, pero inespecífica. A un nivel más complejo, cuando los patógenos eluden la respuesta innata, algunos animales están equipados con un tercer elemento, el sistema inmune adaptativo.

15 Varios tipos de barrera protegen a los organismos de las infecciones, incluyendo barreras mecánicas, químicas y biológicas. La piel de un animal es un ejemplo de una barrera biológica en la primera línea de exposición a agentes ambientales que se puede encontrar un organismo. Se ha usado el reemplazo de piel compuesta usando queratinocitos autólogos cultivados en dermis alogénica acelular como sustituto de la piel de manera prometedora para pacientes víctimas de quemaduras (Robert L. Sheridan et al., Burns 2000. 27: 421-424).

20 La fagocitosis es una característica importante de la inmunidad celular innata. Las células clasificadas como fagocitos son capaces de tragarse, o consumir, agentes, patógenos o partículas. Los fagocitos patrullan de manera rutinaria el cuerpo del animal, por ejemplo, en la piel, en búsqueda de patógenos.

25 Las células dendríticas (CD) son fagocitos que se encuentran asociados con los tejidos de un animal expuesto al ambiente. Las células dendríticas pueden encontrarse, por ejemplo, en la piel, córneas, nariz, pulmones, tracto gastrointestinal y tracto genitourinario. Las células dendríticas se conocen como potentes células de presentación de antígenos implicadas en la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T. Un tipo de célula dendrítica importante son las células de Langerhans. En los últimos años se han desarrollado sistemas de cultivo cerrados sin suero para establecer y mantener células dendríticas (Christina M. Celluzzi y Craig Welbon, 2003. Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research., 12(5): 575-585).

30 La hipersensibilidad es un tipo de respuesta inmune que causa daño a los tejidos propios del animal. (Ghaffar, Abdul (2006). Immunology - Capítulo diecisiete: Hypersensitivity Reactions. Microbiology and Immunology OnLine Textbook. USC School of Medicine; disponible en <http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/hyper00.htm>; Visitado por última vez el 1-10-08). Las reacciones de hipersensibilidad se dividen en cuatro clases citadas como de Tipo I - IV, (anteriormente citado). La hipersensibilidad de Tipo I implica una reacción inmediata o anafiláctica, normalmente asociada con alergias y está mediada por IgE liberadas de mastocitos y basófilos, (anteriormente citado). La hipersensibilidad de Tipo II o hipersensibilidad dependiente de anticuerpos (o citotóxica) está mediada por anticuerpos de tipo IgG e IgM, (anteriormente citado). Las reacciones de hipersensibilidad de Tipo III pueden activarse mediante complejos inmunes (incluyendo agregaciones de antígenos, proteínas de complemento, y anticuerpos de tipo IgG e IgM) depositados en varios tejidos, (anteriormente citado). La hipersensibilidad de Tipo IV se cita como hipersensibilidad mediada por células o de tipo retardado y está implicada en muchas enfermedades autoinmunes e infecciosas, pero también puede implicar dermatitis de contacto (por ejemplo, hiedra venenosa), (anteriormente citado). Las reacciones de hipersensibilidad están mediadas, por ejemplo, por linfocitos T, monocitos, y fagocitos (incluyendo células dendríticas y macrófagos).

35 El conocimiento de la interacción de agentes ambientales, el sistema inmune y la hipersensibilidad de un organismo es relevante tanto médica como comercialmente.

40 Matsubara et al., "Application of on-chip cell cultures for the detection of allergic response", Biosensors and Bioelectronics (2004) vol. 19, páginas 741-747 divulgan la descripción de una placa de celdillas de microfluidos para controlar respuestas alérgicas. Las celdillas se fabricaron mediante métodos convencionales de moldeo sobre una microplaca de poli(dimetilsiloxano) (PDMS), cuya superficie se modificó mediante varios métodos. Las celdillas comprendían una sola cámara de cultivos celulares y canales de microfluidos.

45 El documento WO 2007/021343 divulga sistemas y métodos para farmacocinética a escala microscópica. Los sistemas divulgados tienen compartimentos a escala microscópica que pueden interconectarse mediante canales a escala microscópica. Las células o los materiales celulares asociados con los órganos pueden cultivarse en dichos compartimentos para permitir interacciones con fármacos en uno o más flujos de fluidos.

Resumen

5 Se divulga un dispositivo de modelado inmune que comprende: un componente de barrera configurado para cultivar una barrera biológica; un componente inmune configurado para cultivar células inmunes; y una o más conexiones de microfluidos inter-componente entre el componente de barrera y el componente inmune. El componente de barrera del dispositivo de modelado inmune puede comprender además una matriz configurada para soportar el crecimiento celular.

10 En una realización, el dispositivo de modelado inmune comprende además un componente de observación óptica configurado para visualizar las células dentro del dispositivo. La observación de las células puede incluir el movimiento celular o la proliferación de linfocitos T o una combinación de ambas. El movimiento celular puede ser el movimiento de células inmunes, tales como células dendríticas, de un compartimento a otro compartimento. El componente de observación óptica puede estar localizado en ambos compartimentos o en las conexiones de microfluidos inter-componente.

15 En una realización, el dispositivo comprende múltiples módulos inmunes multicanal junto con canales de microfluidos de interconexión para una exploración de alto rendimiento.

20 Otro aspecto de la divulgación incluye un método para detectar una reacción inmune a un antígeno de prueba que comprende: proporcionar un sistema de modelado inmune que comprende un componente de barrera configurado para cultivar una barrera biológica, un componente inmune configurado para cultivar células inmunes, y una o más conexiones de microfluidos inter-componente entre el componente de barrera y el componente inmune; cultivar una barrera biológica en el componente de barrera del sistema; cultivar células inmunes en el componente inmune del sistema; aplicar el agente de ensayo a la barrera biológica; y controlar a las células inmunes para detectar una
25 reacción inmune al agente de ensayo.

30 Una barrera biológica para su uso en el dispositivo y método puede seleccionarse del grupo que consiste en piel, córneas, revestimiento de los pulmones, revestimiento del tracto gastrointestinal, revestimiento del tracto genitourinario y piel artificial. En una realización, una barrera biológica es piel artificial que comprende queratinocitos cultivados. Una barrera biológica también puede contener además una capa dérmica. En una realización, una reacción inmune detectada es hipersensibilidad de contacto de tipo retardado.

35 Las células inmunes pueden ser cualquier célula inmune, tales como linfocitos T y células dendríticas o células inmunes de los nódulos linfáticos. En una realización, las células inmunes comprenden linfocitos T y la barrera biológica comprende piel artificial y además comprende células dendríticas. En otra realización, las únicas células incluidas en el componente inmune comprenden linfocitos T y durante la evaluación las células dendríticas pueden migrar al componente inmune como indicación de hipersensibilidad en respuesta al agente de ensayo.

40 El dispositivo puede utilizarse para evaluar la capacidad de los agentes de ensayo para causar una reacción inmune o de hipersensibilidad. Algunos de los agentes de ensayo que se pueden ensayar incluyen un fármaco, un cosmético, un nutracéutico, un químico sintético, una fragancia, lubricante, jabón, champú, producto para el cabello, loción o aceite de protección solar.

45 El control de las células inmunes puede comprender controlar la proliferación de los linfocitos T. En otra realización, el control de las células inmunes comprende controlar la migración de las células dendríticas. Pueden utilizarse una o más ventanas de observación óptica en una realización para controlar la velocidad o cantidad de células y/o la velocidad o cantidad de proliferación de linfocitos T. Pueden usarse otros medios para controlar la migración de células dendríticas y/o la proliferación de linfocitos T.

50 **Breve descripción de los dibujos**

Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas descritas en el presente documento en referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la
55 invención, y los dibujos adjuntos de los que:

- La Figura 1 es un esquema de una realización del sistema de modelado inmune.
- La Figura 2 es una vista en perspectiva de una realización del sistema de modelado inmune.
- La Figura 3 es una vista en perspectiva del componente de barrera de un sistema de modelado inmune.
- 60 La Figura 4 es una vista en perspectiva del componente de barrera de un sistema de modelado inmune que incluye células inmunes y un gradiente.
- La Figura 5 es una vista en perspectiva del componente inmune de un sistema de modelado inmune que incluye células inmunes.
- La Figura 6 es una vista en sección transversal de una realización del sistema de modelado inmune.
- 65 La Figura 7 es una vista en perspectiva de una realización integrada del sistema de modelado inmune que incluye una bomba, un controlador y un reservorio.

La Figura 8 es un diagrama de bloques que muestra un dispositivo lógico de ejemplo representativo en comunicación con un aparato para su uso con el sistema de detección de exploración de la invención.

La Figura 9 es un diagrama de bloques que muestra un ejemplo representativo de un kit.

5 Descripción detallada de la invención

Los sistemas y métodos descritos en el presente documento se refieren a modelar la función inmune en barreras biológicas. Las barreras biológicas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, la piel, córneas, revestimiento de los pulmones, revestimiento del tracto gastrointestinal, y revestimiento del tracto genitourinario de animales y seres humanos.

Antes de describir en más detalle los sistemas y métodos, debe entenderse que estos sistemas y métodos no están limitados a la metodología, dispositivos, soluciones o aparatos concretos descritos, ya que dichos métodos, dispositivos, soluciones o aparatos pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento solo tiene el fin de describir realizaciones particulares.

El uso de las formas del singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

En los casos donde se cita un intervalo de valores, debe entenderse que cada valor entero intermedio, y cada fracción de los mismos, entre los límites superior e inferior citados de ese intervalo también están divulgados de manera específica, junto con cualquier subintervalo entre dichos valores. Los límites superior e inferior de cualquier intervalo pueden incluirse o excluirse independientemente del intervalo, y también está abarcado cualquier intervalo donde cualquiera, ninguno o ambos límites están incluidos. En los casos donde el valor que se esté discutiendo tiene límites inherentes, por ejemplo, en los casos donde un componente puede estar a una concentración de desde 0 hasta el 100 %, o en los casos donde el pH de una solución acuosa puede estar en el intervalo de 1 a 14, estos límites inherentes también están divulgados de manera específica. En los casos donde se cita un valor de manera explícita, debe entenderse que los valores que son aproximadamente la misma cuantía o cantidad que el valor citado también se encuentran dentro del alcance de la invención, al igual que los intervalos basados en estos. En los casos donde se divulga una combinación, cada subcombinación de los elementos de esa combinación está también divulgada de manera específica. Por el contrario, en los casos donde se divulgan elementos diferentes de grupos de elementos, también se divulgan combinaciones de los mismos. En los casos donde se divulga que cualquier elemento tiene varias alternativas, también se divulgan mediante el presente documento ejemplos en los que cada alternativa está excluida individual o en cualquier combinación con las otras alternativas; más de un elemento puede tener dichas exclusiones, y todas las combinaciones de elementos que tienen dichas exclusiones están divulgadas mediante el presente documento.

A menos que se defina lo contrario o el contexto indique claramente lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto habitual en la materia. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento en la puesta en práctica o ensayo de la invención, se describen los métodos y materiales preferidos a continuación.

Los dispositivos y métodos divulgados en el presente documento son útiles, por ejemplo, para su uso en el descubrimiento o desarrollo de fármacos y para pruebas de productos de consumo o industriales incluyendo pruebas subrogadas *in vivo*.

En respuesta a la Directiva 76/768/CEE del Consejo Europeo (que prohíbe las pruebas de cosméticos en animales y la comercialización de dichos productos, cuando hay disponibles alternativas a las pruebas en animales, y que prohíbe completamente las pruebas de cosméticos en animales para 2009 y para 2013 para tres categorías específicas), la necesidad de formas rigurosas y predictivas de pruebas *in vitro* de cosméticos ha alcanzado un nuevo nivel de urgencia. En el presente documento se describe una alternativa fiable para el ensayo de nódulo linfático local de ratón ("LLNA"). En el LLNA de ratón, después de la exposición a una sustancia de ensayo sensibilizante, sucede la proliferación de linfocitos en el nódulo linfático local. El LLNA mide la proliferación aumentada de linfocitos en los nódulos linfáticos auriculares (que drenan las orejas, el sitio de exposición). La proliferación puede evaluarse usando LLNA midiendo la incorporación de [3H] timidina en el ADN de las células del nódulo linfático. Como alternativa, la proliferación puede evaluarse midiendo la incorporación del análogo de timidina, bromodesoxiuridina (BrdU) en el ADN de las células del nódulo linfático (usando métodos de citometría de flujo).

60 Modelado de sistema inmune integrado:

La Figura 1 es una ilustración de un aspecto del sistema de modelado inmune divulgado en el presente documento. Tal como se muestra, el sistema de modelado inmune 100 puede incluir un componente de barrera 102, en comunicación fluida con un componente inmune 104 mediante microfluidos intercomponente 106. Aunque solo se ilustran un componente de barrera 102 y un componente inmune 104, está previsto que pueda disponerse una pluralidad de cada componente en comunicación fluida. De manera similar, aunque se ilustran tres microfluidos inter-compartmento 106,

está previsto que puedan emplearse uno o una pluralidad de microfluidos inter-compartimento para proporcionar una comunicación fluida. Como tales, está previsto que son posibles disposiciones paralelas o masivamente paralelas de componentes de barrera de comunicación fluida 102 y de componentes inmunes 104 (no mostrado).

5 Como además se muestra en la Figura 1, se proporcionan microfluidos 112 para la comunicación fluida con el componente de barrera 102 y el componente inmune 104 a través de un reservorio 110 (por ejemplo, para el medio) y una bomba/controlador 108 (por ejemplo, para proporcionar y controlar flujo de fluido, incluyendo la recirculación del fluido en el sistema 100). Está previsto que el sistema 100 pueda incluir una pluralidad de características de bomba/controlador 108 y una pluralidad de características de reservorio 110 según se desee. Además, el sistema
10 puede incluir una o más válvulas en los microfluidos o microfluidos inter-compartimento según sea necesario para controlar el flujo de fluido (no mostrado).

En un aspecto, se proporcionan un dispositivo de hipersensibilidad de contacto de tipo retardado *in vitro* y métodos de uso del mismo. En una realización particular, el sistema de modelado inmune proporciona un sustituto *in vitro* para el LLNA. El sistema puede incluir, por ejemplo, 1) una epidermis variable para proporcionar función de barrera y metabolismo de la piel, 2) un compartimento de células dendríticas/células de Langerhans dentro del cual pueden activarse las células, 3) y un compartimento de linfocitos T que pueda permitir la activación de linfocitos T mediante migración de células dendríticas activadas (por ejemplo, células de Langerhans). Juntos, estos componentes así como
15 otras características pueden configurar un modelo de sistema inmune que es un sustituto *in vitro* para el LLNA y es útil, por ejemplo, par medir la hipersensibilidad de contacto de tipo retardado.
20

También se ilustra en la Figura 1 un ejemplo de bomba 108 y reservorio 110 para proporcionar líquido, tal como medio, al menos un componente de barrera 102 y un componente inmune 104. Una bomba 108 y un reservorio 110 pueden estar en comunicación fluida con los componentes mediante los microfluidos 112, o una pluralidad de microfluidos 112.
25 Los microfluidos 112 también pueden comprender una característica de recirculación. También está previsto en el presente documento que una bomba 108 y un reservorio 110 estén en comunicación fluida con un componente mediante cualquier método, tales como componentes de fluidos de mayor tamaño, por ejemplo, un tubo. En una realización, se controla una bomba 108 de manera automática o mediante un protocolo desde una fuente interna o externa o manualmente por un usuario.
30

En una realización, los microcanales de microfluidos utilizados para conectar el compartimento que contiene la barrera biológica con el compartimento que contiene las células inmunes o los linfocitos T puede ser de menos de aproximadamente 10 micras de ancho y de alto.

35 Tal como se ilustra en la Figura 2, el dispositivo de modelado inmune 200 puede incluir un componente de barrea tridimensional 202 en comunicación fluida con un componente inmune tridimensional 204. Tal como se muestra, los microfluidos inter-compartimento 206 pueden proporcionar comunicación fluida entre el componente de barrera 202 y el componente inmune 204. Los detalles de una realización de componente de barrera 202 se ilustran en la Figura 3. En una realización, el dispositivo de modelado inmune comprende además un componente de observación óptica configurado para visualizar el movimiento de células dentro del dispositivo. El movimiento celular puede ser el movimiento de células inmunes, tales como células dendríticas, de un compartimento a otro compartimento. El componente de observación puede ser ópticamente transparente. En una realización, el componente de observación son los microfluidos inter-compartimento 206. En otra realización, el componente de observación comprende además un componente de obtención de imágenes en contacto o comunicación óptica con el dispositivo de modelado inmune.
40 Por ejemplo, pueden usarse una cámara CCD, un microscopio, un sensor CMOS, o un fotodiodo como componente de obtención de imágenes para observar el movimiento de células inmunes de un compartimento a otro. En una realización con bien una pluralidad de compartimentos de barrera 202 o una pluralidad de compartimentos inmunes 204, un dispositivo puede incluir una pluralidad de componentes de observación.
45

50 En algunas realizaciones, puede usarse un solo módulo de sistema inmune; sin embargo, es muy útil ser capaz de explorar rápidamente en un gran número de sustancias, mediante una exploración de alto rendimiento, su impacto fisiológico en barreras biológicas. En algunas realizaciones, los módulos inmunes están preparados como una micromatriz para presentar un número de módulos inmunes sobre una sola plataforma o microplaca. Se pueden utilizar uno, dos, 10, 12, 20, 24, 50, 70, 96, 100, 384, o 1536, o cualquier número de módulos inmunes individuales sobre una sola plataforma o micromatriz. Con dichas configuraciones, el dispositivo de modelado inmune descrito en el presente documento puede estar preparado en un formato de alto rendimiento para explorar la sensibilización potencial o toxicidad con células vivas como un sistema de ensayo sustitutivo de animales.
55

La micromatriz del dispositivo de modelado inmune puede tener varias realizaciones con varios componentes de los módulos en una ubicación accesible sobre la microplaca. Por ejemplo, un componente individual del dispositivo descrito en el presente documento, tal como un componente de barrera o un componente inmune, puede comprender una unidad de una matriz o un módulo inmune completo puede representar una sola unidad de muchas presentadas sobre la micromatriz. Un componente de barrera en comunicación fluida con un componente inmune a través de uno o más componentes de observación puede comprender una unidad de una matriz. Múltiples componentes de barrea biológica en comunicación fluida con múltiples componentes inmunes a través de uno o más componentes de observación pueden comprender una unidad de una matriz. Muchos componentes de barrera biológica pueden
60
65

configurarse en comunicación a través de microcanales con uno o unos pocos componentes inmunes o una o unas pocas barreras biológicas pueden configurarse en comunicación a través de microcanales con muchos componentes inmunes. En una realización, se controla la matriz para medir la respuesta combinada de múltiples agentes de ensayo por separado o aplicados individualmente a barreras biológicas separadas que se alimentan de un solo componente inmune. De este modo se puede ensayar el efecto combinado de varias sustancias pero aún segregando algunos de los efectos de cada agente de ensayo individual.

La administración de medio eficaz a las células de la matriz puede facilitarse mediante un sistema de microfluidos aprovechado para controlar el caudal de cada unidad de la matriz de manera independiente. Puede controlarse el sistema para proporcionar diferentes caudales a módulos individuales de la micromatriz utilizando válvulas y sensores en el sistema. El sistema puede incluir un sistema de control de retroalimentación para controlar el suministro de medio adaptado para las necesidades metabólicas de los módulos inmunes.

La Figura 3 ilustra un componente de barrera 302 de un dispositivo de modelado inmune. Un componente de barrera 302 puede incluir un sustrato 303. Los ejemplos de un sustrato 303 incluyen, pero sin limitación, vidrio, polímero, silicio, y metal. El sustrato 303 puede incluir un material que es adecuado para el crecimiento de células. Un sustrato 303 puede incluir uno o una pluralidad de canales de acceso de medio 305. En otra realización, los canales de acceso de medio 305 están ubicados en una superficie del sustrato 303. La forma de los canales de acceso de medio 305 puede ser un tubo cuadrado, tal como se ilustra en la realización ilustrativa de la Figura 3, o de cualquier otra forma, como será obvio para un experto en la materia. El espacio entre una pluralidad de canales de acceso de medio 305 o las esquinas de un dispositivo de modelado inmune pueden incluir al menos un canal de acceso de componente inmune 307. Los canales de acceso de componente inmune 307 pueden estar en comunicación fluida con un componente inmune de un dispositivo.

En una realización, un canal de acceso de medio 305 puede incluir uno o una pluralidad de vías fluidicas 309, a través de las cuales puede proporcionarse medio a una barrera biológica 311. Está previsto que un canal de acceso de medio 305 pueda tener una pluralidad de vías fluidicas 309, y en algunas realizaciones, tener una pluralidad de vías fluidicas 309 sobre la superficie de un canal de acceso de medio 305. Una barrera biológica 311 puede incluir cualquier entidad biológica, tal como tejido conectivo y células epiteliales. En una realización, una barrera biológica 311 incluye células epiteliales. También está previsto que la barrera biológica 311 pueda comprender además al menos un tejido epidérmico y una capa dérmica. En otra realización, la capa dérmica está ubicada entre el tejido epidérmico y los canales de acceso de medio 305. Una barrera biológica 311 puede comprender fibroblastos. En otra realización, una barrera biológica 311 incluye células dendríticas, tales como células de Langerhans. En otra realización más, se ubica una matriz polimérica entre una barrera biológica 311 y los canales de acceso de medio 305 (no mostrado). La matriz puede unirse al sustrato del componente de barrera y puede servir, por ejemplo, como característica de unión para la barrera biológica.

La Figura 4 ilustra otra realización ilustrativa de un componente de barrera 402 de un dispositivo de modelado inmune. La figura ilustra vías fluidicas 409 en una pluralidad de canales de acceso de medio 405 ubicados sobre un sustrato 403. Puede proporcionarse el medio a una barrera biológica 411 a través de un canal de acceso de medio 405. El área y/o volumen entre una pluralidad de canales de acceso de medio 405 se muestra como un canal de acceso de componente inmune 407 en la realización ilustrativa en la Figura 4. Una barrera biológica 411 puede comprender un fagocito, tal como una célula dendrítica 414 que puede cultivarse con y ser capaz de viajar fuera de la barrera biológica 411. Una célula dendrítica ilustrativa es una célula de Langerhans. Puede formarse un gradiente de sustancia 416 que afecta a las células dendríticas en la barrera biológica 411 de tal forma que las células dendríticas 414 se mueven fuera de la barrera biológica. Por ejemplo, puede ponerse en contacto una sustancia con la superficie de la barrera biológica 411 que crea una respuesta dentro de la barrera en la que las células dendríticas 414 se mueven fuera de la barrera. En otra realización, se forma un gradiente 416 en la barrera biológica 411 poniendo la barrera en comunicación con un atrayente, en el que el atrayente crea un gradiente 416 en el que las células dendríticas 414 se mueven fuera de la barrera biológica 411. En una realización, las células dendríticas 414 viajan dentro de los canales de acceso del componente inmune 407 fuera de la barrera biológica 411.

La Figura 5 ilustra un componente inmune 504 ilustrativo de un dispositivo de modelado inmune. En una realización, un componente inmune 504 incluye un sustrato 503 y al menos un canal de acceso de medio 505. Un canal de acceso de medio 505 puede comprender una o una pluralidad de vías fluidicas 509 a través de las cuales el medio puede fluir fuera del canal. Las células inmunes (linfocitos T o células inmunes de los nódulos linfáticos) 517 pueden cultivarse en comunicación fluida con los canales de acceso de medio 505 y/o el sustrato 503. En una realización, los linfocitos T o las células inmunes de los nódulos linfáticos 517 están unidas al sustrato 503 o a los canales de acceso de medio 505. En otra realización, el sustrato 503 incluye una matriz tal como se ha discutido anteriormente en referencia al componente de barrera. El área o volumen entre una pluralidad de canales de acceso de medio 505 o las esquinas del sustrato pueden incluir uno o una pluralidad de canales de compartimento de linfocitos T o compartimentos de nódulo linfático 518.

Una realización de un dispositivo de modelado inmune 600 se muestra en la Figura 6. El dispositivo ilustrativo incluye un compartimento de barrera que incluye una barrera biológica 611 y un sustrato de barrera 603, un compartimento inmune 615 que incluye un sustrato inmune 619 y células inmunes (linfocitos T o células inmunes de los nódulos

linfáticos) 617, una interfaz de compartimento de barrera 623, una interfaz de compartimento 621, y microfluidos 612. En esta realización ilustrativa, el dispositivo de modelado inmune 600 incluye una pluralidad de capas que pueden usarse para construir el dispositivo. El compartimento de barrera es parte de o está unido a un sustrato separado (sustrato de barrera 603) que el compartimento inmune (sustrato inmune 619). Los sustratos pueden comprender el mismo material o uno diferente. En una realización, los sustratos están adheridos entre sí. En otra realización, los sustratos están en comunicación fluida entre sí.

La Figura 7 ilustra un aspecto descrito en el presente documento de un sistema de modelado inmune integrado 700 que incluye un componente de barrera 702 en comunicación fluida mediante microfluidos inter-compartimento 706 con un componente inmune 704. En una realización, un sistema integrado 700 está ubicado sobre o como parte de un sustrato 703. Un sistema también puede comprender una bomba 708 para proporcionar fluido de un reservorio 710 a componentes del sistema mediante microfluidos 712. Los ejemplos de fluido útiles en un sistema de modelado inmune integrado 700 incluyen, pero sin limitación, medio de cultivo celular. En una realización, los microfluidos 712 conectan los canales de acceso de medio de un componente a un reservorio 710, en el que el reservorio 710 puede proporcionar medio a los canales y el compartimento mediante la bomba 708. En otra realización, los microfluidos 712 proporcionan medio a un componente de un sistema mediante acción capilar. Los microfluidos 712 para proporcionar líquido a un componente pueden comprender un resistor fluido 720 para afectar al caudal según se desee.

En una realización, tal como la realización ilustrativa en la Figura 7, se utiliza un sistema de modelado inmune integrado 700 para modelar una reacción del sistema inmune. Por ejemplo, una capa de barrera biológica, tal como epitelio, puede cultivarse o ubicarse en un componente de barrera 702 y suministrarle medio a través de los microfluidos 712, para mantener la salud de la barrera biológica. Una barrera biológica puede ser un epitelio, tal como piel artificial, incluyendo una epidermis y una dermis, en la que el epitelio puede estar expuesto al ambiente para simular de manera más estrecha la piel de un cuerpo humano. En una realización, se mantiene la piel artificial sobre una membrana semipermeable. Para modelar el sistema inmune, puede aplicarse una sustancia de ensayo a la superficie de una barrera biológica, que a su vez hace que las células inmunes, tales como células dendríticas, dentro de la barrera biológica se activen o migren (o inducirse su migración usando, por ejemplo, una sustancia atrayente o repelente) fuera de la barrera biológica. Las células dendríticas pueden establecer comunicación fluida con un componente inmune 704 de un sistema. Un componente inmune 704 puede comprender células atrayentes del sistema inmune, tales como linfocitos T para modelar un sistema inmune *in vivo*. A medida que se forma un gradiente de células dendríticas moviéndose de un compartimento al otro, puede medirse u observarse el movimiento de las células dendríticas para determinar la reacción inmune de la sustancia aplicada a la barrera biológica. Como alternativa, puede medirse la proliferación de linfocitos T como resultado de la activación de células dendríticas.

En una realización, un método de detección del dispositivo de modelado inmune descrito en el presente documento comprende la velocidad de quimiotaxis de las células dendríticas acoplado con la medida de la activación de linfocitos T. La velocidad de quimiotaxis puede medirse mediante el número de células que migran hacia el componente inmune mientras que la activación de los linfocitos T puede medirse mediante el grado de proliferación celular o el grado en el que se secretan las citocinas derivadas de linfocitos T. Puede utilizarse marcado celular basado en fluorescencia para cuantificar dicho nivel de proliferación, por ejemplo. Mediante el acoplamiento de la velocidad de quimiotaxis con la velocidad o grado de activación de linfocitos T, el dispositivo de modelado inmune descrito en el presente documento puede proporcionar información acerca de la potencial sensibilización relativa y/o la concentración del agente de ensayo sensibilizante que produce las respuestas celulares. También acoplando las velocidades, es posible determinar un nivel umbral del agente de ensayo que activa las respuestas celulares. Se efectúa una evaluación más precisa y dinámica utilizando un análisis de ambos parámetros. Por ejemplo, pueden aplicarse varias concentraciones de una sustancia al componente de barrera biológica y cuantificarse los cambios dependientes de la concentración en la dinámica celular, tales como, velocidad de respuesta entre la migración de células dendríticas y la activación de linfocitos T. Dicho análisis potencia la determinación del potencial de sensibilización y/o el nivel umbral de agentes de ensayo que puede tolerarse en una preparación para uso *in vivo*. En una realización, se mide la velocidad de migración de las células migrantes y la velocidad de proliferación de linfocitos T. Como alternativa, se puede medir la cantidad tanto de la migración de las células migrantes (número de células que migran) y el nivel de proliferación de linfocitos T.

Los ejemplos de sustancias de ensayo que producen potencialmente una reacción inmune en un sistema de modelado inmune integrado 700 incluyen, pero sin limitación, fármacos, cosméticos, nutracéuticos, químicos sintéticos, fragancias, lubricantes, jabones, champús, productos para el cabello, lociones y aceites de protección solar.

La barrera biológica puede ser células de cualquier barrera biológica, tales como, piel, córneas, revestimiento de los pulmones, revestimiento del tracto gastrointestinal, revestimiento del tracto genitourinario, o piel artificial que comprende queratinocitos cultivados.

Con cualquiera de las barreras biológicas, es posible explorar agentes de ensayo e identificar reacciones de hipersensibilidad. Por ejemplo, se pueden utilizar células de la córnea como barrera biológica en el dispositivo de ensayo. De manera similar, pueden emplearse células del tracto gastrointestinal como barrera biológica en un dispositivo para explorar la sensibilidad de agentes de ensayo en afecciones tales como enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, proctitis ulcerosa o colangitis esclerosante primaria. La selección de células específicas de diferentes regiones fisiológicas del cuerpo para formar la barrera biológica permite personalizar

el proceso de exploración y analizar la hipersensibilidad de agentes de ensayo respecto a varias enfermedades o afecciones y varios sistemas biológicos.

Componente de "Piel artificial" de queratinocitos:

5 Un objetivo de las realizaciones descritas es proporcionar una piel artificial como modelo de una epidermis viable. Para lograr dicha piel artificial pueden usarse técnicas convencionales conocidas en la materia para el cultivo de queratinocitos. En un ejemplo, pueden derivarse queratinocitos primarios de muestras de prepucio humano y pueden desarrollarse cultivos en capas elevando cultivos en inmersión a la interfaz aire-líquido. En otro ejemplo, pueden usarse como alternativa modelos de piel reconstruida. Por ejemplo, pueden usarse REALSKIN FT o EpiSkin tal como se describen por SkinEthic Laboratories (véase http://www.skinethic.com/Jnt/_en/index.aspx; página web visitada por última vez el 1-4-09). Pueden usarse marcadores de proliferación y diferenciación (por ejemplo, Ki67, involucrina, etc.) para controlar/seguir el crecimiento y desarrollo de los queratinocitos.

10

15 Pueden evaluarse una serie de características de la piel artificial incluyendo, pero sin limitación, la función de barrera (por ejemplo, mediante estudios de permeabilidad), evaluación del metabolismo y evaluación de la maduración del tejido en capas de la piel artificial. Puede evaluarse la función de barrera de la piel artificial, por ejemplo, mediante la simple adición de medio de cultivo de células o la aplicación tópica a través de filtros saturados de colorante situados sobre la piel artificial. Puede evaluarse la función de barrera, por ejemplo, controlando la permeabilidad de colorantes fluorescentes en varias etapas del desarrollo desde monocapas de queratinocitos a una epidermis en capas tridimensional. Puede determinarse la permeabilidad al colorante, por ejemplo, con una estrategia de HPLC usando colorantes no fluorescentes o mediante microscopía confocal con colorantes fluorescentes. Puede controlarse el metabolismo en las capas de piel, por ejemplo, usando compuestos que contienen un grupo amino primario (por ejemplo, ácido p-aminobenzoico, benzocaína, o productos de reducción de color azo) junto con control, compuestos no metabolizantes tales como, por ejemplo, benzo[a]pireno y/o 7-etoxicumarina.

20

25

Componente de células dendríticas/linfocitos T:

30 Otro objetivo de la invención es proporcionar un componente de célula dendrítica y/o linfocito T como modelo de interacción de componente de sistema inmune con una capa de barrera. En una realización, se proporciona un compartimento, célula, cámara o canal para cultivar células dendríticas y visualizar su migración mediante microscopía de tiempo transcurrido usando, por ejemplo, un microscopio invertido, equipado con objetivos DIC, iluminación epifluorescente, y una cámara CCD. Está previsto que mediante el uso de los dispositivos descritos en el presente documento sea posible observar células dendríticas activadas en migración. Por ejemplo, las células dendríticas podrían observarse microscópicamente a medida que migran de una capa de barrera de piel artificial cultivada. La observación puede tener lugar en cualquiera o en todos de el componente de barrera, las conexiones microfluidas inter-componente y el componente inmune.

35

40 En una realización particular, las células dendríticas están dirigidas quimiotácticamente hacia un compartimento, célula, cámara o canal que incluye otras células inmunes (por ejemplo, linfocitos T) para la estimulación alogénica aguas abajo. En esta realización, los dos tipos celulares pueden cultivarse en compartimentos, celdas, cámaras o canales separados que están interconectados. Está previsto que la interconexión pueda ser cualquier forma de conexión fluida incluyendo, pero sin limitación a canal, microcanal, tubo, vaso o similares. El número de tipos celulares cultivados e interconectados no debe estar limitado a solo dos. Está previsto que una pluralidad de componentes celulares del sistema inmune (por ejemplo, tres o más, cuatro o más, etc.) puedan cultivarse en configuraciones que proporcionen las interacciones deseadas entre tipos celulares.

45

Además de o en lugar de células dendríticas, está previsto que otros tipos celulares fagocíticos, por ejemplo, macrófagos y/o neutrófilos puedan usarse tal como se describe en el presente documento para células dendríticas para estudiar la interacción del componente de sistema inmune con una barrera biológica.

50

La estimulación alogénica de células dendríticas por linfocitos T puede evaluarse, por ejemplo, usando métodos de fluorescencia bien conocidos en la técnica. El análisis de la migración de células y la proliferación de linfocitos T puede evaluarse mediante varios métodos. En una realización, se proporcionan regiones ópticamente transparentes en el dispositivo para observar visualmente las células. Puede haber una o más de dichas ventanas ópticas integradas en el dispositivo en varias localizaciones incluyendo en el primer compartimento, el segundo compartimento y uno o más de los canales de interconexión de microfluidos. Mediante el uso de un microscopio, se puede observar la velocidad y número de células en migración y la velocidad o número de linfocitos T en proliferación.

55

60 En otras realizaciones, el dispositivo descrito en el presente documento puede utilizar otros métodos para identificar biomarcadores útiles para indicar el efecto de una sustancia sobre una o más barreras biológicas. Las células dendríticas que migran fuera del componente de barrera pueden caracterizarse mediante métodos analíticos conocidos en la técnica. Los métodos analíticos útiles incluyen métodos usados normalmente para analizar el nivel de expresión de ARN, el contenido de material genético, la composición de glucoproteínas y materiales biológicos producidos por la célula. Los ejemplos no limitantes de métodos analíticos incluyen reacción en cadena de la polimerasa, secuenciación de ADN transferencia de Southern, transferencia de Northern, transferencia Western,

65

micromatriz, electroforesis en 2D e inmunoensayos.

5 En una realización, se aplica una sustancia en cuestión a un componente de barrera biológica, las células dendríticas en migración se recogen o de otro modo identifican fuera o dentro del componente de barrera biológica, y pueden determinarse las características de las células en migración. Por ejemplo, se puede analizar el perfil de expresión proteica de las células recogidas de ahí. El perfil proteico se compara con un perfil proteico representativo de células dendríticas normales o en reposo y las proteínas expresadas de manera diferencial o asociadas de manera única con dichas células dendríticas recogidas se identifican como biomarcadores. En otra realización, se proporcionan los biomarcadores identificados por el dispositivo descrito en el presente documento para indicar la presencia de una sustancia en un nivel sustancialmente detectable por las células dendríticas. En otra realización más, se relaciona el nivel de un biomarcador con un valor mediante el cual se indica el potencial de sensibilización relativa de una sustancia. Puede efectuarse una evaluación del nivel de activación de las células dendríticas que migran para proporcionar una evaluación del agente de ensayo y sus efectos en el componente de barrera biológica. En una realización, el dispositivo puede incluir solo la barrera biológica con las células dendríticas que migran y puede evaluarse la activación de las células dendríticas que migran.

20 En una realización, el componente inmune del dispositivo puede comprender linfocitos T junto con otras células, tales como las células que existen en los nódulos linfáticos. En otra realización, el componente inmune comprende solo linfocitos T sin ninguna otra célula adicional en el compartimento al comienzo del análisis. Los linfocitos T pueden cultivarse como una capa en 2D sobre un soporte o matriz convencional formulada para facilitar el crecimiento celular o los linfocitos T pueden cultivarse en suspensión de un medio de cultivo usando técnicas de cultivo convencionales conocidas en la técnica. Durante el análisis, las células dendríticas del compartimento o capa de barrera biológica pueden migrar al compartimento o capa inmune.

25 De manera ventajosa, en una realización, el sistema permite bloquear (o enfocar) un gradiente de concentración de moléculas, agentes o compuestos (por ejemplo, un agente quimiotáctico) sobre una célula en movimiento. Para lograr esto, en una realización particular, puede establecerse un gradiente en un canal de microfluidos con la capacidad añadida de ajustar en tiempo real la posición y pendiente del gradiente. En una realización relacionada, puede proporcionarse control del sistema incluyendo un controlador computarizado que, por ejemplo, ajusta la posición y pendiente del gradiente con la localización y forma cambiante de la célula en movimiento. Mediante dicho control por ordenador, es posible lograr un sistema de retroalimentación que puede desacoplar los componentes temporales y espaciales de la estimulación de quimiocinas. Está previsto adicionalmente que la pendiente y la posición de un gradiente de concentración sobre una célula en movimiento pueda controlarse dentro de un canal de microfluidos usando un sistema de válvulas sobre una microplaca. Las válvulas pueden controlarse con un ordenador mediante un bucle de retroalimentación que puede incluir, por ejemplo, el desplazamiento físico de la célula, el cambio en la forma de la célula durante la migración direccional, o el nivel de expresión de las moléculas marcadas fluorescentemente implicadas en el proceso de señalización.

40 Las células dendríticas proporcionadas pueden derivarse de sangre humana así como de líneas celulares de tipo dendrítico, tales como MUTZ-3 en las que se puede inducir la maduración (por ejemplo, la expresión de CD83, CD1a, etc.). Pueden controlarse los cambios morfológicos en las células migrantes, y pueden sondarse para niveles de maduración, captación de antígeno, presentación de antígeno, y/o activación de linfocitos T.

45 A modo de ejemplo no limitante, las moléculas de gradiente pueden ser los ligandos de quimiocinas (CCL19)/MIP3- β y CCL21/SLC, dos quimiocinas expresadas de manera constitutiva por células de los nódulos linfáticos (NL) y otras células inmunes, que comparten un receptor de quimiocinas común, CCR7.

Fabricación de sistemas de modelado inmune

50 En una realización, el módulo inmune puede ser una construcción relativamente simplista de un primer compartimento de cultivo que cultiva las células de barrera biológica y opcionalmente también células dendríticas, un segundo compartimento que cultiva células inmunes o linfáticas, tales como, solo linfocitos T como linfocitos, y uno o más canales de microfluidos que conectan el primer y el segundo compartimento para permitir la comunicación fluida entre compartimentos y la migración de células. La construcción del módulo inmune y la inclusión de solo un tipo celular linfático contribuye a un dispositivo analítico eficaz que proporciona muy rápidamente la capacidad de explorar *in vitro* el uso *in vivo* potencial de varios agentes de ensayo. El uso de un solo tipo de célula linfática sin la complicación de muchos sistemas en el módulo inmune proporciona un funcionamiento eficiente y una exploración rápida de los agentes de ensayo. En una realización alternativa, el módulo inmune solo comprende unos pocos tipos celulares linfáticos.

60 A modo de ejemplo no limitante, el material de partida o sustrato para fabricar los dispositivos de modelado inmune y los sistemas descritos en el presente documento puede ser una oblea, normalmente hecha de silicio (Si) o sílice (SiO₂). Los diámetros de la oblea más comunes empleados son 10,16 cm, 15,24 cm y 20,32 cm. El proceso de fabricación para un componente de barrera, un componente inmune y los microfluidos inter-componente implica dos procesos básicos, es decir, deposición y grabado. Se proporciona a continuación una descripción de cada uno.

En determinadas realizaciones, los métodos de fabricación de los sistemas descritos en el presente documento pueden incluir, pero sin limitación, impresión láser, impresión UV y métodos fotónicos de guía de onda de hueco de banda. El proceso de fabricación en algunas realizaciones incluye una o más etapas de deposición, protección y grabado.

5

Deposición

En la etapa de deposición, se deposita una capa de material bien definido que tiene un espesor controlado a lo largo de toda la oblea. El material más común usado para la deposición de la capa de microfluidos es sílice (SiO₂) también conocido como vidrio. También se usan otros materiales, tales como silicio, cristal, epoxi, niobato de litio, fosfuro de indio y SiON (Oxinitruro de silicio) y sus derivados.

10

La etapa de deposición se lleva a cabo usando varias tecnologías, tales como PECVD (Deposición química en fase de vapor asistida por plasma), LPCVD (CVD a baja presión), APCVD (CVD a presión atmosférica), FHD (Deposición por hidrólisis de llama) y otras bien conocidas en la técnica.

15

Protección

Después de la etapa de deposición y antes de la etapa de grabado, la estructura bidimensional deseada del dispositivo de modelado inmune se transfiere a la oblea depositada protegiendo las zonas que no van a grabarse. La protección se lleva a cabo en varias etapas que implican cubrir la oblea con material sensible a la luz, exponer a la luz mediante máscaras litográficas y eliminando el material expuesto dejando en su lugar la máscara.

20

Grabado

25

En la etapa de grabado, el material y las áreas no protegidas se retiran de la capa superior del núcleo 1023 del sustrato. La velocidad de grabación es un parámetro conocido, por lo tanto la profundidad del grabado puede controlarse mediante el tiempo. Las dos técnicas más comunes para grabar son grabado húmedo y grabado por iones reactivos (RIO).

30

Después de la etapa de grabado, se crea un sobre-revestimiento o revestimiento superior 1029 de la capa usando una etapa de deposición similar a la descrita anteriormente. Las etapas anteriores pueden repetirse para crear varias capas una encima de otra según sea necesario.

35

Cuando se completa el procesado de la oblea, puede cortarse en cubitos en microplacas individuales.

Control del sistema

En un aspecto, un dispositivo o sistema descrito en el presente documento puede operarse o controlarse por un usuario. Tal como se ilustra en la Figura 8, un usuario puede estar en comunicación con un dispositivo o sistema usando un ordenador. La interfaz de usuario del ordenador puede incluir un teclado, ratón, y un monitor. El ordenador puede estar en comunicación con el dispositivo a través de una conexión por cable, tal como Ethernet, Fire Wire, USB, u otras conexiones, o puede estar en comunicación inalámbrica con el dispositivo, tal como por una red inalámbrica o por Bluetooth. El ordenador puede comprender un disco duro para almacenar información de un dispositivo o sistema y puede comprender un método para grabar datos en un dispositivo de almacenamiento tal como un dispositivo de memoria flash, un CD-ROM, o un DVD.

40

45

Análisis de datos

En algunas realizaciones una afección, por ejemplo, una afección alérgica, autoinmune, y/o inflamatoria, se detecta en una muestra de ensayo de barrera biológica (por ejemplo, una muestra de piel) sometida a un agente, compuesto, formulación o composición. En una realización adicional, puede usarse un resultado medido de analizar el efecto de un agente, compuesto, formulación o composición sobre la muestra de ensayo para diagnosticar una afección o estado de enfermedad de un paciente. En otra realización más, el método de detección de la invención puede incluir además un método para diagnosticar una afección o estado de enfermedad. En una realización relacionada, el método para diagnosticar una enfermedad puede incluir revisar o analizar datos relativos a la detección de una afección o estado de enfermedad y proporcionar una conclusión al paciente, al profesional sanitario o al gerente sanitario, basándose la conclusión en la revisión o el análisis de los datos referentes al diagnóstico de una afección o enfermedad. La revisión o el análisis de los datos pueden facilitarse usando un ordenador u otro dispositivo digital y una red tal como se describe en el presente documento. Está previsto que la información referente a dichos datos pueda transmitirse a través de la red.

50

55

60

La Figura 8 es un diagrama de bloques que muestra un ejemplo representativo de dispositivo lógico mediante el cual puede lograrse la revisión o el análisis de los datos relativos a la presente invención. Dichos datos pueden ser referentes a una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto. La Figura 8 muestra un sistema informático (o dispositivo digital) 800 conectado a un aparato 820 para su uso con el sistema de modelado inmune 824 para, por

65

- ejemplo, producir un resultado. El sistema informático 800 puede entenderse como un aparato lógico que puede leer instrucciones del medio 811 y/o el puerto de red 805, que puede conectarse opcionalmente al servidor 809 que tiene medios fijos 812. El sistema mostrado en la Figura 8 incluye la CPU 801, dispositivos de disco 803, dispositivos de entrada opcionales, tales como teclado 815 y/o ratón 816 y un monitor opcional 807. La comunicación de datos puede lograrse mediante el medio de comunicación indicado a un servidor 809 en una localización local o remota. El medio de comunicación puede incluir cualquier medio para transmitir o recibir datos. Por ejemplo, el medio de comunicación puede ser una conexión de red, una conexión inalámbrica o una conexión a Internet. Está previsto que los datos referentes a la presente invención puedan transmitirse a través de dichas redes o conexiones.
- 5
- 10 En una realización, un medio legible por ordenador incluye un medio adecuado para la transmisión de un resultado de un análisis de una muestra biológica de ensayo. El medio puede incluir un resultado referente a una afección, enfermedad o estado de un sujeto, en el que dicho resultado se deriva usando los métodos tal como se describen en el presente documento.
- 15 Kits
- También se proporcionan kits que incluyen reactivos para llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento.
- 20 En algunas realizaciones, un kit incluye reactivos que incluyen un sistema de modelado inmune, medios de cultivo, y otros componentes tal como se describen en el presente documento.
- El kit puede comprender opcionalmente uno o más de los siguientes: uno o más de los sistemas de modelado inmune, uno o más cultivos celulares que pueden cultivarse en los sistemas, y varias quimiocinas, citocinas, factores de crecimiento, etc.
- 25
- Los componentes de un kit pueden estar contenidos en un embalaje. Pueden proporcionarse instrucciones en el embalaje para usar el kit para llevar a cabo un método descrito y pueden proporcionarse en cualquier medio fijo. Las instrucciones pueden estar localizadas en el interior del embalaje o fuera del embalaje, y pueden estar impresas en el interior o exterior de cualquier superficie que forme el embalaje que haga que las instrucciones sean legibles. Un kit puede estar en forma multicanal para ensayar una pluralidad de muestras de ensayo y/o una pluralidad de agentes.
- 30
- Tal como se describe en el presente documento y como se muestra en la Figura 9, en determinadas realizaciones un kit 903 puede incluir un envase o embalaje 902 para contener varios componentes. Tal como se muestra en la Figura 9, y tal como se describe en el presente documento, en una realización, se incluyen un kit 903 que incluye uno o más sistemas de modelado inmune 900, y opcionalmente reactivos 905. Tal como se muestra en la Figura 9, y tal como se describe en el presente documento, el kit 903 puede incluir opcionalmente instrucciones 901. Están previstas otras realizaciones del kit 903 en las que los componentes incluyen varias características adicionales descritas en el presente documento.
- 35
- 40 Aunque se han mostrado y descrito realizaciones preferidas en el presente documento, será evidente para los expertos en la materia que dichas realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo. Se les ocurrirán a los expertos en la materia numerosas variaciones, cambios y sustituciones. Debe entenderse que pueden emplearse varias alternativas a las realizaciones descritas en el presente documento. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que mediante estas queden cubiertos los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes.
- 45

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de modelado de hipersensibilidad que comprende:
- 5 un primer compartimento de cultivo que contiene una barrera biológica cultivada seleccionada de piel, córneas, revestimiento de los pulmones, revestimiento del tracto gastrointestinal, el revestimiento del tracto genitourinario y piel artificial, y que también comprende células dendríticas;
- 10 un segundo compartimento de cultivo que contiene linfocitos T;
- una o más conexiones de microfluidos inter-compartimento entre dichos primero y segundo compartimentos configuradas para permitir la migración de células dendríticas desde dicho primer compartimento hasta dicho segundo compartimento; y
- un componente de observación óptica configurado para ver la migración de células dendríticas desde dicho primer compartimento hacia dicho segundo compartimento.
- 15 2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el primer compartimento de cultivo comprende además una matriz configurada para soportar el crecimiento celular.
3. El dispositivo de la reivindicación 1, que además comprende múltiples unidades del primer y del segundo componentes de cultivo interconectados con canales de microfluidos que proporcionan medio.
- 20 4. Un método para detectar una reacción de hipersensibilidad a un agente de ensayo, que comprende:
- proporcionar un dispositivo de modelado de hipersensibilidad que comprende un primer compartimento de cultivo que contiene una barrera biológica cultivada seleccionada de piel, córneas, revestimiento de los pulmones, revestimiento del tracto gastrointestinal, el revestimiento del tracto genitourinario y piel artificial, y que también comprende células dendríticas; un segundo compartimento de cultivo que contiene linfocitos T; y una o más conexiones de microfluidos inter-compartimento entre dichos primero y segundo compartimentos configuradas para permitir la migración de células dendríticas desde dicho primer compartimento hasta dicho segundo compartimento;
- 25 cultivar dichas barrera biológica, células dendríticas y linfocitos T dentro de dicho dispositivo con medio de cultivo fluyendo entre dichos compartimentos; aplicar un agente de ensayo a dicha barrera biológica; y controlar dichas células dendríticas y/o linfocitos T en dicho dispositivo para detectar una reacción de hipersensibilidad, en donde dicho control comprende:
- 30 (i) determinar la velocidad y/o la proliferación de linfocitos T;
- (ii) determinar la velocidad y/o la cantidad migración de células dendríticas; o
- (iii) determinar la velocidad y/o la cantidad de proliferación de linfocitos T y determinar la velocidad y/o la cantidad de migración de células dendríticas.
- 35 5. El método de la reivindicación 4, en el que dicha reacción de hipersensibilidad detectada es hipersensibilidad de contacto de tipo retardado.
6. El método de la reivindicación 4, en el que dicho agente de ensayo comprende un fármaco, un cosmético, un nutracéutico, un producto químico sintético, una fragancia, un lubricante, un jabón, un champú, un producto para el
- 45 cabello, una producto de protección solar, una loción o un aceite.
7. El método de la reivindicación 4, en el que dicho control comprende observar o medir la migración de células dendríticas, en donde, opcionalmente, dicha migración se controla mediante un componente de observación óptica localizado en dicho primer o segundo compartimentos o en una o más de dichas conexiones de fluidos.
- 50 8. El método de la reivindicación 4, en el que dicha barrera biológica es el revestimiento del tracto gastrointestinal cultivado.
9. El método de la reivindicación 4, en el que dicha barrera biológica es piel cultivada.
- 55 10. El método de la reivindicación 4, en el que dicha barrera biológica es córnea cultivada.
11. El método de la reivindicación 4, en el que dicha barrera biológica es revestimiento pulmonar cultivado.
- 60 12. El método de la reivindicación 4, en el que dicha barrera biológica es el revestimiento del tracto genitourinario cultivado.
13. El método de la reivindicación 4, en el que dicha barrera biológica es piel artificial.

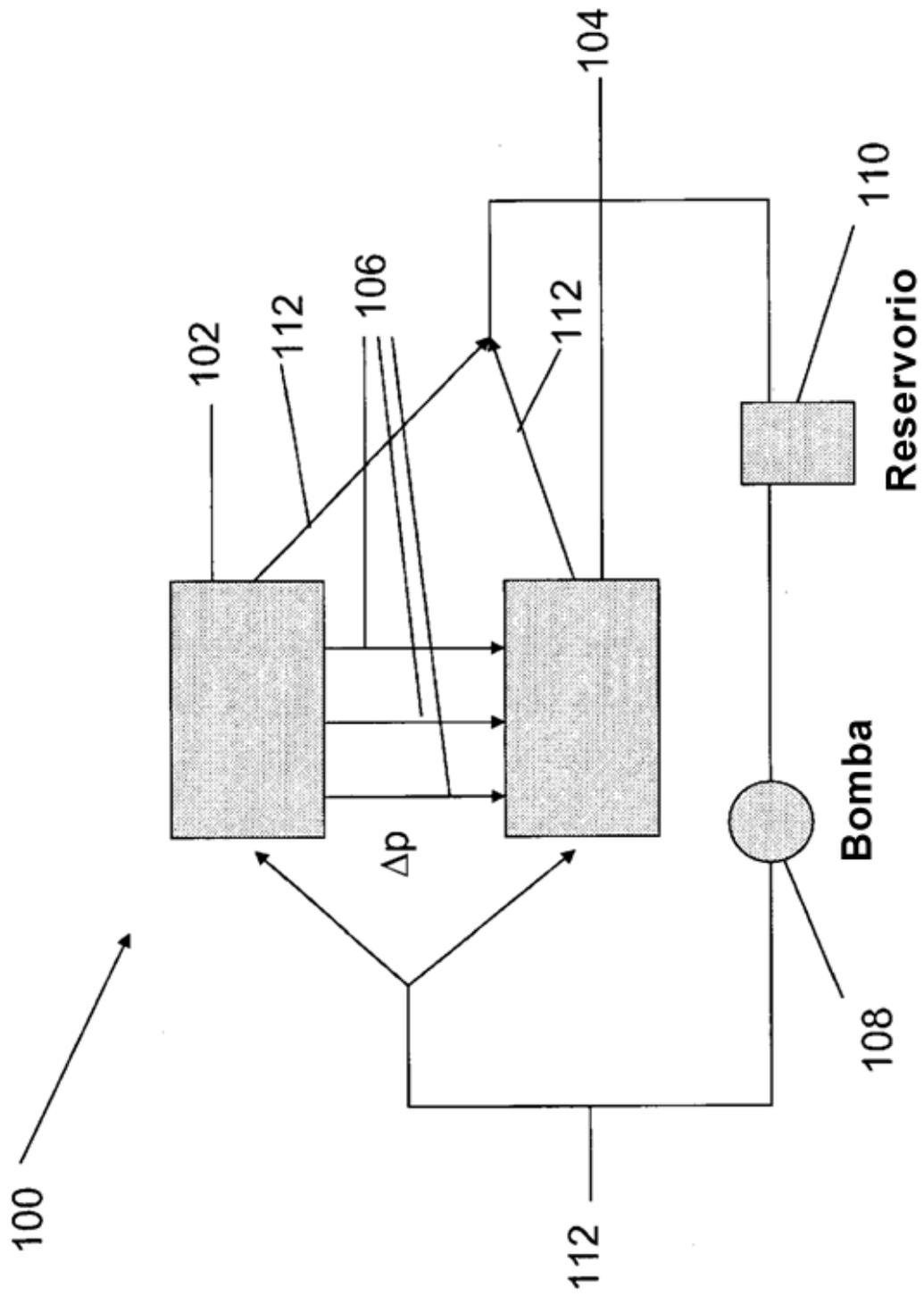


FIG. 1

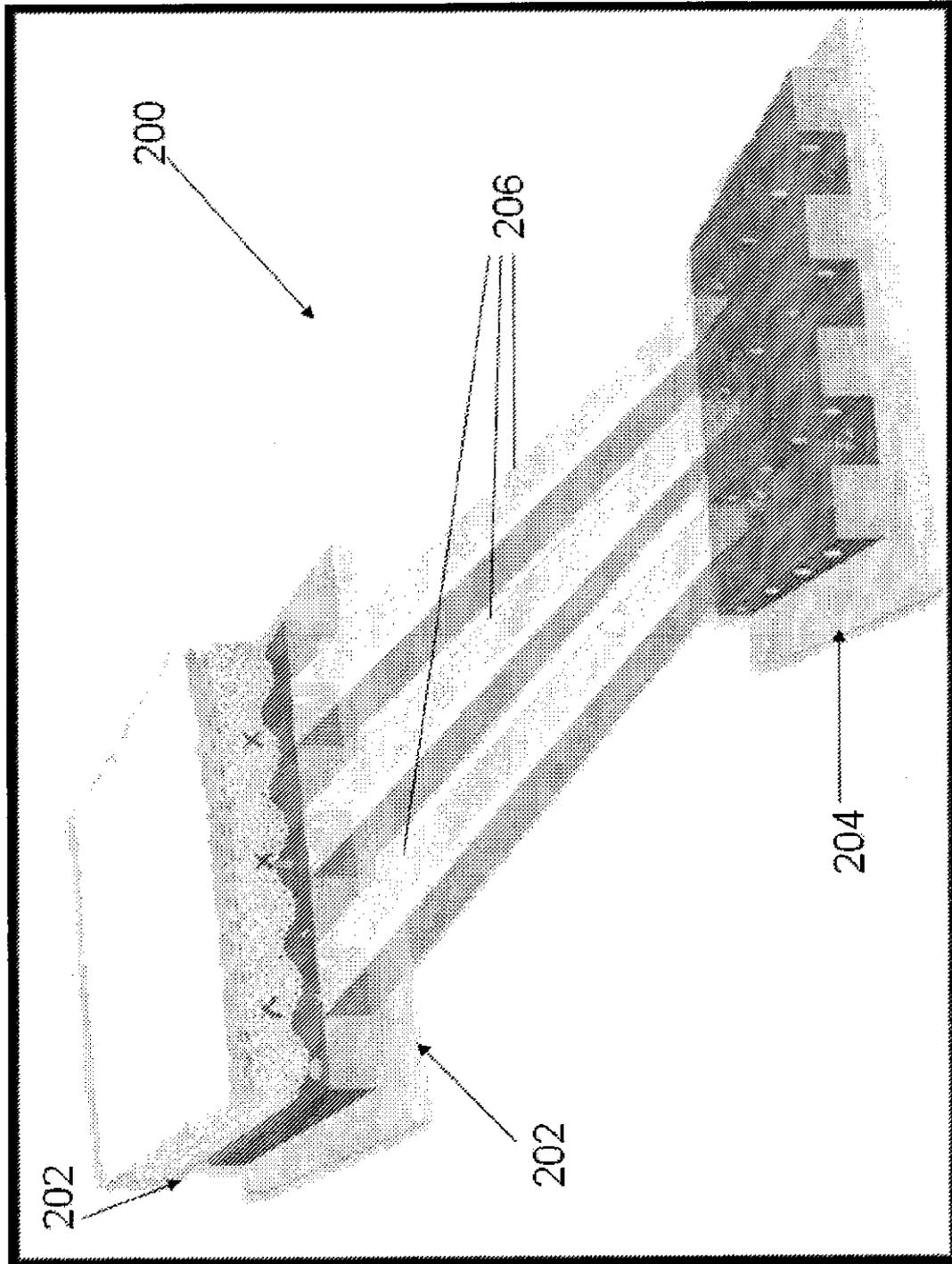
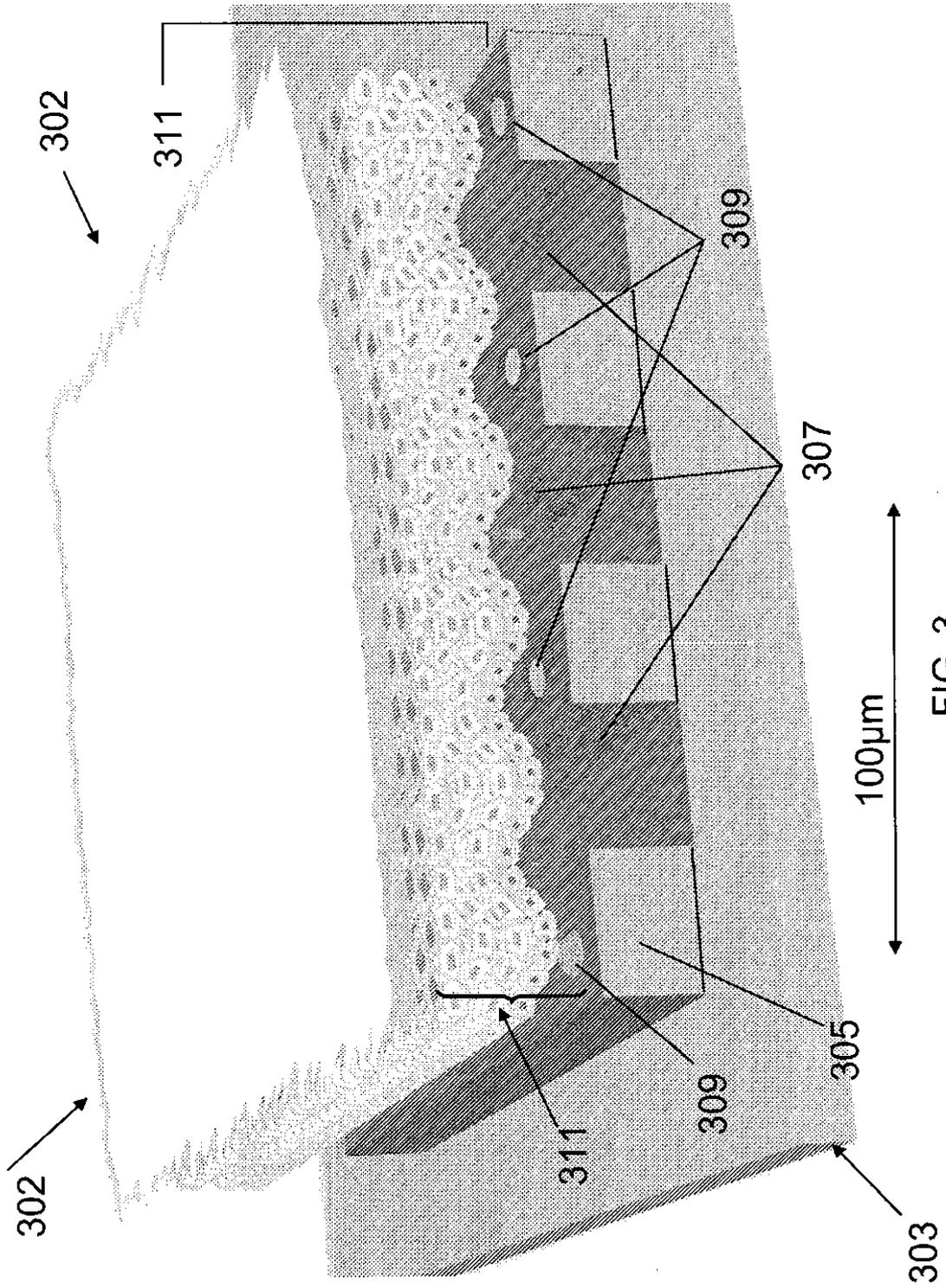


FIG. 2



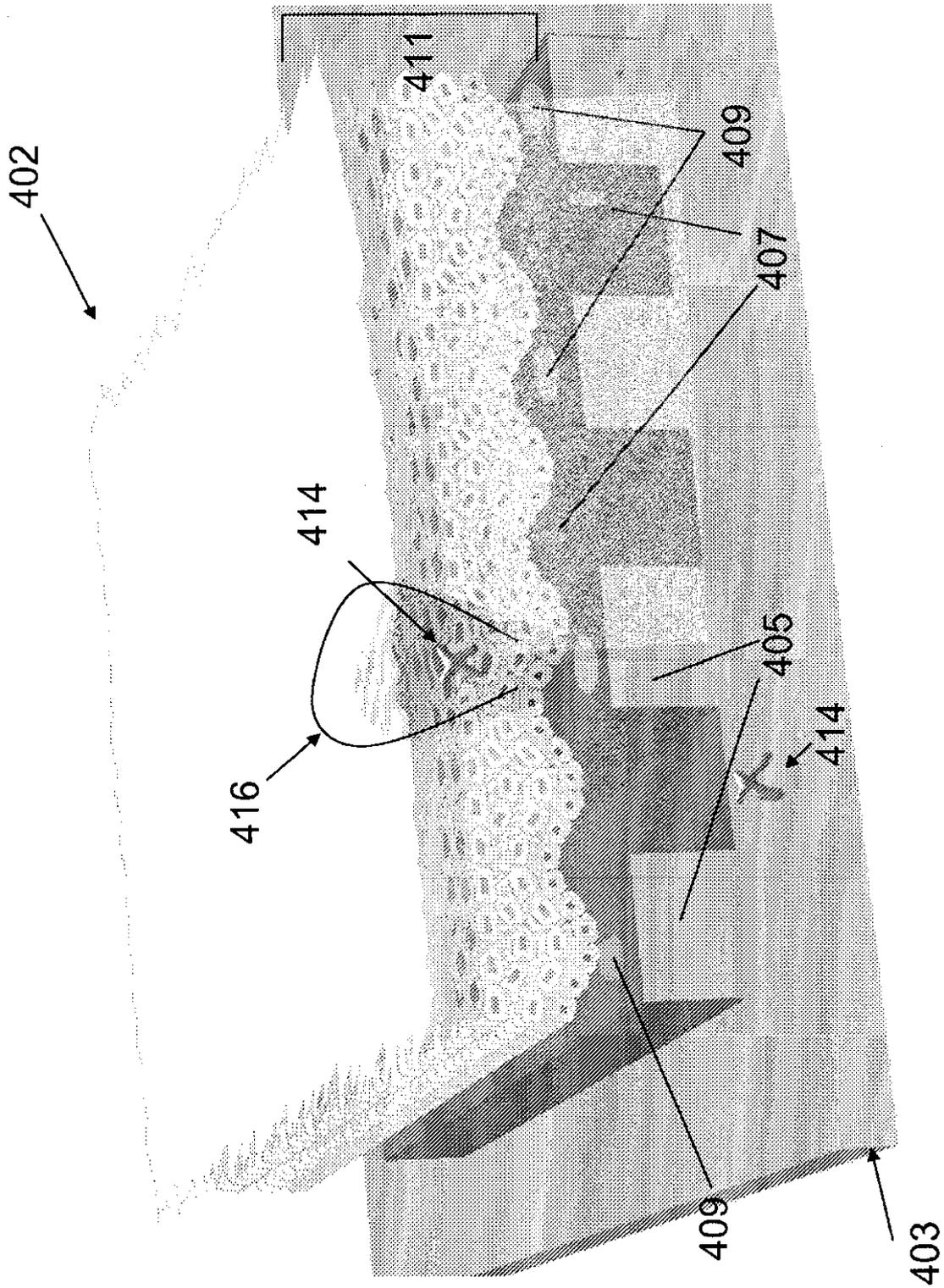


FIG. 4

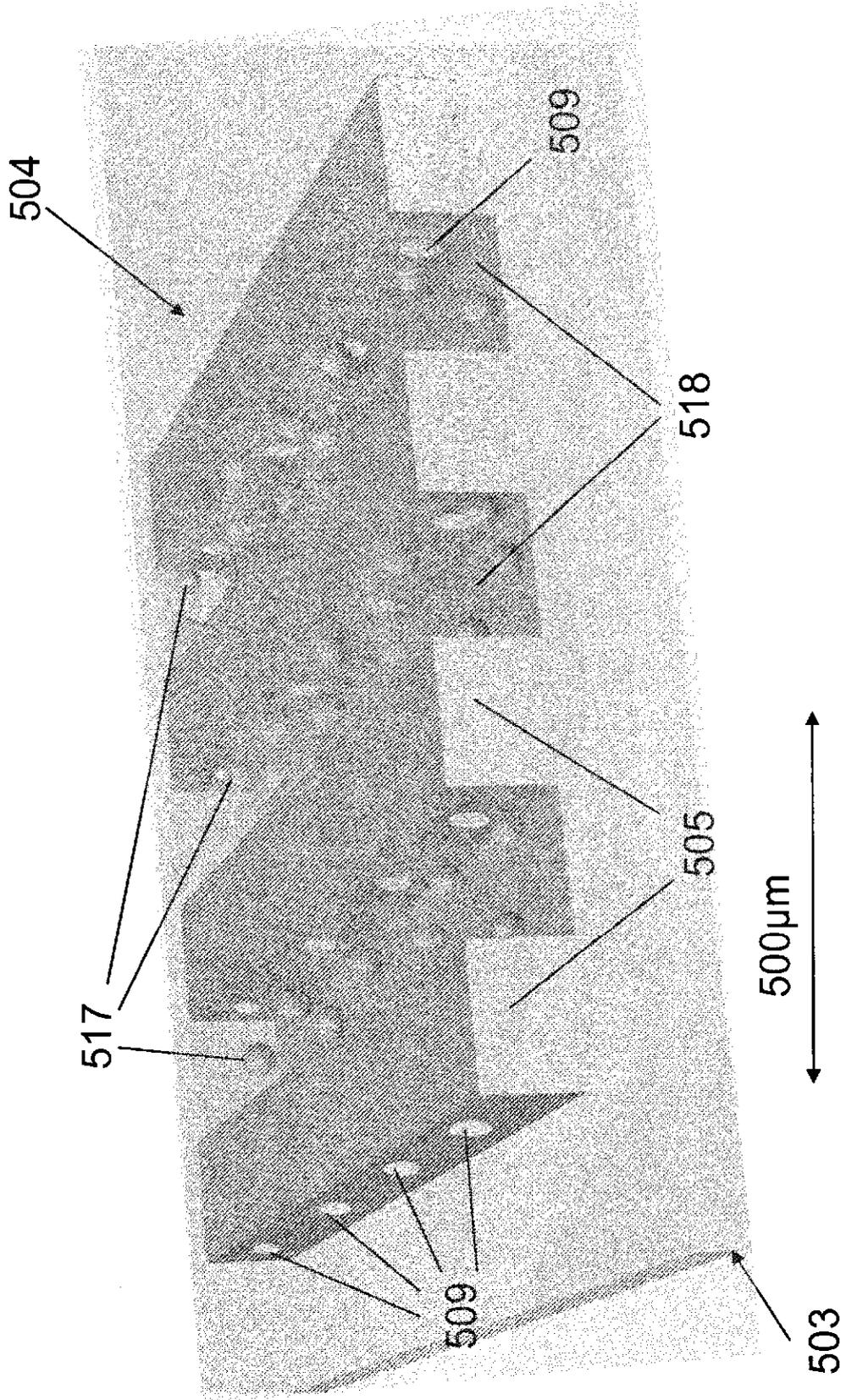


FIG. 5

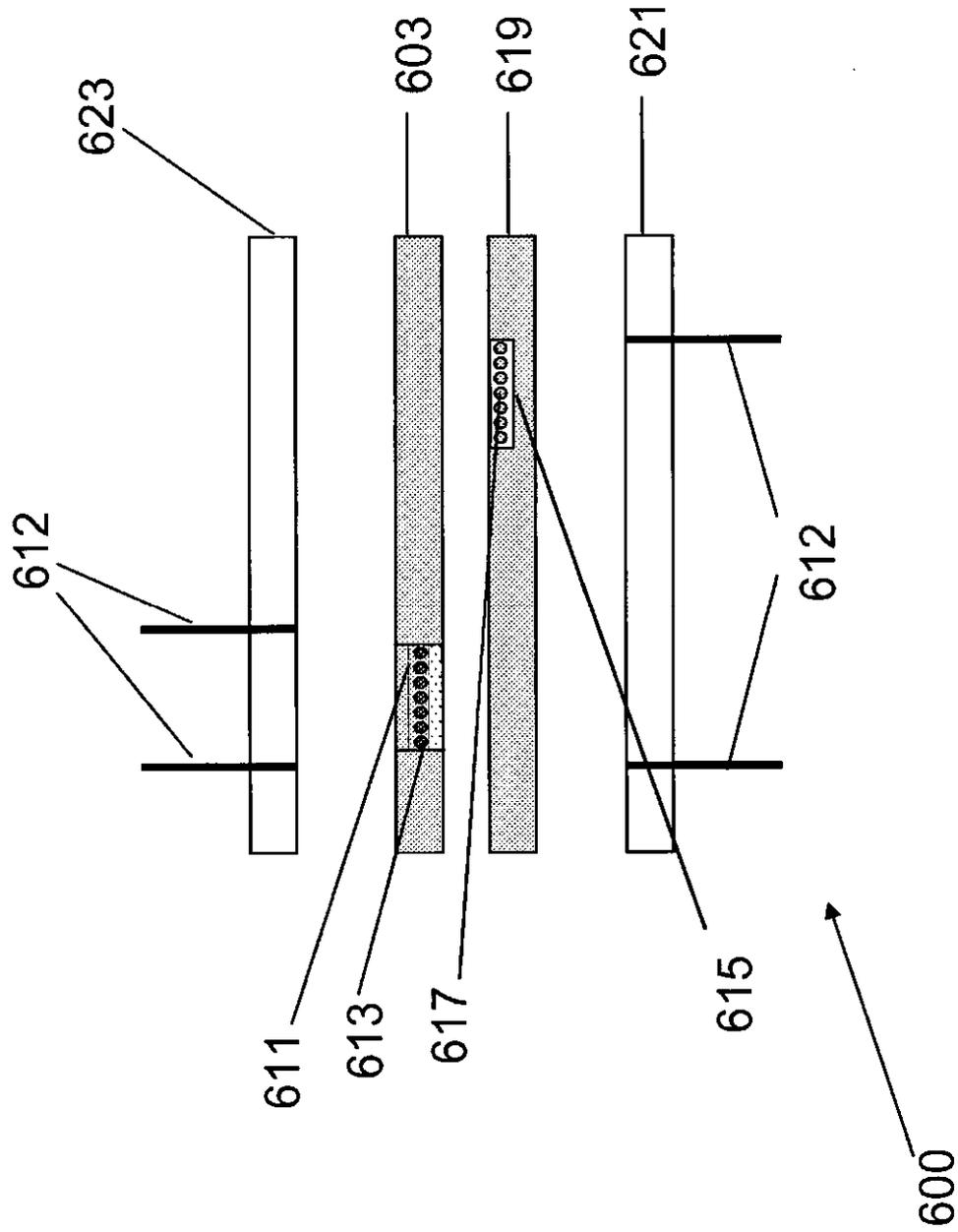
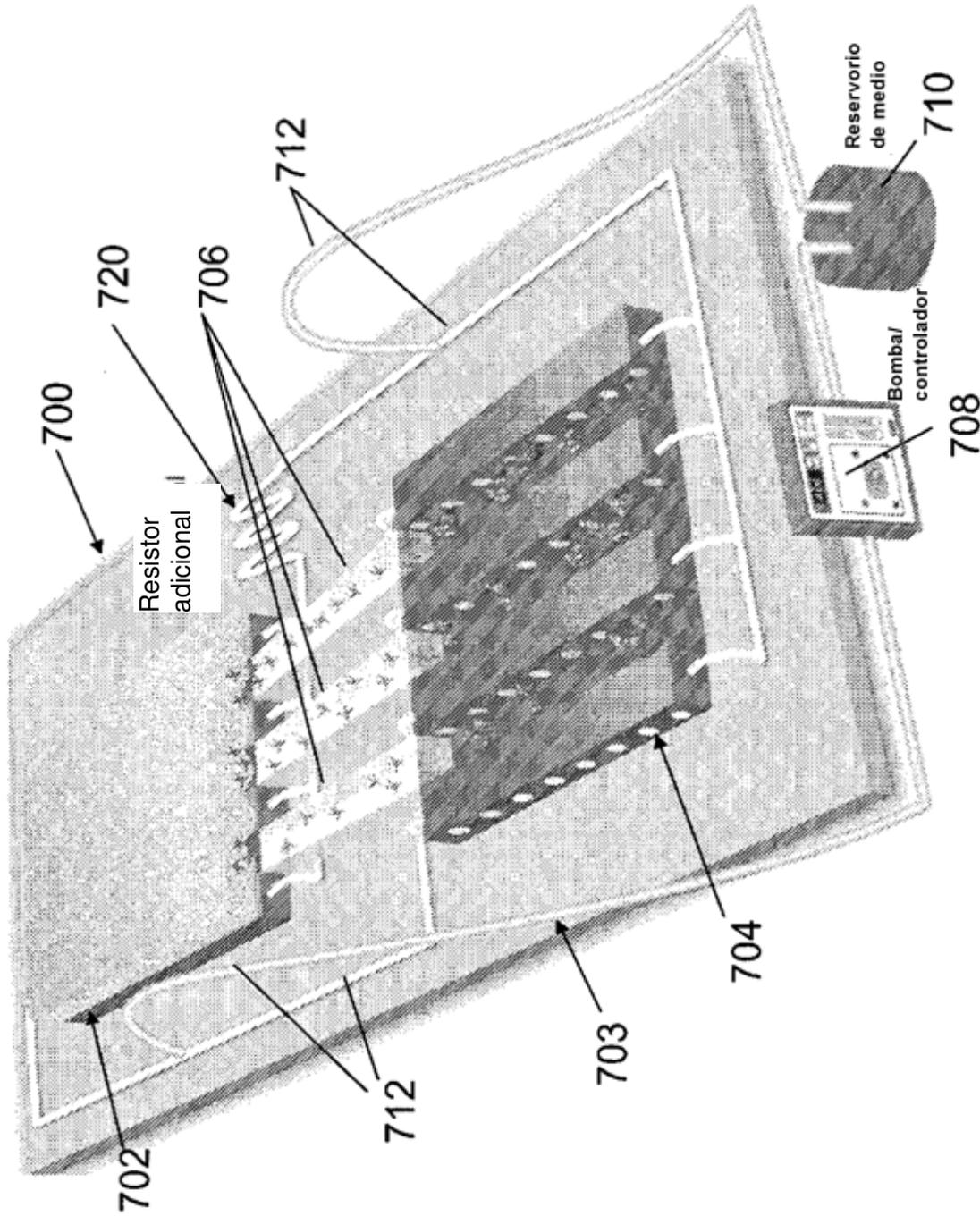


FIG. 6



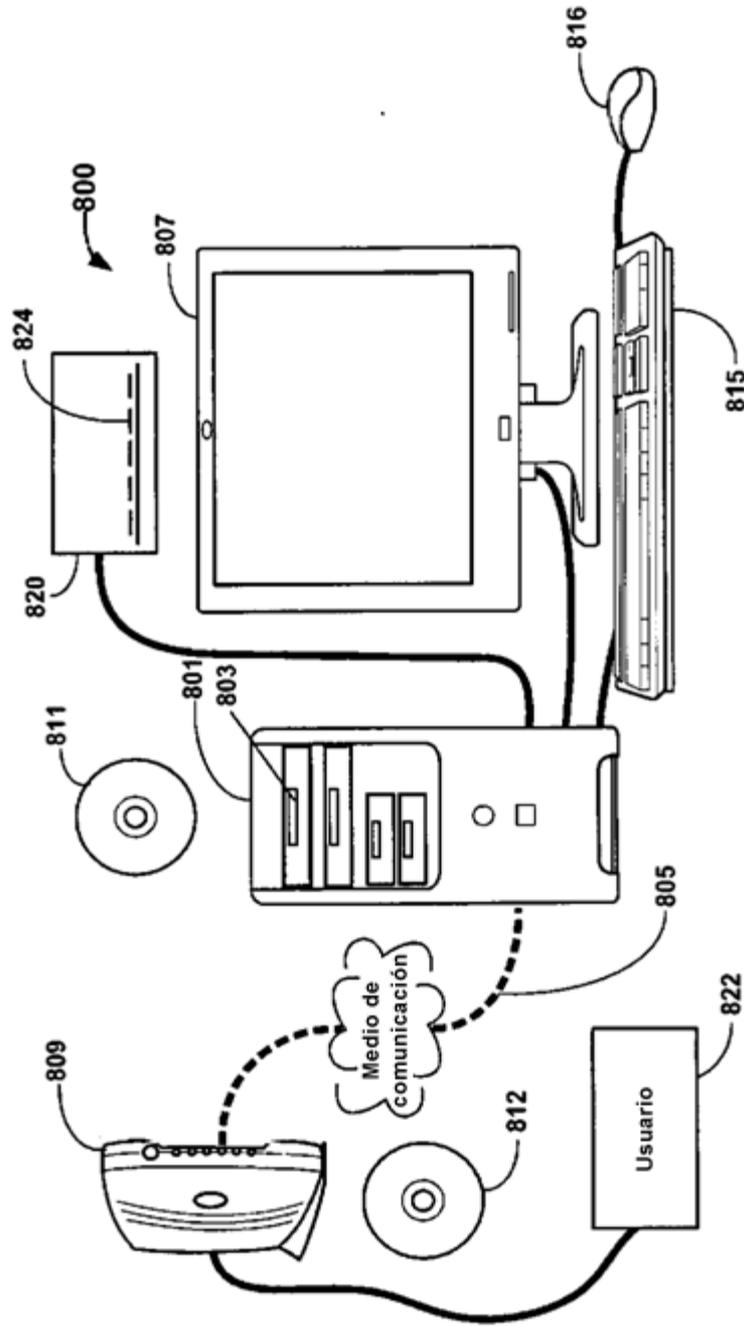


Fig. 8

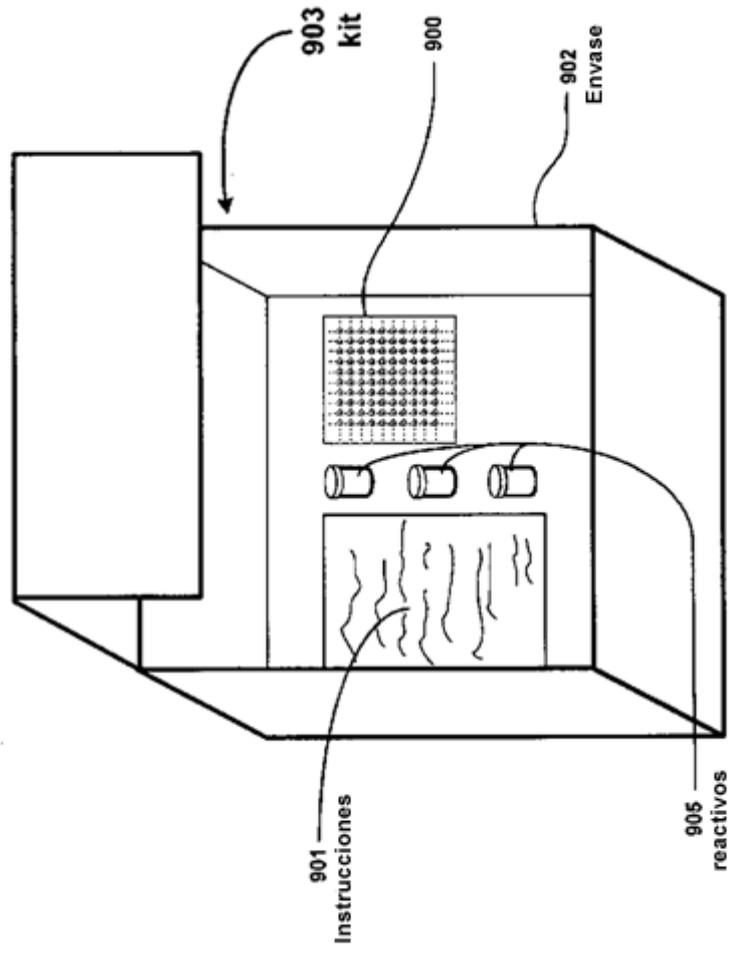


Fig. 9