



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 175**

51 Int. Cl.:

A61K 35/36 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99942356 .9**

96 Fecha de presentación : **17.08.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1112077**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2001**

54

Título: **Procedimiento para la detección de factores biológicos en la epidermis.**

30

Prioridad: **18.08.1998 US 97025 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.05.2011

73

Titular/es: **DERMTECH INTERNATIONAL**
15222-B Avenue of Science
San Diego, California 92128, US

72

Inventor/es: **Rheins, Lawrence, A. y**
Morhenn, Vera, B.

74

Agente: **Morgades Manonelles, Juan Antonio**

ES 2 358 175 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

Procedimiento para la detección de factores biológicos en la epidermis.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento de detección de factores biológicos en la epidermis, en el que el factor biológico puede ser un polinucleótido o polipéptido codificado por el polinucleótido o un lípido.

10 Antecedentes

Las células y los tejidos se ven influidos por agentes endógenos y exógenos y responden con una cascada de actividades biológicas para proporcionar una respuesta a un agente. Por ejemplo, la piel es la zona donde se producen muchas reacciones dermatológicas provocadas por la exposición de la piel a agentes exógenos. La piel es asimismo el órgano más accesible del organismo. Por lo tanto, la propia piel se presta a acceder a la determinación de reacciones proteicas, así como, el / los gen(es) y productos génicos que están asociados con o que dan lugar a una reacción particular.

La epidermis es la capa más externa de la piel. Dicha capa contiene cuatro tipos principales de células. La célula de mayor predominio en la epidermis es el queratinocito en diversas etapas de diferenciación. La epidermis mantiene su grupo de queratinocitos mediante la mitosis de dichas células en la capa celular basal, la capa inferior de la epidermis. En cambio, la capa de recubrimiento superior de la epidermis es la capa córnea que, en la piel normal, no contienen células nucleadas. Los queratinocitos producen una serie de citocinas tales como las interleucinas (IL) IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 y el factor estimulante de colonias de granulocitos - macrófagos (GM-CSF) Kupper, M., 1993. Am. J Dermatopathol 11: 69-73). Por encima de la capa celular basal, se encuentra el de células de Langerhans, una célula inmunitaria competente que se origina en la médula ósea. La célula de Langerhans presenta características de los macrófagos así como de los linfocitos T y se considera responsable de iniciar una serie de eventos que conducen a reacciones inmunitarias de la piel tales como la dermatitis de contacto. El melanocito es la célula productora de pigmentos de la piel. Dicha se encuentra habitualmente asimismo en las capas más profundas de la epidermis. El cuarto tipo de célula de la epidermis es la célula de Merkel.

Inmediatamente debajo de la epidermis, se encuentra la capa dérmica que contiene principalmente fibroblastos, linfocitos, mastocitos, células endoteliales y terminaciones nerviosas. Los fibroblastos son el tipo principal de célula que deposita el material de la matriz extracelular y las proteínas estructurales de la piel, tales como el colágeno. Las células endoteliales recubren las luces de los capilares dérmicos y los mastocitos contienen histamina que se puede liberar en las respuestas inflamatorias de la piel.

La inflamación de la piel puede ser el resultado de una amplia gama de agentes externos aplicados a la piel. Las clases de dermatitis de contacto comprenden mecanismos irritativos, alérgicos, fotoalérgicos y fototóxicos y subclínico. Desde un punto de vista clínico, las reacciones son prácticamente idénticas con la aparición de un proceso eczematoso caracterizado por eritema, edema y vesiculación (Hoefakker et al. 1995 Contact Dermat 33: 258-266; Krasteva, M. 1993 Int. J. Dermatol 32: 547-560). La urticaria de contacto es una respuesta potencial adicional a la aplicación cutánea de diversos agentes que se diferencia en la aparición inmediata de una roncha al entrar en contacto con la piel. Resulta importante para los pacientes categorizar el mecanismo de la reacción de contacto. Ello se debe a las consecuencias inmunológicas de una reacción alérgica o inmunitaria que provoque una inflamación cada vez más grave de la piel con la reexposición tras la sensibilización. Por ejemplo, la caracterización del tipo de respuesta inflamatoria a la exposición de un agente puede permitir tanto a los pacientes como a los fabricantes la posibilidad de adquirir y rediseñar sus productos para evitar futuras reacciones inflamatorias.

La frecuencia y el historial de la dermatitis de contacto han proporcionado el impulso para aplicar las pruebas en la piel humana de todos los nuevos medicamentos tópicos o productos cosméticos. Se requiere actualmente realizar un gran número de pruebas de seguridad de la piel antes de cualquier producto destinado a entrar en contacto con la piel se pueda comercializar en muchos países. Las pruebas predictivas con parches cutáneos con el producto y sus constituyentes han constituido la base de este procedimiento de prueba. Desde el inicio de estas pruebas predictivas con parche cutáneos, un problema importante ha sido la incapacidad de diferenciar claramente una dermatitis de contacto irritativa (ICD) de una dermatitis de contacto alérgica (ACD). Además, la prueba con parches simplemente no resulta suficiente para determinar cuantitativamente la gravedad de una reacción ya que depende de puntuaciones cualitativas visuales del eritema, el edema y la vesiculación.

Constituye un objetivo de la presente invención superar las limitaciones descritas anteriormente. Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento no invasivo para detectar un factor biológico en las células cutáneas por debajo del estrato córneo. La caracterización del factor biológico resulta útil para distinguir las reacciones sistémicas así como las reacciones locales tales como la dermatitis de contacto y, más específicamente, para distinguir la dermatitis de contacto irritativa (ICD) de la dermatitis de contacto alérgica (ACD).

65

La presente invención proporciona un procedimiento para cuantificar la expresión relativa de un ácido ribonucleico (ARN) de una muestra de piel obtenida mediante la aplicación de una cinta adhesiva a la piel y proceder a la abrasión de la piel para obtener una muestra adherida a la cinta adhesiva, en la que el ARN codifica una citocina, que comprende:

- 5 (a) detectar el ARN que codifica una citocina de la muestra de piel; y
 (b) comparar el nivel de dicho ARN de la muestra de piel con una muestra de control, cuantificando de este modo la expresión relativa de dicho ARN.

10 Se puede diagnosticar la ICD en un paciente mediante la cuantificación del polinucleótido que codifica la IL-8 en las células del subestrato córneo del paciente, en las que la presencia del ARNm de la IL-8 en una ausencia relativa de IL -4 y IL-13 es indicativa de la ICD.

15 Se puede diagnosticar la ACD en un paciente mediante la cuantificación del polinucleótido que codifica la IL-4 a partir de células del subestrato córneo del paciente, en las que la presencia del ARNm de la IL-4 es indicativa de la ACD.

20 Se puede diagnosticar asimismo la ACD detectando la expresión de la IL-13 en un paciente comprendiendo la cuantificación de un polinucleótido que codifica la IL-13 en células cutáneas del paciente, en las que una cantidad elevada del polinucleótido de la IL-13 es indicativa de la ACD.

25 Un kit para obtener muestras de la piel de un modo no invasivo puede comprender una cinta para la recogida de células y una zona intermedia de lisis celular o un chip informático apto para conservar los ácidos nucleicos de la muestra de piel.

Alternativamente, un kit puede comprender una cinta para la recogida de células y una zona intermedia de lisis celular y un reactivo de detección, tal como un reactivo de hibridación.

30 Se puede identificar un compuesto que provoca dermatitis mediante el contacto con una sección de la piel con un compuesto de ensayo y, posteriormente, detectar la presencia de un polinucleótido que codifica una citocina o un polipéptido de una citocina, siendo la presencia del polinucleótido indicativa de una dermatitis. El procedimiento se puede realizar in vivo o in vitro, comprendiendo la utilización de constructos cutáneos organotípicos tridimensionales.

35 Los detalles de una o más formas de realización de la presente invención se establecen en los dibujos adjuntos y la descripción posterior. Otras características, objetivos y ventajas de la presente invención se pondrán claramente de manifiesto a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

40 La figura 1 ilustra una exposición de un gel que representa los resultados para el análisis de protección de la ribonucleasa (RPA) realizado con ARN obtenido mediante abrasión con cinta adhesiva en tres áreas distintas de la zona humeral de los brazos de un mismo paciente. Se realizó 12 veces la abrasión de cada una de las tres zonas. Se utilizaron cuatro sondas de ARN distintas (IL-4, IL-8, L32, GADPH) para la hibridación con el ARN de las muestras obtenidas del mismo paciente. El carril 1 muestra el ARN aislado de una zona eritematosa de la piel, que se indica clínicamente como eritema 2+ que se provocó con escuarato (ACD). En el carril 3 se muestra el ARN aislado de una zona de la ICD eritematosa (indicada como 2+) provocada con laurilsulfato sódico al 0,5% (SLS). Ambos carriles ponen de manifiesto una banda de IL-8. El carril 2 representa la muestra obtenida a partir de la piel no inflamada, de aspecto normal, del mismo paciente. En el carril 1 se puede observar una banda de la citocina IL-4 que se ha obtenido en una reacción alérgica.

50 La figura 2 representa los resultados del RPA realizado con ARN obtenido mediante la abrasión con cinta adhesiva en tres áreas distintas de la zona humeral de los brazos de cuatro pacientes distintos. En dicho gel se dispusieron ribosondas para 6 ARN distintos (IL-4, IL-8, IL-9, IL-13, IL-14 y una isoforma de la óxido nítrico sintasa (iNOS)), además de dos genes de mantenimiento. El signo "+" indica que la piel obtenida del paciente se ha tratado tanto con SLS (segunda hilera en la parte inferior de la figura) como con escuarato (tercera hilera en la parte inferior de la figura).

Descripción detallada

60 La presente invención proporciona un procedimiento no invasivo para recoger un factor biológico, tal como un polinucleótido, a partir de células de la piel por debajo del estrato córneo. Dichos factores biológicos se pueden caracterizar para que indiquen la presencia de una respuesta local o sistémica en el paciente. El procedimiento se puede utilizar para distinguir todos los tipos de dermatitis de contacto, entre ellos la subclínica. Se puede distinguir una reacción irritativa de una reacción alérgica mediante la detección de un factor biológico, por ejemplo, un polinucleótido que codifica una citocina, obtenido de la piel. Se pueden obtener muestras que contengan ácidos nucleicos de un modo no invasivo.

Las reacciones inflamatorias presentan a menudo manifestaciones clínicas similares. A fin de tratar adecuadamente un paciente que presente una reacción inflamatoria se ha de realizar una identificación correcta de la reacción. Por una "manifestación clínica similar" se entiende que dos o más reacciones presentan un aspecto clínico y/o histológico en conjunto globalmente similar. Por ejemplo, la dermatitis de contacto en la piel puede estar provocada por una amplia gama de agentes externos que entran en contacto con la piel. Las clases de dermatitis de contacto comprenden mecanismos irritativos, alérgicos, fotoalérgicos y fototóxicos y subclínicos. Desde un punto de vista clínico, las reacciones son prácticamente idénticas en apariencia a un proceso ecematoso caracterizado por eritema, edema y vesiculación. El eritema, el edema y la formación de vesículas de la ICD y la ACD pueden ser indistinguibles. Aunque histológicamente, los dos procesos pueden mostrar únicamente diferencias sutiles y éstas únicamente durante las primeras 24 horas de la reacción.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "ácido nucleico", "polinucleótido," o "secuencia de ácido nucleico" se refieren a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, en forma de un fragmento independiente o como componente de una construcción superior. Las secuencias de polinucleótidos o de ácido nucleico de la presente invención comprenden el ADN, el ARN, entre ellas las secuencias de ARNm y ADNc.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos en forma de un fragmento independiente o como componente de una construcción superior. Un ejemplo de un polipéptido comprende las secuencias de aminoácidos que codifican una citocina o fragmentos de la misma. Un polipéptido puede codificar una proteína funcional o fragmentos de una proteína. Por ejemplo, un polipéptido IL-4 comprende la secuencia de toda la longitud de la proteína IL-4, así como fragmentos de la misma que consistan en un polímero de aminoácidos.

Tal como se utiliza en la presente memoria "citocina" significa cualquier número de factores que desempeñan un papel en la regulación o la diferenciación celular. Por ejemplo, las citocinas pueden comprender la familia de las interleucinas (IL) entre ellas las IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, IL-14 así como los factores que pertenecen a la superfamilia del factor transformante del crecimiento β (TGF- β), el GM-CSF y el interferón.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "factor biológico", significa una serie de factores que presentan actividad biológica o desempeñan un papel biológico. Por ejemplo, los factores biológicos comprenden polinucleótidos, tales como el ADN, ARN, ARNm y ADNc, polipéptidos, tales como las proteínas IL-4, IL-8, y IL-13 y fragmentos de las mismas, así como lípidos tales como el colesterol, los ácidos grasos y sustancias que intervienen en las inflamaciones tales como los leucotrienos, las prostaglandinas y otros.

El término "piel" significa un tejido que comprende una lámina de células, de una o varias capas de espesor, que se organiza encima de una lámina basal, y a menudo especializada para la protección mecánica o el transporte activo. En una forma de realización preferida, la piel es la piel de un mamífero. En una forma de realización más preferida, la piel es la piel humana. La epidermis de la piel humana comprende varias capas distintas de tejido cutáneo. La capa más profunda es la capa del estrato basal, que está constituido por células cilíndricas. La capa suprayacente es el estrato espinoso, que se compone de células poliédricas. Las células empujadas por el estrato espinoso se aplanan y sintetizan gránulos de queratohialina para formar la capa del estrato granuloso. A medida que dichas células se desplazan hacia el exterior, pierden sus núcleos, y los gránulos de queratohialina se funden y se mezclan con tonofibrillas. Ello forma una capa transparente denominada estrato lúcido. Las células del estrato lúcido se encuentran muy apretadas entre sí. A medida que las células ascienden desde el estrato lúcido, se comprimen en muchas capas de escamas opacas. Dichas células son los restos aplanados de células que se han llenado completamente de queratina y que han perdido cualquier otra estructura interna, comprendiendo los núcleos. Dichas escamas constituyen la capa externa de la epidermis, la capa córnea. En la parte inferior de la capa córnea, las células están muy compactadas y se adhieren fuertemente entre sí, pero más arriba en el estrato se disponen holgadamente y, eventualmente, se descaman en la superficie.

El término "muestra" se refiere a cualquier preparación obtenida de la piel de un paciente. Por ejemplo, se puede utilizar una muestra de células obtenidas utilizando el procedimiento no invasivo descrito anteriormente para aislar polinucleótidos, polipéptidos o lípidos. Además, el procedimiento de la presente invención se puede utilizar in vitro, por ejemplo, con células de la piel cultivadas en un soporte sólido o semisólido y constructos cutáneos organotípicos. En dichos casos, las células cutáneas pueden tener cualquier origen. Un factor biológico obtenido de cualquier muestra in vitro o in vivo, en forma purificada o no purificada, se puede utilizar como material inicial para detectar la actividad biológica, tal como una dermatitis, siempre que contenga el factor biológico de interés. Por ejemplo, se puede utilizar una muestra para detectar una dermatitis detectando polinucleótidos, siempre que contenga, o se sospeche que contiene, la secuencia de polinucleótido específica que codifica un polipéptido, tal como una citocina, que es indicativa de una dermatitis.

En el presente procedimiento se obtiene una muestra de un modo no invasivo y la muestra se puede utilizar como fuente para obtener factores biológicos en la detección, diagnóstico o pronóstico de diversas enfermedades, trastornos o reacciones inflamatorias.

Se utiliza un procedimiento no invasivo para obtener una muestra de piel para utilizar en el aislamiento de factores biológicos, por ejemplo, ácidos nucleicos y/o polipéptidos, a fin de detectar una reacción de dermatitis.

La capa epidérmica de la piel se retira utilizando una cinta adhesiva, por ejemplo, cinta adhesiva para embalaje (cinta adhesiva para embalaje 333, productos de cinta Nashua) o cinta Scotch® (3M Scotch 810, St. Paul, MN). Sin embargo, el procedimiento preferido comprende utilizar D-SQUAME® (CuDerm, Dallas, TX) para realizar la abrasión de la capa de células cutáneas. De este modo, se retira la piel con la cinta y las células y el material celular retirado se recupera a continuación de la cinta. Por ejemplo, la cinta utilizada para obtener células y material celular de la piel se puede centrifugar en un tubo de microcentrifugación estéril que contiene una disolución amortiguadora lítica.

La misma disolución amortiguadora lítica se puede reutilizar para cada fragmento de cinta adhesiva utilizado en una sola zona de piel. En determinadas aplicaciones, el procedimiento de la abrasión con cinta se puede combinar con el procedimiento de raspado para retirar células y material celular de la piel, es decir, utilizando un instrumento rígido, por ejemplo, un bisturí estéril del n.º 15. La muestra obtenida se puede procesar a continuación, por ejemplo, para aislar ácidos nucleicos, polipéptidos o lípidos. Preferentemente, el procedimiento utilizado no afecta negativamente al polinucleótido, al polipéptido, o al nivel de lípidos que se determina.

Un procedimiento rápido y no invasivo permite obtener polinucleótidos, tales como ARNm, que resultan útiles para determinar los cambios en los patrones de síntesis de las células de cutáneas. Se ha demostrado que el proceso de abrasión con cinta en sí no afecta al perfil de citocinas de la piel durante las primeras horas tras realizar el procedimiento. Utilizando el procedimiento de abrasión, se puede identificar, distinguir o diagnosticar la presencia de una enfermedad, trastorno o una reacción inflamatoria locales o sistémicos, entre ellos las enfermedades genéticas. Se puede detectar cualquier reacción, enfermedad o trastorno que corresponda a una provocación de la transcripción y la síntesis de polipéptidos.

Se pueden aislar polinucleótidos a partir de células lisadas y material celular por medios muy conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se encuentran disponibles diversos productos comerciales para el aislar polinucleótidos, y se pueden utilizar entre ellos, pero sin limitarse a los mismos, TriReagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH). Los polinucleótidos aislados se pueden probar o analizar con respecto a determinadas secuencias de ácido nucleico, entre ellas un polinucleótido que codifique una citocina.

Alternativamente, se pueden obtener polipéptidos a partir de la muestra mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las preparaciones enteras de células obtenidas utilizando las técnicas no invasivas de la presente invención contienen polipéptidos. Por otra parte, los polipéptidos se pueden continuar aislando o purificando utilizando medios convencionales tales como la cromatografía preparativa y separaciones inmunológicas en las que participan anticuerpos monoclonales o policlonales. Los polipéptidos se pueden caracterizar a continuación para indicar la presencia de una reacción dérmica.

Un procedimiento para distinguir una reacción irritativa de una reacción alérgica en una muestra de piel detecta un polinucleótido que codifica una citocina. Utilizando el procedimiento de la presente invención, la cantidad relativa de ciertas citocinas con respecto a una muestra de tejido normal o estándar distingue el tipo de reacción y/o la gravedad de las reacciones.

Aunque los ensayos clínicos existentes no pueden distinguir una reacción irritativa de una reacción alérgica en el tejido, el procedimiento no invasivo de la presente invención puede distinguir entre las dos reacciones mediante sus perfiles de expresión de las citocinas relativas. La dermatitis de contacto irritativa se puede distinguir de la dermatitis de contacto alérgica por la presencia o ausencia de un polinucleótido que codifica una citocina o el polipéptido de la citocina. Por ejemplo, las células de la ICD presentaban unos niveles indetectables del polinucleótido que codifica la IL-4 en comparación con los polinucleótidos de las células de las lesiones de ACD según el procedimiento utilizado. Por consiguiente, el proceso puede emplear, por ejemplo, ADN o ARN, comprendiendo el ARN mensajero (ARNm), aislado de un tejido. El ADN o ARN puede ser monocatenario o bicatenario. Cuando se obtiene el ARN, se pueden utilizar los enzimas y las condiciones óptimas para la transcripción inversa del molde de ADN muy conocidos en la técnica. Alternativamente, se puede someter el ARN a ensayos de protección de la ribonucleasa. Se puede utilizar asimismo un híbrido ADN-ARN que contenga una cadena de cada uno. Se puede emplear asimismo una mezcla de polinucleótidos, o se pueden utilizar asimismo los polinucleótidos producidos en una reacción de amplificación anterior, utilizando iniciadores iguales o distintos. En el caso en el que la secuencia del polinucleótido se va a amplificar, la secuencia del polinucleótido puede ser una fracción de una molécula más grande o puede estar presente inicialmente como una molécula discreta, de tal modo que la secuencia específica es el ácido nucleico entero. No resulta necesario que la secuencia a amplificar se encuentre presente inicialmente en una forma pura; puede ser una fracción pequeña de una mezcla compleja, tal como la contenida en el ADN humano entero.

Además, se pueden utilizar ensayos de protección de la ribonucleasa si el ARN es el polinucleótido obtenido de la muestra. En dicho procedimiento, se hibrida una sonda de ARN antisentido marcado con el polinucleótido complementario de la muestra. La sonda monocatenaria sin hibridar restante se degrada mediante el tratamiento con la ribonucleasa. La sonda bicatenaria hibridada se protege de la digestión de la ribonucleasa. Tras el período adecuado, los productos de la reacción de digestión se recogen y se analizan en un gel (véase, por ejemplo,

Ausubel et al. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY ("Protocolos actuales en Biología Molecular", sección 4.7.1 (1987)). Tal como se utiliza en la presente memoria, "la sonda de ARN" se refiere a un ribonucleótido que se puede hibridar con el ARN en una muestra de interés. Los expertos en la materia podrán identificar y modificar el ensayo de protección de la ribonucleasa específica para el polinucleótido a determinar, por ejemplo, se puede alterar la especificidad de la sonda, las temperaturas de hibridación, la cantidad de ácido nucleico, etc. Además, se encuentra disponible una serie de kits comerciales, por ejemplo, RiboQuant™ multi-Probe RNase Protection Assay System (Pharmingen, Inc., San Diego, CA).

Alternativamente, el polinucleótido de la muestra se puede analizar mediante inmunotransferencia de tipo Northern o Southern. En esta técnica los polinucleótidos se separan en un gel y a continuación se examinan con un polinucleótido complementario a la secuencia de interés. Por ejemplo, el ARN se separa en un gel transferido a nitrocelulosa y se examina con ADN complementario a la secuencia de interés. La sonda complementaria puede ser marcar radiactivamente, químicamente, etc. La hibridación de la sonda es indicativa de la presencia del polinucleótido de interés.

La detección de un polinucleótido que codifica una citocina se puede realizar por procedimientos convencionales, tales como el fraccionamiento del tamaño del ácido nucleico. Los procedimientos de fraccionamiento del tamaño del ADN y el ARN resultan muy conocidos por los expertos en la materia, tales como mediante electroforesis en gel, comprendiendo la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Por ejemplo, el gel puede ser un gel de urea-poliacrilamida-formamida 7 M y 8 M desnaturizante. El fraccionamiento del tamaño del ácido nucleico se puede realizar asimismo mediante procedimientos cromatográficos conocidos por los expertos en la materia.

La detección de polinucleótidos se puede realizar opcionalmente utilizando sondas marcadas radiactivamente. Se puede utilizar cualquier marcador radiactivo que proporcione una señal adecuada. Otros marcadores comprenden ligandos, tintes de colores y moléculas fluorescentes, que puede servir como elemento de enlace específico para un ligando marcado y similares. Se utilizan las preparaciones marcadas para examinar un polinucleótido mediante técnicas de hibridación de tipo Southern o Northern, por ejemplo. Los nucleótidos obtenidos a partir de las muestras se transfieren a filtros que se enlazan con los polinucleótidos. Tras la exposición a la sonda de polinucleótido marcada, que se hibrida con fragmentos de nucleótidos que contienen secuencias seleccionadas de ácido nucleico, el enlace de la sonda radiactiva con los fragmentos seleccionados de ácido nucleico se identifica mediante autorradiografía (véase Genetic Engineering ("Ingeniería Genética"), 1, ed. Robert Williamson, Academic Press (1981), p. 72-81). La técnica de hibridación particular no resulta esencial para la presente invención. Las técnicas de hibridación resultan muy conocidas o las verifica fácilmente un experto en la materia. A medida que mejoran las técnicas de hibridación, se pueden aplicar fácilmente en el procedimiento de la presente invención.

Los polinucleótidos que codifican el polipéptido pretendido se pueden amplificar antes de proceder a la detección. El término "amplificar" se refiere al proceso de realizar una pluralidad de copias del ácido nucleico a partir de una sola molécula de polinucleótido. La amplificación de polinucleótidos se puede realizar in vitro mediante procesos bioquímicos conocidos por los expertos en la materia. El agente de amplificación puede ser cualquier compuesto o sistema que funcione realizando la síntesis de productos de extensión del iniciador, comprendiendo enzimas. Los enzimas adecuados para este fin comprenden, por ejemplo, la ADN polimerasa I de E. coli, la Taq polimerasa, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de E. coli, la ADN polimerasa T4, otras ADN polimerasas disponibles, la mutéina polimerasa, la transcriptasa inversa, la ligasa y otros enzimas, entre ellos los enzimas termoestables (es decir, aquellos enzimas que realizan la extensión del iniciador tras someterse a unas temperaturas suficientemente elevadas para provocar la desnaturalización). Los enzimas adecuados facilitarán la combinación de los nucleótidos del modo adecuado para formar los productos de extensión del iniciador que son complementarias a cada cadena de nucleótidos mutante. En general, la síntesis se inicia en el extremo 3' de cada iniciador y continúa en la dirección 5' a lo largo de la hebra no codificante, hasta que finaliza la síntesis, produciendo moléculas de distintas longitudes. Pueden existir agentes de la amplificación, sin embargo, que inicien la síntesis en el extremo 5' y continúen en la otra dirección, utilizando el mismo proceso descrito anteriormente. En cualquier caso, el procedimiento de la presente invención no se limita a las formas de realización de la amplificación descritas en la presente memoria.

Un procedimiento de amplificación in vitro que se puede utilizar según la presente invención es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita en las patentes US n.º 4.683.202 y 4.683.195. El término "reacción en cadena de la polimerasa" se refiere a un procedimiento para amplificar una secuencia de bases de ADN utilizando una ADN polimerasa termoestable y dos iniciadores oligonucleótidos, uno complementario a la hebra (+) en un extremo de la secuencia a amplificar y el otro complementario a la hebra (-) en el otro extremo. Debido a que las hebras de ADN recién sintetizadas pueden servir posteriormente como moldes adicionales para las mismas secuencias iniciadoras, las rondas sucesivas de hibridación, alargamiento de la hebra y disociación producen una amplificación rápida y altamente específica de la secuencia pretendida. La reacción en cadena de la polimerasa se utiliza para detectar la presencia de polinucleótidos que codifican citocinas en la muestra. Los expertos en la materia conocen muchos procedimientos para la cadena de la polimerasa y se pueden utilizar en el procedimiento de la presente invención. Por ejemplo, el ADN se puede someter 30 a 35 ciclos de amplificación en un termociclador del siguiente modo: 95 °C durante 30 segundos, 52° a 60 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto, con una etapa de extensión final de 72 °C durante 5 minutos. En otro ejemplo, el ADN se puede someter a 35 ciclos de reacción en cadena de la polimerasa en un termociclador a una temperatura de desnaturalización de 95 °C durante 30

segundos, seguido por distintas temperaturas de hibridación comprendidas entre 54 y 58 °C durante 1 minuto, una etapa de extensión a 70 °C durante 1 minuto y una etapa de extensión final a 70 °C.

Los iniciadores para utilizar en la amplificación, los polinucleótidos se pueden preparar mediante cualquier procedimiento apto, tal como procedimientos convencionales con fosfotriéster y fosfodiéster o formas de realización automatizadas de los mismos, siempre que los iniciadores puedan hibridarse con el polinucleótido de interés. Un procedimiento para sintetizar oligonucleótidos sobre un soporte sólido modificado se describe en la patente US n.º 4.458.066. La longitud exacta del iniciador dependerá de muchos factores, entre ellos la temperatura, la amortiguación y la composición de los nucleótidos. El iniciador debe iniciar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor de la amplificación.

Los iniciadores utilizados son complementarios de cada hebra de la secuencia de nucleótidos a amplificar. El término "complementario" significa que los iniciadores se han de hibridar con sus hebras correspondientes en unas condiciones que permitan que funcione el agente de polimerización. En otras palabras, los iniciadores que son complementarios a las secuencias flanqueadoras se hibridan con las secuencias flanqueadoras y permiten la amplificación de la secuencia de nucleótidos. Preferentemente, el extremo 3' del iniciador que se ha extendido presenta una complementariedad perfecta de emparejamiento de bases con la hebra flanqueadora complementaria.

Los expertos en la materia conocerán diversos métodos de amplificación que se pueden utilizar asimismo para aumentar el número de copias del ácido nucleico seleccionado. Los polinucleótidos detectados se pueden ser analizar, detectar, clonar, secuenciar y similares adicionalmente, tanto en disolución o tras enlazarse a un soporte sólido, mediante cualquier método aplicado habitualmente a la detección de una secuencia específica de ácido nucleico, tal como otra reacción en cadena de la polimerasa, restricción de oligómeros (Saiki et al., *Bio/Technology* 3: 1008-1012 (1985)), análisis de sondas de oligonucleótidos específicos de alelos (ASO) (Conner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 80: 278 (1983), ensayos de ligación de oligonucleótidos (OLA) (Landegren et al., *Science* 241: 1077 (1988)), ensayos de protección de la ribonucleasa y similares. Se han revisado las técnicas moleculares para el análisis del ADN (Landegren et al., *Science*. 242: 229-237 (1988)) Tras la amplificación del ADN, el producto de la reacción se puede detectar mediante el análisis de inmunotransferencia de tipo Southern, sin utilizar sondas radiactivas. En este proceso, por ejemplo, se amplifican una muestra pequeña de ADN que contiene los polinucleótidos obtenida del tejido o paciente, y se analiza mediante una técnica de inmunotransferencia de tipo Southern. La utilización de sondas o etiquetas no radiactivas se ve facilitada por el nivel elevado de la señal amplificada. En una opción, un nucleósido trifosfato está etiquetado radioactivamente, lo que permite la visualización directa del producto de amplificación por autorradiografía. En otra, los iniciadores de amplificación se marcan con fluorescencia y pasan por un sistema de electroforesis. La visualización de los productos amplificados se realiza mediante la detección con láser seguida por la representación gráfica asistida por ordenador, sin una señal radiactiva.

Se puede utilizar la visualización simple de un gel que contiene los productos separados para determinar la presencia o la gravedad de una reacción de dermatitis. Por ejemplo, para realizar la tinción de un gel a fin de visualizar polinucleótidos separados, un cierto número de tinciones resulta muy conocido por los expertos en la materia. Sin embargo, se pueden utilizar asimismo otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, la densitometría de barrido, la exploración y cuantificación asistida por ordenador, entre otros.

Por lo tanto, se pueden utilizar los procedimientos descritos anteriormente para obtener de un modo no invasivo una muestra de tejido de un paciente que presenta presuntamente una dermatitis, tal como una reacción alérgica o irritativa, y aislar polinucleótidos de la muestra. Los polinucleótidos se pueden analizar a continuación utilizando métodos tales como, pero sin limitarse a, los descritos anteriormente. Cualquier número de niveles de citocinas se puede cuantificar mediante determinando su expresión relativa en la muestra obtenida y comparando dichos niveles con muestras estándar normales. Por ejemplo, el / los nivel(es) de ARNm en un cambio celular cuando la producción de proteínas de la piel aumenta o disminuye. Por lo tanto, una determinación del ARN, en particular ARNm, proporciona un seguimiento de episodio(s), tal como sucede con las reacciones inflamatorias de la piel o como resultado de una respuesta local o sistémica. Se reconocerá que las técnicas no invasivas actuales permiten detectar cualquier reacción, trastorno o enfermedad, siempre que el factor biológico se encuentre presente en la piel, más particularmente debajo del estrato córneo de la piel. Por ejemplo, y no a título limitativo, los presentes inventores han descubierto que el polinucleótido que codifica la citocina IL-4 se puede detectar en unos niveles más elevados en las lesiones por dermatitis alérgica de contacto (ACD) que en la piel normal o la piel de una lesión ICD. Además, los presentes inventores han descubierto que el polinucleótido que codifica la IL-13 se encuentra en una concentración superior en la piel con ACD que en la piel normal o con ICD. En cambio, el polinucleótido que codifica la IL-8 se encuentra en niveles más elevados tanto en el caso de la ACD como de la ICD en comparación con la piel normal. Por lo tanto, los niveles elevados del polinucleótido de la IL-8 se pueden utilizar en el diagnóstico para detectar una dermatitis de contacto general. Al utilizar los procedimientos de la presente invención, resulta posible cuantificar la gravedad de una reacción determinando los niveles de polinucleótidos que codifican citocinas en comparación con una muestra estándar normal.

El procedimiento para detectar una citocina a fin de distinguir las reacciones de dermatitis puede utilizar alternativamente la detección de un polipéptido de una citocina. El método para detectar un polipéptido de una

citocina en las células resulta útil para distinguir una reacción al determinar el nivel de una citocina en particular, por ejemplo, la IL-4, la IL-8 y/o la IL-13, en células obtenidas de un paciente que presuntamente presenta una reacción de dermatitis. Los niveles de dichas citocinas son indicativos de una reacción cuando se comparan con un perfil de polipéptidos de citocinas normal o estándar en un tejido similar. De este modo, el patrón de expresión de un polipéptido de una citocina puede variar en función del tipo y el grado de la reacción de dermatitis. En este sentido, la muestra obtenida, tal como se describe en la presente memoria, se puede utilizar como fuente para aislar polipéptidos. La medición de un polipéptido particular, por ejemplo la IL-4, puede servir como procedimiento de identificación de la ACD. Por ejemplo, tras la abrasión de la piel, utilizando los procedimientos descritos anteriormente, las células aisladas del estrato córneo se pueden lisar mediante diversos medios y se pueden obtener polipéptidos a partir de las células. Dichos polipéptidos se pueden cuantificar a continuación utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo mediante una prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA).

Los anticuerpos monoclonales para un polipéptido particular, por ejemplo, IL-4, IL-8, IL-13 y otros, se pueden utilizar en inmunoanálisis, por ejemplo en fase líquida o enlazados a un vehículo en fase sólida, para detectar el polipéptido asociado a un trastorno, tal como la dermatitis. Además, los anticuerpos monoclonales en dichos inmunoanálisis se pueden marcar de un modo detectable de diversas formas. Los ejemplos de tipos de inmunoanálisis que pueden utilizar anticuerpos monoclonales de la presente invención son los inmunoanálisis competitivos y no competitivos, tanto en un formato directo como indirecto. Los ejemplos de dichos inmunoanálisis son el radioinmunoanálisis (RIA) y el ensayo en sándwich (inmunométrico). La detección de antígenos del polipéptido utilizando los anticuerpos monoclonales de la presente invención se puede realizar utilizando inmunoanálisis que se ejecutan tanto en modo directo, inverso o modos simultáneos, comprendiendo pruebas de inmunohistoquímica en muestras fisiológicas. Los expertos en la materia conocen, o puede discernir fácilmente, otros formatos de inmunoanálisis sin experimentación indebida. Además, existen diversos anticuerpos disponibles comercialmente de las citocinas de interés.

El término "ensayo inmunométrico" o " inmunoanálisis en sándwich" comprende los inmunoanálisis en sándwich simultánea, en sándwich directo y en sándwich inverso. Dichos términos resultan muy conocidos por los expertos en la materia. Los expertos podrán apreciar asimismo que los anticuerpos resultarán útiles en otras variantes y formas de análisis que se conocen actualmente o que se puedan desarrollar en el futuro.

Los anticuerpos monoclonales se pueden enlazar a muchos vehículos distintos y se utilizan para detectar la presencia de un polipéptido de una citocina. Los ejemplos de vehículos conocidas comprenden el cristal, el poliestireno, el polipropileno, el polietileno, el dextrano, el nailon, las amilasas, las celulosas naturales y modificadas, las poliácridamidas, las agarosas y la magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser tanto soluble como insoluble. Los expertos en la materia conocerán otros vehículos aptos para el enlace de anticuerpos monoclonales, o podrán determinar qué experimentación rutinaria utilizar.

Un polipéptido de una citocina se puede detectar mediante los anticuerpos monoclonales cuando se encuentran presentes en fluidos biológicos y en los tejidos. Se puede utilizar cualquier muestra que contenga una cantidad detectable de citocina. Una muestra puede ser un líquido, tal como sangre, suero, etc., o un sólido o semisólido, tales como tejidos una muestra de piel o, alternativamente, un tejido sólido, tal como los utilizados habitualmente en el diagnóstico histológico.

Al realizar los ensayos se puede pretender incorporar determinados "bloqueadores" en el medio de incubación (habitualmente añadidos con el anticuerpo soluble marcado). Los "bloqueadores" se añaden para garantizar que las proteínas no específicas, las proteasas o las inmunoglobulinas antiheterófilas para las inmunoglobulinas anticitocinas presentes en la muestra experimental no se reticulen o destruyan los anticuerpos del soporte de la fase sólida, o el anticuerpo indicador radiomarcado, para producir resultados falsos positivos o falsos negativos. La selección de los "bloqueadores", por lo tanto, puede aumentar considerablemente la especificidad de los ensayos.

Se ha descubierto que un número de anticuerpos no pertinentes (es decir, no específicos) de la misma clase o subclase (isotipo) que los utilizados en los ensayos (por ejemplo, IgG1, IgG2a, IgM, etc.) se pueden utilizar como "bloqueadores". La concentración de "bloqueadores" (normalmente entre 1 y 100 µg/l) puede resultar importante a fin de mantener la sensibilidad adecuada pero inhibir cualquier interferencia no pretendida por proteínas que se presentan con reacción cruzada en la muestra.

Un kit para obtener muestras de la piel de un modo no invasivo puede comprender un dispositivo de recogida de células en forma de cinta adhesiva, que se puede utilizar asimismo con una superficie rígida, y un amortiguador de la lisis celular apto para conservar los ácidos nucleicos de la muestra de piel. Alternativamente el kit puede comprender una cinta adhesiva de recogida de células, un amortiguador de la lisis celular y un reactivo de detección de ARNm para distinguir las reacciones irritativas y alérgicas en un tejido. El kit comprende un reactivo de detección de polinucleótidos, por ejemplo un iniciador de un oligonucleótido complementario a una secuencia que codifica un polinucleótido de una citocina, tal como la IL-4. Dicho kit puede comprender asimismo unos medios de transporte compartimentados para alojar en uno o más recipientes herméticos, tales como frascos, tubos de ensayo y similares, comprendiendo cada uno de los recipientes uno de los elementos separados a utilizar en el procedimiento. Si se

encuentra presente, un segundo envase puede comprender un amortiguador de la lisis. El kit puede comprender alternativamente un chip de tipo ordenador en el que se alcanzará la lisis celular mediante corriente eléctrica.

El kit puede presentar asimismo unos recipientes que contengan nucleótidos para la amplificación o la hibridación de la secuencia seleccionada de ácido nucleico que se puede marcar o no, o un recipiente que comprenda un indicador, tal como una proteína de enlace con la biotina, tal como la avidina o la estreptavidina, enlazada a una molécula indicadora, como un marcador enzimático, fluorescente o radionúclido. El término "desoxirribonucleótido marcado de un modo detectable" se refiere a un modo de identificar desoxirribonucleótidos. Por ejemplo, el marcador detectable puede ser un nucleótido radiomarcado o una molécula pequeña enlazada covalentemente al nucleótido reconociéndose la molécula pequeña mediante una molécula grande muy caracterizada. Los ejemplos de dichas moléculas pequeñas son la biotina, que se enlaza mediante la avidina, y la tiroxina, que se enlaza mediante el anticuerpo antitiroxina. Los expertos en la materia conocen otros procedimientos de marcaje, comprendiendo los compuestos enzimáticos, fluorescentes, los compuestos quimioluminiscentes, los compuestos fosforescentes y los compuestos bioluminiscentes.

Los compuestos que pueden provocar una dermatitis se pueden detectar o identificar. En este procedimiento, las células de la piel, tales como células epidérmicas, comprendiendo los queratinocitos y los melanocitos, o las células dérmicas, tales como los fibroblastos, se encuentran en contacto con un compuesto de ensayo en unas condiciones que provocan una reacción de dermatitis. Las condiciones en las que se realiza el contacto son variables y dependerán del tipo de compuesto, el tipo y la cantidad de células de la piel a analizar, la concentración del compuesto en la muestra a analizar, así como el tiempo de exposición al compuesto. El experto en la materia sabrá cómo determinar las condiciones adecuadas en las que un compuesto puede provocar una dermatitis y que únicamente requerirá una experimentación rutinaria, si procede. Las células de la piel se pueden aislar utilizando las técnicas descritas anteriormente, mediante abrasión con cinta adhesiva, y a continuación las células se pueden exponer al compuesto de ensayo in vitro. Alternativamente, se pueden utilizar células cutáneas cultivadas o construcciones cutáneas. Por ejemplo, se pueden cultivar células cutáneas a partir de cualquier fuente en unas condiciones estándar de cultivo celular en un soporte sólido o semisólido hasta que lleguen a ser suficientemente confluentes. En el estado de confluencia o subconfluencia las células se exponen al compuesto de ensayo. A continuación se aíslan los polinucleótidos de las células que se han expuesto al compuesto y se cuantifican tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, y no a título limitativo, las células se pueden aislar mediante el procedimiento anterior de la cinta y aislar el ARNm. A continuación se cuantifica el ARNm utilizando las sondas para citocinas particulares. Alternativamente, se puede someter el ARNm a RT-PCR antes de la detección del polinucleótido. Tal como se ha descrito anteriormente, la cuantificación de un polinucleótido que codifica una citocina es indicativa de la dermatitis, por ejemplo, un aumento de la IL-4 en comparación con una muestra estándar es indicativo de la ACD y un aumento de la IL-8, sin un aumento de la IL-4 o la IL-13 es indicativo de la ICD.

La presente invención no se ha de limitar en su alcance a los ejemplos específicos que se exponen a continuación, que pretenden ser ilustraciones simples de aspectos individuales de la presente invención y los procedimientos y componentes funcionalmente equivalentes se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Recuperación no invasiva de las células del substrato córneo

Referencia: Recuperación utilizando una superficie rígida

Las células de la piel se pueden recuperar de un modo no invasivo mediante el raspado de la piel con un bisturí estéril #15. El bisturí se sujeta con un ángulo de aproximadamente 15 grados con respecto a la horizontal y se raspa repetidamente con suavidad un área de piel de un tamaño de aproximadamente 1 x 1 cm. Las células epidérmicas se transfieren a un pocillo de cultivo tisular estéril raspando la hoja contra la pared interior del pocillo. Cuando se alcanza la capa epidérmica brillante, se detiene el raspado antes de ocasionar una hemorragia, a fin de evitar contaminar el / los raspado(s) con sangre. Las células se depositan en una placa de Petri estéril de 1 cm y se añaden asimismo aproximadamente 300 µl de amortiguador de la lisis al cultivo. Se pipetea al amortiguador de la lisis arriba y abajo hasta que las células epidérmicas se lisan completamente.

Se añade el amortiguador de la lisis del ARN al cabo de 10 minutos de iniciar el raspado. El pocillo de cultivo tisular estéril se mantiene en hielo seco. Las células se disuelven en el amortiguador de la lisis del ARN, se transfieren a unos tubos de centrifugación con ribonucleasa libre y se extrae el ARN total.

Ejemplo: Recuperación utilizando una superficie adhesiva

Las células de la piel se pueden recuperar de un modo no invasivo utilizando cinta adhesiva (cinta adhesiva 333, productos de cinta Nashua), cinta Scotch® (Scotch® 3M 810, St. Paul, MN), o D-SQUAME® (CuDerm, Dallas, TX). Se realiza la abrasión de la piel hasta un máximo de 25 veces. Además, se reconocerá que cuanto más pegajosa sea la cinta, menos abrasión se requiere. Las células de la piel se recuperaron mediante la agitación y centrifugación de la cinta en un tubo Eppendorf sin ribonucleasa que contenía el amortiguador de la lisis. El mismo amortiguador de

la lisis se reutilizó para cada fragmento de cinta utilizado en una zona simple de la piel. Todo el procedimiento se realizó en menos de 90 minutos. El propio proceso de abrasión con cinta adhesiva no afecta al perfil de la citocinas de la piel durante las primeras horas tras realizar el procedimiento. Además, durante las primeras horas tras la abrasión no migran células inflamatorias de la circulación hacia la dermis o la epidermis.

Se extrajo inmediatamente el ARN de las células adheridas a la cinta y agitando enérgicamente la cinta en 0,5 ml de TriReagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH). A continuación se añadió ARN de transferencia de levadura (4 mg), como vehículo de ARN antes de aislar y purificar el ARN total según las instrucciones del fabricante. El ARN total aislado de cada muestra se utilizó en un ensayo de protección de ribonucleasa (RiboQuant® Multiprobe RNase Protection Assay System, PharMingen, Inc., San Diego, CA) sin medición previa de la cantidad de ARN mediante determinación de la densidad óptica (OD). Los ensayos se realizaron con muestras en geles de secuenciación con acrilamida y se utilizaron para identificar mensajes digeridos de citocinas. Los geles que contienen digerido bandas de ARN digerido se expusieron en primer lugar a una pantalla Phosphor Screen (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA). La pantalla expuesta se examinó a continuación con un generador de imágenes Storm 860 (Molecular Dynamics, Inc.). Las intensidades de las bandas de cada muestra se analizaron con el software ImageQuant™ (Molecular Dynamics, Inc.).

Se ha de ir con cuidado para evitar la contaminación de la ribonucleasa las muestras ya que la piel es una fuente importante de ribonucleasa que puede degradar rápidamente el ARN liberado de las células dañadas de la epidermis. Las técnicas de recogida y extracción de muestras descritas en la presente memoria demuestran que el ARN de la piel, de hecho, se puede obtener sin una degradación significativa como lo indica la capacidad de detectar el ARNm mediante el RPA.

Ejemplo 2

Análisis de las células obtenidas por la cinta Decapado

La dermatitis de contacto irritativa (DCI) se provocó aplicando laurilsulfato de sodio (SLS) al 0,5% en agua destilada durante 72 horas a la parte superior del brazo. Tras dicha exposición, se clasificó el eritema según la escala de puntuación estándar (Fisher's Contact Dermatitis, 4ª ed. Rietschel RL, & Fowler, Jr. JF eds. Williams & Wilkins, Baltimore, 1995, p. 29). La dermatitis de contacto alérgica (ACD) se provocó aplicando escuarato de dibutilo en acetona a la parte superior del brazo del mismo paciente bajo oclusión durante 48 horas. Las partes superiores de los brazos de la misma persona (paciente #1) se sometieron a abrasión con cinta adhesiva 12 veces y se procesaron tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2.

En la figura 1, el carril 1 muestra el ARN aislado de una zona eritematosa de la piel por ACD, que se indica clínicamente como eritema 3+, que se provocó con escuarato. El carril 3 es el ARN de la piel eritematosa por ICD, que se indica clínicamente como eritema 2+ provocado tras la exposición a SLS al 0,5%. Tras la exposición de la película de rayos X, la banda de la citocina IL-4 se puede observar claramente en el carril 1, pero no en el carril 3, que contiene ARN de las células de la ICD. De este modo, el patrón de citocinas en la reacción de la ACD difirió claramente de la reacción de la ICD y la piel normal observada en el carril 2.

En un experimento posterior, todos los pacientes con dermatitis presentaron un ARNm que codificaba la citocina IL-4 en las células de la piel en las zonas en que se había demostrado una reacción de ACD (carriles 8, 11, 13 de la figura 2). En cambio, la IL-4 no era visible en ninguna de las áreas de la piel tratadas con ICD o en las muestras de piel normal de los mismos pacientes. Además, en 4 de 5 pacientes (pacientes 2, 3, 4 y 5 de la figura 2), la IL-8 estuvo presente en las zonas eritematosas de la piel, si el eritema se provocó mediante una reacción irritativa o alérgica, pero no en el ARN obtenido de la piel normal. Por lo tanto, el ARNm de la IL-8 resultó genéricamente indicativo de dermatitis.

La codificación del ARNm de la IL-13, una citocina secretada por los linfocitos T activados, se presentó en 3 de las 4 áreas eritematosas de la piel (carriles 5, 8, 11, 13 de la figura 2) en la que se había provocado la inflamación alérgica con escuarato. Se puede observar una banda tenue en el / las área(s) aproximada(s) que se espera que contengan el ARNm con el peso molecular asociada al interferón γ (IFN- γ) (carriles 8 y 11 de la figura 2). Dichas bandas se presentaron en el ARNm extraído de 2 de las 5 muestras de piel tratada con escuarato (ACD). Tal como en el caso de la IL-13, la banda provisional para el ARNm del IFN- γ se observó en los mismos carriles que presentaban asimismo el ARNm para la IL-4.

La IL-14, un factor de crecimiento de los linfocitos B, se presentó en algunas de las muestras de piel tratadas con escuarato, así como en algunas de las muestras de piel tratadas con SLS (figura 2). La IL-9, una citocina multifuncional, se detectó en las 13 muestras que se pueden observar en este experimento. Además, el ARNm de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS) y la IL-9 se observaron en cada carril en que se podían visualizar con claridad (13 de 15 muestras) (Figura 2).

La presencia de la IL-4 en los mismo carriles que la IL-13 indica que estos dos marcadores de citocinas fueron inducidos por una reacción alérgica en la piel de la que se obtuvieron las muestras.

La cuantificación clínica del eritema observado en las diversas reacciones de la piel está documentada en las tablas 1 y 2.

TABLA 1

5

REACCIONES ACD							
PACIENTE	REACCIÓN DE LA PIEL	IL-4	IL-8	IL-9	IL-13	iNOS	IFN- γ
# 1	0	ND	ND	+	ND	+	ND
# 2	2+	+	+	NT	NT	NT	NT
# 3	2+	+	+	+	+	+	+
# 4	2+	+	+	*	+	*	+
# 5	2+	+	+	+	+	+	+
ND = no detectado		2+ = eritema moderado (rojo)					
* gel de leible							
NT = no analizado							

TABLA 2

REACCIONES ICD							
PACIENTE	REACCIÓN DE LA PIEL	IL-4	IL-8	IL-9	IL-13	iNOS	IFN- γ
# 1	0	ND	ND	+	ND	+	ND
# 2	2+	+	+	NT	NT	NT	NT
# 3	1+	ND	+	+	+	+	ND
# 4	1+ (bajo)	ND	ND	+	ND	ND	ND
# 5	3+	*	+	*	*	*	*
ND = no detectado		2+ = eritema moderado (rosado)					
* gel de leible		2+ = eritema moderado (rojo)					
NT = no analizado		3+ = eritema fuerte (rojo remolacha)					

10

Ejemplo 3

Para continuar examinando la relación entre las citocinas y el grado de inflamación en los pacientes 3 a 5, se normalizaron los niveles de ARN de la IL-4, IL-8 e IL-13 a los niveles de los genes de mantenimiento correspondientes (Tabla 3). Entre los tres pacientes analizados, existe una correlación entre los niveles de ARN y la gravedad de las reacciones. La Tabla 2 indica que las muestras de las reacciones más fuertes en la piel fueron los que demostraron la mayor cantidad relativa de IL-8 en la reacción de la ACD. Por ejemplo, el paciente # 4 con una reacción 2+ en la zona de la ACD y únicamente una reacción ligera (+1 baja) en la zona de la ICD presentaron una diferencia aproximada de dos veces las proporciones IL-8/GAPDH al comparar las reacciones de ICD y ACD utilizando el método del RPA descrito anteriormente. Además, se podría predecir una reacción de ACD si, en el gel, existe una banda para la IL-4 y un valor de IL-4/GAPDH aproximadamente de 0,001 o superior. Asimismo, una reacción de ACD se puede confirmar si existe una banda de la IL-13 con un valor IL-13/GAPDH aproximadamente de 0,13 o superior (Tabla 3).

25

TABLA 3

PACIENTE	TIPO DE REACCIÓN		
		ICD	ACD
	IL-4/GAPDH	NC	NC
3	IL-8/GAPDH	0,3495	0,8867
	iNOS / GAPDH	0,2202	0,2652
	IL-13/GAPDH	0,070	0,251
	IL-4/GAPDH	0	0,01559
4	IL-8/GAPDH	0,2879	0,61080
	iNOS/GAPDH	0,07107	0,2661
	IL-13/GAPDH	0,117	0,134
	IL-4/GAPDH	0	0,07255
5	IL-8/GAPDH	0,2541	1,3023
	iNOS/GAPDH	0,05315	0,1951
	IL-13/GAPDH	0,055	0,158
NC = no calculado			

Se ha descrito un cierto número de formas de realización de la presente invención. No obstante, se entenderá que se pueden realizar diversas modificaciones.

- 5 Por consiguiente, otras formas de realización se encuentran dentro del ámbito de aplicación de las reivindicaciones siguientes.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 La presente lista de referencias citadas por el solicitante se presenta únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque la recopilación de las referencias se ha realizado muy cuidadosamente, no se pueden descartar errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 4683202 A [0039]
- US 4683195 A [0039]
- US 4458066 A [0040]

10

Documentos que no corresponden a patentes citados en la descripción

- Kupper, M. *Am. J Dermatopathol.*, 1993, vol. 11, 69-73 [0003]
- Hoefakker et al. *Contact Dermat.*, 1995, vol. 33, 258-266 [0005]
- Krasteva, M. *Int. J Dermatol.*, 1993, vol. 32, 547-560 [0005]
- Ausubel et al. *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, 1987 [0034]
- Genetic Engineering, 1. Academic Press, 1981, 72-81 [0037]
- Saiki. *Bio/Technology*, 1985, vol. 3, 1008-1012 [0042]
- Conner et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 278 [0042]
- Landegren et al. *Science*, 1988, vol. 241, 1077 [0042]
- Landegren et al. *Science*, 1988, vol. 242, 229-237 [0042]
- Fisher's Contact Dermatitis. Williams & Wilkins, 1995, 29 [0061]

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para cuantificar la expresión relativa de un ácido ribonucleico (ARN) de una muestra de piel obtenida mediante la aplicación de una cinta adhesiva a la piel y proceder a la abrasión de la piel para obtener una muestra de la adhesión a la cinta, en el que el ARN codifica una citocina, que comprende:
- (a) detectar el ARN que codifica una citocina de la muestra de piel; y
(b) comparar el nivel de dicho ARN de la muestra de piel con una muestra de control, cuantificando de este modo la expresión relativa de dicho ARN.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la muestra de piel comprende las células del estrato córneo y las células asociadas al estrato córneo que se han obtenido al aplicar y retirar de la cinta adhesiva.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la detección comprende detectar ARNm.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección comprende detectar un ARN que codifica una interleucina.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la detección comprende detectar un ARN que codifica la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-2 (IL-2), la interleucina-3 (IL-3), la interleucina-4 (IL-4), la interleucina-5 (IL-5), la interleucina-6 (IL-6), la interleucina-8 (IL-8), la interleucina-9 (IL-9), la interleucina-13 (IL-13) y la interleucina-14 (IL-14), el factor estimulante de colonias de granulocitos - macrófagos (GM-SCF) o un interferón, o cualquier combinación de los mismos.
- 25 6. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la detección comprende detectar un ARN que codifica una sustancia que interviene en la inflamación.
- 30 7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la cinta adhesiva se aplica a la piel de un paciente afectado por una enfermedad, trastorno o reacción inflamatoria.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la cinta adhesiva se aplica a la piel de un paciente afectado por dermatitis.
- 35 9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la cinta adhesiva se aplica a piel que ha puesto en contacto con un agente externo que provoca dermatitis antes de aplicar la cinta.
10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la muestra de piel se obtiene de un mamífero.
- 40 11. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la muestra de piel se obtiene de un ser humano.

Figura 1

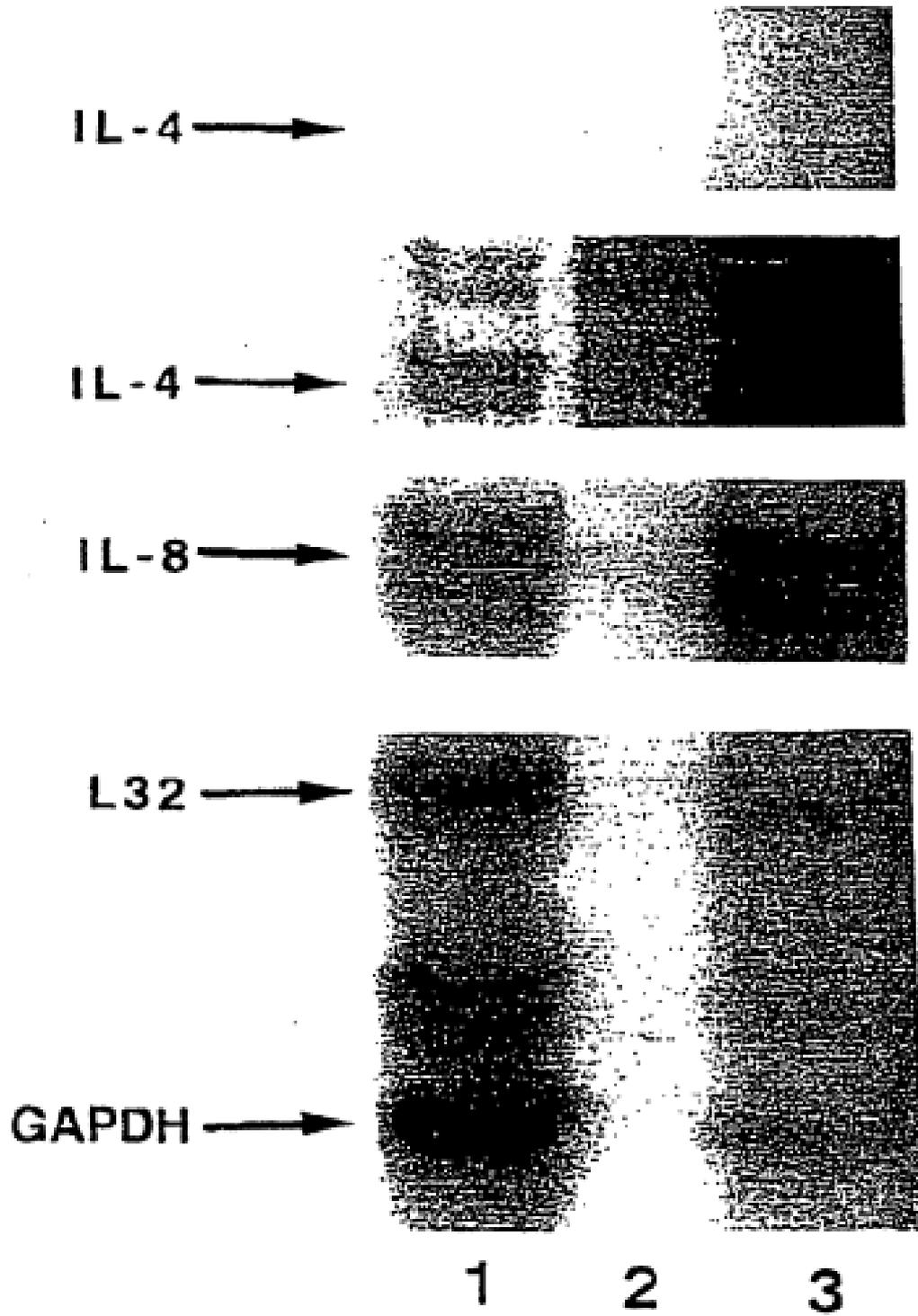


Figura 2

