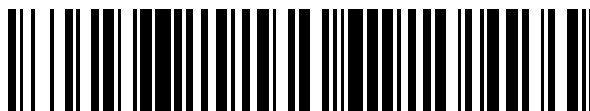


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 598**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2011** **E 11796780 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014** **EP 2524227**

54 Título: **Predicción de reacciones alérgicas**

30 Prioridad:

25.11.2010 GB 201020004

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

16.04.2014

73 Titular/es:

ALCYOMICS LTD (100.0%)
Bulman House, Regent Centre, Gosforth
Newcastle upon Tyne, Tyne and Wear NE33LS, GB

72 Inventor/es:

DICKINSON, ANNE

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 455 598 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

Predicción de reacciones alérgicas.

Esta presente invención se refiere a un método para predecir la inmunogenicidad y la hipersensibilidad o reacciones alérgicas a compuestos terapéuticos potenciales, cosméticos y sensibilizadores químicos. El método proporciona un ensayo *in vitro* que emplea células derivadas de sangre y piel cultivada y es de particular utilidad en la identificación y predicción de sensibilizadores de la piel y particularmente de agentes que pueden provocar dermatitis de contacto alérgica. Aunque no de conformidad con la invención como se reivindica, el ensayo de la presente invención proporciona *entre otros* métodos de tamizaje de genotecas de compuestos para la actividad de sensibilización y por lo tanto los kits.

10 ANTECEDENTES

La reacción de hipersensibilidad de tipo retardado de la dermatitis de contacto alérgica (ACD) se puede adquirir cuando un individuo sensibilizado, más tarde, se desafía con la misma molécula pequeña. La ACD se manifiesta durante la fase de provocación; después de la penetración de la epidermis y de la captación/procesamiento por una célula presentadora de antígeno (APC)- una célula especializada dentro de la piel, que presenta el alérgeno o antígeno a otras células conocidas como células T reclutadas por las quimocinas a la piel, que provocan su activación y la producción de altos niveles de linfoquinas. Estas moléculas dan lugar a una respuesta secundaria con inflamación de la piel y la apoptosis de los queratinocitos (célula de la piel). A diferencia de su pariente más cercano, la dermatitis de contacto irritativa (ICD), cuya causa son los irritantes (por ejemplo, jabón, detergentes, perfumes, etc) y que puede afectar a alguien que sucumbe a suficiente exposición, la ACD está influenciada por factores ambientales y genéticos y puede tardar muchos años en manifestarse, mucho después del contacto inicial. Con aproximadamente 20% de la población adulta en general que se cree que es alérgica a uno o más sensibilizadores químicos, y con una creciente lista de nuevos productos cosméticos y farmacéuticos que están disponibles, la ACD amenaza con ser un futuro problema de salud laboral y de consumo cada vez mayor. El desarrollo de métodos adecuados y sensibles para la evaluación del potencial de un producto químico para causar ACD será una etapa crucial en la lucha contra esta enfermedad. Con respecto a las alergias a los fármacos, estas rara vez se detectan en estudios no clínicos y generalmente sólo se observan en ensayos clínicos Fase 3 o durante la comercialización, cuando poblaciones más grandes están expuestas al fármaco. Aunque el número de fármacos que provocan reacciones alérgicas es relativamente bajo, el impacto potencial es muy alto debido a la etapa de desarrollo tardía en que se detecta. Por lo tanto, es necesario que los métodos no clínicos para predecir el potencial para producir reacciones alérgicas ayuden en la selección de los compuestos.

La identificación de los productos químicos que tienen el potencial de inducir reacciones de hipersensibilidad cutánea es un componente obligatorio de los nuevos descubrimientos de productos por las industrias farmacéuticas y de cosméticos. Históricamente, las pruebas de predicción se han basado exclusivamente en pruebas *in vivo* en animales. En la prueba tradicional en conejillo de indias, el producto se pinta sobre el cuerpo y el conejillo de indias después se inyecta con un producto químico adicional para ayudar a acentuar el efecto del producto químico de prueba en el desarrollo de la dermatitis. Como alternativa en la prueba de hinchazón de la oreja de ratón, las orejas del ratón se pintan con la sustancia de prueba y su respuesta inmunológica se determina por el examen del tejido de los ganglios linfáticos. Sin embargo, con una impresionante prohibición de la UE sobre las pruebas con animales que se acerca a su plena aplicación, hay una necesidad urgente para el desarrollo de alternativas de técnicas predicativas *in vitro* e *in silico*. Aunque se conoce a partir de la técnica anterior la calibración ascendente y/o regulación descendente de los productos de genes tales como citocinas estos ensayos son laboriosos y los resultados son inconsistentes. Actualmente existe el modelo *in vitro* no validado para predecir la inmunogenicidad y la hipersensibilidad o reacciones alérgicas a compuestos terapéuticos potenciales, cosméticos y sensibilizadores químicos.

En este contexto, el documento de la técnica anterior F.H.M. PISTOOR y otros: "Novel predictive assay for contact allergens using human skin explant cultures", AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY (publicado por la AMERICAN SOCIETY FOR INVESTIGATIVE PATHOLOGY) vol. 149, núm. 1, 1 enero 1996, páginas 337-343, ISSN: 0002-9440 describe un ensayo de explante de piel para identificar alérgenos y sensibilizadores, en el que las biopsias de piel se incubaron con compuestos de prueba y se observaron los cambios histológicos asociados las células dendríticas en dicha biopsia.

Hay por lo tanto una necesidad de un ensayo *in vitro* para discriminar entre sensibilizadores y no sensibilizadores para la predicción de la naturaleza de sensibilización de nuevos productos farmacéuticos, cosméticos y químicos. Existe una necesidad de un ensayo robusto, precisa y sencillo para los nuevos compuestos de prueba para la hipersensibilidad y reacciones alérgicas.

BREVE RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un método *in vitro* para identificar compuestos químicos que son sensibilizadores o no sensibilizadores y/o alérgenos o no alérgenos, el método comprende

- (i) preparar una muestra de sangre de donantes para aislar una población de células T y una población de células dendríticas derivadas de monocitos de ahí;
- (ii) incubar las células dendríticas derivadas de monocitos con un compuesto de prueba;
- 5 (iii) incubar las células dendríticas derivadas de monocitos tratadas con el compuesto con la población de células T aisladas en la etapa (i);
- (iv) incubar las células T y las células dendríticas derivadas de monocitos tratadas con el compuesto de (iii) con una muestra de biopsia de piel obtenida a partir del mismo donante; y
- (v) evaluar la hipersensibilidad y las reacciones alérgicas por cambios histológicos clasificados en la muestra de biopsia de piel tratada de (iv) en comparación con un control.
- 10 Preferentemente, la población de células T está comprendida en una población de células mononucleares de sangre periférica, de tal modo que el método comprende:
- (i) preparar una muestra de sangre del donante para aislar una población de células mononucleares de sangre periférica que comprende una población de células T y una población de células dendríticas derivadas de monocitos de ahí;
- 15 (ii) incubar las células dendríticas derivadas de monocitos con un compuesto de prueba;
- (iii) incubar las células dendríticas derivadas de monocitos tratadas con el compuesto con la población de células mononucleares de sangre periférica que comprende una población de células T aisladas en la etapa (i);
- (iv) incubar las células mononucleares de sangre periférica que comprende la población de células T y las células dendríticas derivadas de monocitos tratadas con el compuesto de (iii) con una muestra de biopsia de piel obtenida a partir del mismo donante; y
- 20 (v) evaluar la hipersensibilidad y reacciones alérgicas por cambios histológicos clasificados en la muestra de biopsia de piel tratada de (iv) en comparación con un control.
- Preferentemente, la evaluación de hipersensibilidad y reacciones alérgicas por cambios histológicos clasificados en la muestra de biopsia de piel en comparación con un control comprende comparar la muestra de biopsia de piel de (iv) con una muestra de biopsia de piel control, en donde un cambio histológico clasificado en la muestra de biopsia de piel en comparación con la muestra de biopsia control identifica el control como un sensibilizador o no-sensibilizador y/o alérgeno o no-alérgeno.
- 25 La referencia en la presente descripción a un "sensibilizador" incluye cualquier compuesto químico o agente químico o anticuerpo que causa que una proporción sustancial de personas o animales expuestos desarrollen una reacción alérgica en el tejido normal después de la exposición única o repetida a dicho compuesto, anticuerpo o agente químico.
- 30 La referencia en la presente descripción a un "alérgeno" y "alergénico" incluye cualquier sustancia extraña tal como una sustancia ambiental o producto químico que es capaz de inducir alergia o una reacción de hipersensibilidad específica en el cuerpo. Los alérgenos comunes incluyen polen de planta, esporas de moho, caspa de animales, polvo de la casa, alimentos, plumas, tintes, jabones, detergentes, cosméticos, plásticos y fármacos. Los alérgenos pueden entrar en el cuerpo por, por ejemplo, que se inhalen, se ingieran, se toquen, o se inyecten.
- 35 La referencia en la presente descripción a un "compuesto químico" se pretende que incluya un producto químico, terapéutico, farmacéutico o agente cosmético, sustancia, preparación o composición.
- Preferentemente, la muestra de biopsia de piel de control se puede derivar del mismo donante que la muestra de sangre donante.
- 40 Preferentemente, el donante es un donante humano.
- Preferentemente, las células T y las células dendríticas derivadas de monocitos (DCs) se aíslan a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Por ejemplo y sin limitarse a, las células T y las células dendríticas derivadas de monocitos se pueden separar a partir de PBMC por clasificación de células activadas magnéticamente o técnicas similares.
- 45 Las células dendríticas se generan a partir de monocitos CD14+ a partir de PBMCs por medio del uso de métodos estándar y del resto de las poblaciones de PBMC empobrecidas en monocitos usadas como la preparación de "células T" de la etapa (iii). Las células dendríticas a partir de donantes autólogos se generan para mejorar la probabilidad de activación de células T. Las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígeno con la capacidad de inducir respuestas de células T primarias y se producen rutinariamente mediante el cultivo de monocitos en presencia de IL-4 y GM-CSF durante 5-7 días (DC estándar). Alternativamente, se pueden producir por un protocolo modificado
- 50

5 descrito de aquí en adelante para diferenciación de monocitos humanos en DCs maduras dentro de 48 horas (DC rápidas). El protocolo modificado comprende una incubación después de 24 horas con maduración de citocinas tales como TNF- α (10ng/ml), IL-1 β (10ng/ml), IL-6 (10ng/ml), 1 μ M PGE2, Resiquimod (2.5 μ g/ml), CD40L (1 μ g/ml) y LPS (0.1 μ g/ml). Se apreciará que cualquiera de los métodos de producción de DCs es aplicable a la presente invención pero que la generación de las DCs rápidas maduras se puede preferir para reducir el período general de realización del ensayo de la presente invención.

La referencia en la presente descripción a "autólogo" significa que los productos derivados de la sangre y explantes de piel se derivan o recogen de a partir del mismo individuo.

10 Preferentemente, la biopsia de piel es una biopsia de ponche o raspado que comprende una tira o cuadrado de piel alrededor de 4 mm.

15 Preferentemente, la primera etapa de incubación de la etapa (ii) es de entre 2 a 24 horas. Las condiciones de incubación típicas se realizaron a 37 °C en una incubadora de aire humidificado con 5% CO₂, un medio de cultivo típico es Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Gibco UK) que contiene 100 IU/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomycin (Gibco UK) y 2 mM L-glutamina (Gibco UK) suplementado con 10% v/v de suero de ternera fetal inactivado por calor (FCS, Sera Lab) o un medio libre de suero Ex Vivo (Gibco UK). Las condiciones de cultivo no son limitantes en la medida en que otras variaciones de las condiciones que permitan el crecimiento y el mantenimiento de las células son igualmente aplicables.

20 Preferentemente la etapa (ii) adicionalmente incluye, como un control la incubación de un conjunto adicional o segundo de células dendríticas derivadas de monocitos con un compuesto que es un no-sensibilizador conocido. Alternativamente el control puede ser células dendríticas derivadas de monocitos incubadas sin ningún compuesto químico adicional en absoluto.

25 Preferentemente, la segunda incubación de la etapa (iii), que comprende la incubación de las DCs con una población de células T aisladas en la etapa (i) es entre 3-7 días por medio del uso de las mismas condiciones de cultivo de la etapa (ii) excepto que se usa 10% de suero autólogo inactivado por calor y se reemplaza el suero fetal bovino. En el caso en que un control comprende DCs con una población de células T aisladas en la etapa (i) que se han expuestas a un no-sensibilizador, este conjunto adicional o segundo de células se incuba en condiciones idénticas a la mezcla de prueba.

30 Preferentemente, la tercera etapa de incubación o etapa (iv), que comprende la incubación de la células T y las células DCs mezcladas con una muestra de biopsia de piel autóloga es entre 1 a 3 días. En el caso en que un control comprende DCs que se han expuesto a un no-sensibilizador, las células se incuban con la biopsia de piel en condiciones idénticas a la mezcla de prueba.

35 Preferentemente, la etapa de evaluación de la hipersensibilidad y las reacciones alérgicas en las biopsias de piel por cambios histológicos clasificados comprende la evaluación de la vacuolización de las células epidérmicas, daños a los queratinocitos basales y la conexión entre la epidermis y la dermis. Preferentemente, los grados histológicos son I a VI, en donde el grado I es negativo y los grados II a IV son diversos grados de positivo. Preferentemente, el grado I se define como la biopsia de piel que muestra vacuolización muy leve de células epidérmicas, el grado II se define como la biopsia de piel que muestra vacuolización difusa de células epidérmicas, el grado III se define como la piel que muestra la formación de grietas entre la epidermis y la dermis causadas por el daño vacuolar confluyente a los queratinocitos basales y el grado IV se define como la piel que muestra la separación completa de la epidermis y la dermis. El sistema de clasificación se basa en el sistema descrito por Lerner y otros para el diagnóstico de GvHD (Transplant Proc (1974);6:367).

40 En una modalidad de la invención, el ensayo de explante de piel de la presente invención además puede incluir el análisis de expresión de las células T y/o células dendríticas derivadas de monocitos.

45 El ensayo de explante de piel de la presente invención detecta una reacción alérgica o de hipersensibilidad y se basa convenientemente en observaciones histológicas de daño en la piel debido a sensibilizadores o no sensibilizadores donde habrá pocos o ningún cambio en la histo-arquitectura.

Preferentemente, el valor de control se puede derivar a partir del grupo que comprende:

- (i) un conjunto adicional o segundo de células dendríticas derivadas de monocitos que se han incubado en la etapa (ii) con un compuesto que es un no-sensibilizador conocido;
- (ii) un conjunto adicional o segundo de células dendríticas derivadas de monocitos que se han incubado en la etapa (ii) sin compuestos químicos adicionales;
- (iii) una muestra de biopsia de piel que se ha incubado con linfocitos autólogos; o
- (iv) una muestra de biopsia de piel que se ha incubado con el compuesto solo en las mismas concentraciones que el usado en la etapa (ii).

Preferentemente, el valor del compuesto de prueba se compara con el valor del control de manera que un aumento o disminución del valor de control es indicativo de una reacción de sensibilización.

5 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención se proporciona un ensayo *in vitro* para evaluar la hipersensibilidad y reacciones alérgicas que comprende células dendríticas derivadas de monocitos y T autólogas y una biopsia de piel derivada a partir del donante autólogo.

10 El ensayo de explante de piel de la presente invención proporciona la ventaja sobre un modelo equivalente de piel tridimensional ya que este usa tejido de piel humana tomada del cuerpo y crecida en un medio artificial con células inmune autólogas *in situ* lo que permite estudiar las respuestas inmunes y los objetivos moleculares y celulares identificados, así ayuda en el descubrimiento de fármacos, mejora el diseño de fármacos y la optimización de la dosis del fármaco antes de un ensayo clínico. Adicionalmente los explantes de piel mantienen morfología humana y la respuesta del tejido es la de las células integradas en comparación con células de la piel individuales.

Aunque no de acuerdo con la presente invención como se reivindica, se podría proporcionar un kit que comprende maneras y medios dispuestos para probar el potencial de sensibilización de un compuesto químico por medio del uso del método del primer aspecto de la invención.

15 De acuerdo con un tercer aspecto de la invención se proporciona un método *in vitro* para identificar anticuerpos que son sensibilizadores o no-sensibilizadores y/o alérgenos o no alérgenos, el método comprende

(i) incubar una población de células mononucleares de sangre periférica aisladas de una muestra de sangre del donante con un anticuerpo de prueba;

20 (ii) incubar células mononucleares de sangre periférica tratadas con el anticuerpo de (i) con una muestra de biopsia de piel obtenida a partir del mismo donante; y

(iii) evaluar la hipersensibilidad y reacciones alérgicas por cambios histológicos clasificados en la muestra de biopsia de piel tratada de (ii) en comparación con un control.

25 La referencia en la presente descripción al anticuerpo, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se unen específicamente a un antígeno. El término abarca anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos quiméricos y humanizados, y fragmentos de los mismos.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención se proporciona un método *in vitro* para la determinación de la potencia de un compuesto, el método comprende

30 (i) preparar una muestra de sangre de donantes para aislar una población de células T y una población de células dendríticas derivadas de monocitos de ahí;

(ii) incubar las células dendríticas derivadas de monocitos con un compuesto de prueba;

(iii) incubar las células dendríticas derivadas de monocitos tratadas con el compuesto con la población de células T aisladas en la etapa (i);

35 (iv) incubar las células T y las células dendríticas derivadas de monocitos tratadas con el compuesto de (iii) con una muestra de biopsia de piel obtenida a partir del mismo donante; y

(v) evaluar la potencia por cambios histológicos clasificados en la muestra de biopsia de piel tratada de (iv) en comparación con un control.

Preferentemente, la población de células T está comprendida en una población de células mononucleares de sangre periférica.

40 De acuerdo con un quinto aspecto de la invención se proporciona un método *in vitro* para la determinación de la potencia de un anticuerpo, el método comprende

(i) incubar una población de células mononucleares de sangre periférica aisladas de una muestra de sangre del donante con un anticuerpo de prueba;

45 (ii) incubar células mononucleares de sangre periférica tratadas con el anticuerpo de (i) con una muestra de biopsia de piel obtenida a partir del mismo donante; y

(iii) evaluar la potencia por cambios histológicos clasificados en la muestra de biopsia de piel tratada de (ii) en comparación con un control.

- Preferentemente, evaluar la potencia por cambios histológicos clasificados en la muestra de biopsia de piel en comparación con un control que comprende comparar la muestra de biopsia de piel tratada con una muestra de biopsia de piel de control, en donde un cambio histológico clasificado en la muestra de biopsia de piel corresponde a un índice de potencia definido. Preferentemente, los grados histológicos se clasifican de I a IV por orden de gravedad. Con mayor preferencia, el sistema de clasificación se basa en el sistema descrito por Lerner y otros, para el diagnóstico de GvHD (Transplant Proc(1974);6:367). La referencia en la presente descripción a la potencia se refiere a la capacidad de un compuesto para inducir la sensibilización. Preferentemente la potencia se determina por la cantidad de compuesto requerida para la sensibilización de la piel en un individuo previamente ingenuo, que corresponde a un cambio histológico clasificado.
- 5 Aunque no de acuerdo con la presente invención como se reivindica, los métodos mencionados anteriormente se podrían usar para determinar el modo de acción de sensibilización de un compuesto de prueba, preferentemente en donde dicho compuesto de prueba es un sensibilizador o alérgeno.
- Las características atribuidas al primer aspecto de la invención se aplican *mutatis mutandis* a todos los otros aspectos de la invención.
- 15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**
- Las modalidades de la invención se describen adicionalmente de aquí en adelante con referencia a los dibujos acompañantes, en los cuales:
- La Figura 1 muestra un diagrama de flujo del ensayo de explantes de piel.
- 20 La Figura 2 muestra cambios histopatológicos para diferentes grados de la reacción injerto de piel contra huésped (GVHR); la Figura 2A muestra GVHR de piel grado I que muestra vacuolización muy leve de las células epidérmicas (reacción negativa); la Figura 2B muestra GVHR de piel grado II que muestra vacuolización difusa de las células epidérmicas (reacción positiva); la Figura 2C muestra GVHR de piel grado III que muestra la formación de la grieta entre la epidermis y la dermis causada por el daño vacuolar confluyente a los queratinocitos basales (reacción positiva) y; la Figura 2D muestra GVHR de piel grado IV que muestra la separación completa de la epidermis y la dermis (reacción positiva).
- 25 La Figura 3 muestra el análisis del flujo de las células sin tratamiento. Las Figuras A, B y C representan los cambios en los niveles de expresión de los marcadores CD86, CD83 y HLA-DR respectivamente para las células de control (es decir, sin tratamiento) después de diversos puntos de tiempo. Los histogramas de color corresponden a la expresión después de 0 horas (rojo), 3 horas (verde), 6 horas (azul), 11 horas (marrón) y 24 horas (púrpura).
- 30 La Figura 4 muestra el análisis de flujo de las células tratadas con los no-sensibilizadores dodecil sulfato sódico (SDS) y tritón X-100™. El análisis de las células tratadas con SDS (Figuras 4 A, B y C) y tritón X-100™ (Figuras D, E y F) muestran los niveles de expresión de los marcadores CD86, CD83 y HLA-DR respectivamente después de varios puntos de tiempo. Los histogramas de color de la invención como se reivindica, corresponden a la expresión después de 0 horas (rojo), 3 horas (verde), 6 horas (azul), 11 horas (marrón) y 24 horas (púrpura).
- 35 La Figura 5 muestra el análisis de flujo de las células tratadas con los sensibilizadores dinitroclorobenceno (DNCB) y eugenol. El análisis de las células tratadas con DNCB (Figuras 4 A, B y C) y eugenol (Figuras D, E y F) muestran los niveles de expresión de los marcadores CD86, CD83 y HLA-DR respectivamente después de varios puntos de tiempo. Los histogramas de color corresponden a la expresión después de 0 horas (rojo), 3 horas (verde), 6 horas (azul), 11 horas (marrón) y 24 horas (púrpura).
- 40 La Figura 6 muestra las veces de cambio logarítmico en la expresión de *CCR2* y *CREM*.
- La Figura 7 muestra la incorporación de [³H]-timidina en las células que carecen de estimulación a partir de, ya sea de células T o DCs. La Figura 1 representa la medición de la incorporación de [³H]-timidina en las células que carecen de estimulación a partir de, ya sea de células T o DCs. Las Figuras 7 B y 7 C muestran el nivel de incorporación de [³H]-timidina después de la incubación de las DCs con células T autólogas y alogénicas respectivamente. Los no sensibilizadores se representan por columnas púrpuras; los sensibilizadores se representan por columnas verdes.
- 45 La Figura 8 muestra una respuesta de proliferación de células T a alérgenos y no alérgenos.
- La Figura 9 muestra los niveles de expresión de IFN-γ en respuesta a alérgenos y no alérgenos.
- La Figura 10 muestra una respuesta de proliferación de células T a sensibilizadores y no sensibilizadores.
- La Figura 11 muestra los niveles de expresión de IFN-γ en respuesta a sensibilizadores y no-sensibilizadores.
- 50 La Figura 12 muestra los cambios histopatológicos en la piel en respuesta a fármacos alérgenos y no alérgenos.
- La Figura 13 muestra los cambios histopatológicos en la piel en respuesta a sensibilizadores y no-sensibilizadores.

- La Figura 14 muestra los resultados de una prueba de Chi-cuadrado para determinar la exactitud del ensayo de explante de piel para sensibilizadores y no-sensibilizadores.
- La Figura 15 muestra los resultados de una prueba de Chi-cuadrado para determinar la exactitud del ensayo de explante de piel para alérgenos y no-alérgenos.
- 5 La Figura 16 muestra los resultados de una prueba de Chi-cuadrado para determinar la exactitud del ensayo de explante de piel en comparación con el ensayo LLNA.
- La Figura 17 muestra que el coeficiente de correlación fue de la clasificación de LLNA con la lectura de GVHR del ensayo de explantes de piel.
- 10 La Figura 18 muestra un diagrama de dispersión que muestra la correlación entre el grado histológico y la respuesta de expresión de IFN- γ .
- La Figura 19 muestra la correlación entre los niveles de producción de IFN- γ y el nivel del daño histológico observado en el ensayo de explante de piel.
- La Figura 20 muestra un diagrama de dispersión que muestra la correlación entre el grado histológico y la proliferación de células T.
- 15 La Figura 21 muestra la correlación entre los valores de proliferación de células T y el nivel de daño histológico observado en el ensayo de explante de piel.
- La Figura 22 muestra los cambios histopatológicos en la piel en respuesta a los anticuerpos.
- La Figura 23 muestra los cambios histopatológicos en la piel en respuesta a anticuerpos en ausencia de células autólogas.
- 20 La Figura 24 muestra los resultados de una prueba de Chi-cuadrado para determinar la exactitud del ensayo de explante de piel para la respuesta de anticuerpos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Preparación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

- 25 Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre obtenida a partir de voluntarios sanos se preparó por centrifugación en gradiente de densidad por medio del uso de la solución Lymphoprep™ (Axis-Shields) y se diluyó 1:6 en solución salina regulada con fosfato (PBS) (Lonza BioWhittaker, Belgium). Las células mononucleares se recogieron de la interfaz del medio de densidad:plasma y se lavaron tres veces en PBS frío y se contaron por medio del uso de una cámara de recuento de células Neubauer mejorada (Weber Scientific International Ltd., UK). La viabilidad celular se evaluó por azul tripán (Gibco).

- 30 *Separación de monocitos CD14+ por medio del uso de la tecnología MACS®*

- La tecnología **MACS®** (clasificación de células activadas magnéticamente)(Miltenyi Biotec) usa columnas llenas con partículas magnéticas para separar las células marcadas magnéticamente, para el proceso de separación estas columnas se colocan en un campo magnético fuerte (separador QuadroMACS®). La cantidad necesaria de PBMC se transfirió a un tubo Falcon de 50ml fresco, se llenó con PBS y se filtró a través de un filtro de nylon de 100 μ m para eliminar los grumos. 100 x 10⁶ células mononucleares se lavaron y se resuspendieron en 800 μ l del amortiguador MACS frío (PBS que contenía 0.5% FCS y 1 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)). Las células se incubaron a 2-8 °C durante 20 minutos con 100 μ l del anticuerpo CD14 acoplado con microglóbulos magnéticos. La suspensión celular se añadió a la columna lo que permitió que las células negativas pasaran a través de esta, para la recolección (como la fracción de "células T " y las células positivas (CD14+) después se recogieron y se evaluó la pureza mediante análisis de citometría de flujo.
- 40

Generación de células dendríticas derivadas de monocitos (moDC)

- Los monocitos CD14 positivos purificados por separación por **MACS®** se cultivaron en una placa de 24 pocillos a una densidad de 0.5 x 10⁶/ml en medio de cultivo con 50 ng/ml de GM-CSF y 50 ng/ml de IL-4. Después de 3 días 400 μ l de medio retiraron cuidadosamente y 500 μ l de medio fresco que contenía 50 ng/ml de GM-CSF y 50 ng/ml de IL-4 (Immunotools) se añadieron y dejaron durante 3 días adicionales. Después de 6 días las células presentadoras de antígeno inmaduras células dendríticas (DC) se recogieron o se dejaron madurar mediante la adición de lipopolisacáridos (LPS) (0.1 μ g/ml, Sigma), IL-1 β (10 ng/ml, Immunotools) y TNF α (10 ng/ml, Immunotools) durante 24 horas adicionales.
- 45

Tratamiento de moDC con sensibilizadores/ alérgenos y no-sensibilizadores

Los primeros experimentos se llevaron a cabo por medio del uso de 2 no-sensibilizadores, dodecil sulfato sódico (SDS) y tritón X-100. Los sensibilizadores químicos, DNCB y eugenol, se escogieron así como ampicilina un fármaco antibiótico conocido por causar reacciones alérgicas en 10-20% de los individuos normales. Las concentraciones de los productos químicos usados fueron 1µM DNCB, 15µM eugenol y 0.001% para SDS y tritón X-100. El DNCB se disolvió en DMSO (LabScan, Dublin, Ireland), el eugenol se disolvió en 70% alcohol etílico (Fisher Scientific, UK) y SDS y tritón X-100 se disolvieron en RPMI (Gibco UK). La ampicilina se diluyó en RPMI y se usó a una concentración de 0.2 µg/ml. Las células dendríticas se expusieron a los productos químicos durante 3, 6, 11 y 24h (24hr solo para ampicilina) en una incubadora a 37 °C, 5% CO₂ humidificada. Después del tratamiento las células se recogieron, se lavaron y se contaron, la viabilidad se determinó y se asignó a las siguientes disciplinas: análisis de citometría de flujo, RT-PCR en tiempo real (para cambios en la expresión de genes) y ensayos de proliferación de células T (capacidad de estimular células T inmunes). Las células tratadas además se establecieron en cultivos de linfocitos mixtos con fracción de células T autólogas durante 7 días y se añadieron a la piel del donante de PBMC. El daño a la piel se registró por examen histopatológico.

Resultados iniciales del análisis de citometría de flujo

Las células se probaron para cambios en el fenotipo después de la exposición a productos químicos que incluyen el uso de anticuerpos para CD83 para la presencia del marcador de DC maduras, CD83; CD86 para la presencia de la molécula co-estimuladora, CD86; HLA-DR para la presencia de la molécula de MHC Class II, HLA-DR, que se requiere para la estimulación inmune; 7-Aminoactinomicin D (7-AAD) se usó para evaluar la viabilidad y CD3 para la presencia de células T. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron de nuevo como se describió anteriormente y después se re-suspendieron en 300 µl de amortiguador de FACS. En los casos en que se usó 7-AAD, este se añadió antes del análisis de flujo. Las células se analizaron por medio del uso del citómetro de flujo FACSCalibur™ (BD Biosciences) junto con el software BD CellQuest™. Toda la interpretación de los datos finales se realizó por medio del uso del software FlowJo™ (versión 7.6).

RT-PCR en tiempo real

Después del tiempo de exposición adecuado, las células se recogieron y se sedimentaron. Se retiraron los sobrenadantes y las células se lisaron en amortiguador de lisis de ARN que se preparó a partir de 5 ml de amortiguador de lisis RLT (Qiagen, Hilden, Alemania) y 50 µL β-mercaptoetanol (Analar VWR). El ácido ribonucleico (ARN) total se aisló por medio del uso del kit de aislamiento de ARN mini RNeasy, de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Qiagen). El ARN se almacenó en agua libre de RNasa. (Qiagen) a -80 °C. La concentración de ARN se determinó por medio del uso del espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Se cargaron 1.5µl de cada muestra en la máquina para investigación y cuantificación a 260 nm por medio del uso del programa ND-1000. La calidad del ARN se evaluó por la relación de absorbancia 260:280, con ARN de alta calidad que tenía el valor entre 1.9 y 2.1. Las muestras de ARN después se desnaturalizaron durante 5 minutos a 65 °C en el termociclador de ADN 480 (Applied Biosystems), y después se enfrió inmediatamente en hielo. Una combinación de la mezcla de ADNc, que incluye iniciadores hexámeros aleatorios (Thermo) y oligo dNTPs (Roche), transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV RT) - Invitrogen) y un inhibidor de RNasa (Rnasin - Promega) se añadieron a 20µl del ARN total extraído y después se insertó de nuevo en el termociclador de ADN 480 (Applied Biosystems) por 2 horas adicionales a 37 °C, después 10 minutos a 65 °C para desactivar la MMLV RT. Las muestras de ADNc se almacenaron a -20 °C.

Reacción de la RT-PCR en tiempo real

Cambios en la expresión de los genes de biomarcadores VITASENS® que rindieron el mayor potencial de discriminación a partir de trabajos anteriores (es decir, CCR2 y CREM), se analizaron para cambios en la expresión después de la exposición a productos químicos. La RT-PCR en tiempo real se usó para la cuantificación de los niveles de transcrito por medio del uso de la tecnología TaqMan (Applied Biosystems). Primero se prepararon las mezclas maestras de la RT-PCR en tiempo real Taqman Universal Mastermix (Applied Biosystems), RNasa libre de agua, ADNc (equivalente a aproximadamente 10-50 ng de ARN) y los iniciadores TaqMan específicos (una mezcla 20X de 18 µM del iniciador y 5 µM de la sonda) (ensayo disponible comercialmente; Applied Biosystems) para los genes CCR2, CREM y el gen de mantenimiento de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Posteriormente, se alicuotaron las cantidades de 20 µl de muestra de RT-PCR en tiempo real por triplicado en una placa óptica de 96 pocillos y se ejecutó por medio del uso del programa SDS 2.3. en un sistema de PCR en tiempo real Fast 7900HT (Applied Biosystems). Brevemente este programa consiste en 40 ciclos de calentamiento de las muestras a 95 °C para separar las hebras y después enfriamiento a 60 °C para hibridar y extender los iniciadores; además detecta la fluorescencia producida al final de cada ciclo. Los valores Ct (ciclo umbral), el número de ciclos que se puede detectar cuando la fluorescencia supera el umbral, se adquirieron y se compararon para evaluar las diferencias en la expresión. La normalización de la expresión se realizó por medio del uso de las señales GAPDH. Los valores de cuantificación relativa (RQ) se calcularon a través de la ecuación: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los valores de ΔCt se calcularon como: Ct del objetivo - Ct de mantenimiento.

De acuerdo con los estudios anteriores, los resultados generados de la RT-PCR en tiempo real están en forma de relaciones de las muestras tratadas a las muestras de control negativo y no siguieron una distribución normal. Para corregir esto se usó una transformación logarítmica de base dos. Denominado las veces de cambio logarítmico (LFC),

este valor sigue una distribución más simétrica. Nota: un LFC positivo o negativo se correlaciona con una regulación ascendente o descendente respectiva del nivel de expresión de genes correspondiente.

Ensayos de proliferación de células T

5 Células inmaduras a partir tanto de fuentes alogénicas y autólogas por triplicado en una relación de 1:10 (200 µl volumen total) en placas de fondo redondo de 96 pocillos durante 5 días a 37 °C en una incubadora de aire humidificado con 5% CO₂. Después de 5 días, se retiraron 40 µl de sobrenadante de la parte superior de cada pocillo triplicado y se almacenó a -20 °C para análisis adicional de citocina. La [³H]-timidina (usada a una concentración de 0.185MBq/ml) después se añadió a cada pocillo por medio del uso de métodos de protección de la radiación adecuados y se dejó
10 incubar durante 16-18 horas a 37 °C en una incubadora de aire humidificado con 5% CO₂. Las células se recolectaron y posteriormente se contaron por medio del uso del contador de luminiscencia y escintilación de microplacas 1450 MicroBeta TriLux (PerkinElmer®). Los datos se interpretaron por medio del uso del software Graphpad Prism®.

Ensayo de explante de piel

15 El ensayo de explante de piel consistió de la co-incubación de las células DC tratadas y sin tratar con las células T del mismo donante durante 7 días. Después de este tiempo se añadieron las células T en placas de 96 pocillos a secciones de una biopsia de piel de 4mm del mismo donante. La piel se co-incubó durante tres días y después se aplicó la tinción rutinaria para histopatología. La piel incubada con medio solo o células autólogas solas se usaron como controles. La piel después se seccionó y se tiñó de forma rutinaria para daño histopatológico (grados 0-IV) por medio del uso de un criterio que es muy similar al usado y observado en el ámbito clínico con distinto daño patológico observado a partir de los grados 1-IV (Figura 2).

20 En la presente invención la respuesta de las DC a los sensibilizadores químicos contra los no-sensibilizadores conocidos se pueden evaluar por su efecto sobre las células sensibilizadas por evaluación *in vitro* del daño de la piel (grado I-IV).

25 La presente invención proporciona convenientemente un ensayo no-artificial, humano *in vitro* y métodos que permiten el estudio de las respuestas inmunes primaria y secundaria en presencia de compuestos sensibilizadores potenciales así de manera favorable reducen la necesidad de amplias pruebas en animales. La incubación con piel humana, permite evaluar histopatológicamente el daño de la piel, la piel se clasifica por el daño histológico por medio del uso de criterios similares a los usados y observados en el ámbito clínico.

30 Este enfoque es único y da una idea del uso del modelo de explante de piel para predecir la respuesta a sensibilizadores químicos y para investigar sus posibles señales alérgicas /inflamatorias. La presente invención proporciona un ensayo de explante de piel que mejora las técnicas actuales (ver los Ejemplos 1-3) y proporciona una nueva manera de probar nuevos fármacos para la hipersensibilidad y las reacciones alérgicas.

35 Como se ejemplifica en la presente descripción después de perfiles de expresión de CD83, CD86 y HLA-DR en los datos de citometría de flujo se ha mostrado su capacidad para distinguir entre sensibilizadores y no sensibilizadores pero esto no es reproducible y bien puede ser que este patrón no pueda discriminar entre miembros adicionales de cada clase de productos químicos. Los cambios en los niveles de expresión de *CREM* y *CCR2* correlacionan bien entre este y el trabajo previo pero no se alcanzó significación. Las respuestas de proliferación dos veces más altas en las células T incubadas con DC expuestas a eugenol (sensibilización) contra SDS (no-sensibilización) además proporcionaron un método de distinguir entre ambas clases de productos químicos. Sin embargo, esta respuesta además podría no ser
40 reproducible con muestras posteriores. Estos resultados ejemplifican las deficiencias y desventajas de la falta de sensibilidad y reproducibilidad para distinguir entre los compuestos de sensibilización contra los no sensibilizadores con las técnicas de la técnica anterior.

Compuestos de prueba

Una variedad de sensibilizadores, no sensibilizadores, alérgenos y no alérgenos se usaron como compuestos de prueba en los ensayos y kits de la presente invención, cuyos detalles se muestran en la Tabla 1.

45

Tabla 1

Sensibilizadores	Abr.	Concentración
Dinitroclorobenceno	DNCB	0.1 uM
Sulfato de níquel	NI S04	0.1 uM
eugenol	Eug	2.5 ng/ml (15 uM)

Sensibilizadores	Abr.	Concentración
Cinamaldehído	ca	0.1 uM
2-mercaptobenzotiazol	2Mercap	0.1 uM
No sensibilizadores		
Dodecilsulfato de sodio	SDS	10 ng/ml
Tritón-X-100	TRI-X	0.0001%
Sulfato de zinc	Zn S04	0.1 uM
Sulfóxido de dimetilo	DMSO	0.0001%
Ácido glutámico	LGA	0.1 uM
Isopropanol	IP	0.1%
Dimetilformamida	DMT	0.1%
Permanganato potásico	PP	0,1 µM
Glicerina	Gly	0.1%
Tween 20	Tw	0.1%
Alérgenos		
Penicilina	P	100 ug/ml
Amoxicilina	a	100 ug/ml
Lamotrigina	L	100 ug/ml
Neomicina	Neo	10 ug/ml
Benzocaína	Bz	10 ug/ml
No-Alérgenos		
Simvastatina	SimV	10u g/ml
metotrexato	MTX	10u g/ml
Metformina	MET	10u g/ml

EJEMPLO 1

Las células dendríticas derivadas de monocitos CD14+ se expusieron a sensibilizadores y no sensibilizadores de ambas clases sobre varios puntos de tiempo. Los cambios en el fenotipo celular se analizaron por citometría de flujo por medio del uso de los marcadores de superficie CD83, CD86 y HLA-DR. Después del tratamiento con DNCB y eugenol y los no-

5

sensibilizadores (SDS y tritón X-100), las DC se analizaron para los marcadores CD86, CD83 y HLA-DR. Se usó el 7-aminoactinomicin D (7-AAD) para canalizar las células viables. Las células dendríticas sin tratar de control (DC) se analizaron para los cambios en la expresión de marcadores de superficie para determinar si alguna alteración en la expresión ocurrió durante el periodo de cultivo. Como se muestra en la Figura 3A, se vio un aumento en la expresión de CD86 después de 6 horas y este se mantuvo durante 11 horas y 24 horas. Las células fueron casi exclusivamente CD83 negativas para cada punto de tiempo como se ve en la Figura 3B, mientras que la Figura 3C muestra alta expresión de HLA-DR en cada punto de tiempo sin embargo un ligero decaimiento de la expresión parece tener lugar a las 24h. A continuación, se analizaron las células tratadas con los no sensibilizadores. Después de la exposición a SDS, las alteraciones en la expresión de CD86 fueron más sorprendentes a las 24h como se ve en la Figura 4A en comparación con las células que no tuvieron tratamiento. De manera similar para CD86 (Figura 4B) y HLA-DR (Figura 4C), un aumento en la expresión fue visible después de 24h de tratamiento cuando se comparó con las células de control. La aplicación de tritón X-100 causó un fenómeno similar en el que un aumento en la expresión de CD86 (Figura 4D), CD83 (Figura 4E) y HLA-DR (Figura 4F) se pudo ver después de 24 horas. Esto es más evidente cuando se contrasta con las condiciones de control. Finalmente, se examinaron las células expuestas a sensibilizadores para cambios en la expresión. Lo más evidente fue el máximo reducido de la expresión para cada marcador después de 24 horas de tratamiento tanto para DNCB (Figuras 5A, 5B y 5C) y eugenol (Figuras 5D, 5E y 5F) en comparación con los no-sensibilizadores SDS y tritón X-100. Los resultados muestran que mediante la evaluación de los patrones de expresión de CD83, CD86 y HLA-DR, los productos químicos se pueden clasificar como sensibilizadores o no sensibilizadores, sin embargo, los resultados no fueron reproducibles lo que indica que esta técnica no es suficientemente sensible para la predicción de la naturaleza de sensibilización de nuevos productos farmacéuticos y químicos.

EJEMPLO 2

La determinación de los cambios en los niveles de expresión de los genes del receptor 2 (C-C motivo) de quimocinas (*CCR2*) y el elemento modulador de respuesta a cAMP (*CREM*) se realizó por RT-PCR en tiempo real. Se realizó el análisis de 6 muestras. Los valores de RQ se convirtieron a las veces de cambio logarítmico (LFC) para corregir los datos que no siguieron una distribución normal. La Figura 6 muestra un perfil de expresión típico obtenido a partir de una sola muestra de donante. Para las células que no se habían tratado (control), el gen *CREM* mostró poca alteración en los niveles de expresión después de cada punto de tiempo considerado - los valores se encuentran cerca de 0. En contraste la expresión de *CCR2* se redujo notablemente tras cada punto de tiempo - esto fue más evidente después de 24 horas cuando se obtuvo un LFC de -4. El examen de los no-sensibilizadores después, el SDS siguió un patrón similar a las células de control para la expresión de *CREM* - los valores se encuentran cerca de 0 para cada punto de tiempo considerado. Un cambio en la expresión de *CCR2* fue más evidente a las 11 horas y 24 horas de cambiar de una regulación descendente a una regulación ascendente respectivamente. Para el tritón X-100 non-sensibilizador, la expresión de *CREM* parece estar regulada de manera ascendente para cada punto de tiempo - una ligera disminución se produjo a las 24 horas. A la inversa, la expresión de *CCR2* se reguló descendentemente después de cada período de tiempo. El análisis del sensibilizador DNCB mostró regulación ascendente de *CREM*. *CCR2* mostró poca variación en los niveles de expresión a partir de 3-11 horas, pero aumentó después de 24 horas. Finalmente, el análisis de eugenol mostró que *CREM* se reguló ascendentemente hasta 24 horas cuando se reguló descendentemente. Esto contrasta con *CCR2* que se reguló descendentemente a partir de 3-11 horas y después se reguló ascendentemente a las 24 horas. Estos resultados muestran que el análisis de los cambios en la expresión génica, particularmente para *CREM*, sugieren su potencial para discriminar entre ambas clases de productos químicos aunque la significación y la reproducibilidad no se pudieron confirmar lo que indica que esta técnica no es lo suficientemente sensible para predecir la naturaleza de sensibilización de nuevos productos farmacéuticos y químicos.

EJEMPLO 3

Se estudió la capacidad de inducir la proliferación de células T, se evaluó a través de la incorporación de [³H]-timidina. La Figura 7A muestra que se obtuvo una baja respuesta para la incorporación de timidina tritiada para todas las condiciones de control - esto era de esperar ya que las células T y DC son dependientes una de la otra para lograr una respuesta proliferativa. La Figura 7B refleja el conteo después de la estimulación de las DC tratadas con las células T de una fuente autóloga (el mismo donante). Curiosamente, el eugenol (sensibilizador) provocó un recuento aproximado de dos veces mayor que SDS y tritón X-100 (no-sensibilizadores). La Figura 7C muestra la respuesta de las DC tratadas estimuladas por las células T de una fuente alogénica (diferente). En primer lugar, hay que señalar que como era de esperar la respuesta obtenida fue aproximadamente diez veces más alta que la respuesta obtenida con células T autólogas. De particular interés es una clara discriminación entre el no-sensibilizador SDS y el sensibilizador eugenol, la diferencia en los niveles de cuentas por minuto (CPM) entre ambos productos químicos fue mayor de dos veces. El nivel de incorporación de [³H]-timidina para tritón X-100 fue aproximadamente 100,000 CPM lo que está en contraste con las CPM obtenidas para DNCB que fue la mitad que la de tritón X-100 a aproximadamente 50,000 CPM. El experimento de proliferación de células T se repitió dos veces más con una fuente separada de moDC y células T. Estos resultados mostraron un menor potencial para discriminar entre sensibilizadores y no sensibilizadores (datos no incluidos).

Estos resultados muestran que mediante la medición de la proliferación de células T, una respuesta dos veces más alta se reveló entre las células dendríticas tratadas con el sensibilizador, eugenol contra el no-sensibilizador, SDS pero de nuevo esta respuesta no fue coherente.

En conclusión, la capacidad de discriminar entre sensibilizadores y no sensibilizadores por medio del uso de un número de técnicas actuales sugiere que estas herramientas son suficientemente sensibles para predecir la naturaleza de sensibilización de nuevos productos farmacéuticos y químicos.

EJEMPLO 4

5 Generación de DC rápidas maduras

Las células de selección CD14 positivas se pusieron en cultivo (0.5×10^6 células por pocillo en placas de 24 pocillos) con medio RP-10 suplementado con IL-4 (50 ng/ml) y GM-CSF (50 ng/ml). Después de 24 horas la maduración, las citocinas TNF- α (10 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), 1 uM PGE2, Resiquimod (2.5 μ g/ml), CD40L (1 μ g/ml) y LPS (0.1 μ g/ml) se añadieron a cada pocillo por 24 horas adicionales.

10 Tratamiento con fármaco

Las DC rápidas maduras se trataron ya sea con eugenol (sensibilizador) (2.5 mg/ml), SDS no sensibilizador (0.01 mg/ml), penicilina (alérgeno) (0.2 μ g/ml o 100 μ g/ml) durante 24 horas o con amoxicilina (alérgeno) (100/200 500 μ g/ml) o Lamotrigina (alérgeno) (50/100 o 150 μ g/ml) durante 4/5 días.

Ensayo de explante de piel

15 Las DC rápidas maduras tratadas con fármaco durante 24 horas se cultivaron con células T autólogas en una relación 1:10 (0.5×10^6 DC + 5×10^5 células T / frasco en volumen de 5 ml / frasco) en medio completo (RPMI suplementado con P/S, Glut y 10% de suero AB humano inactivado con calor). Como un control negativo las DC's sin tratar se cultivaron con células T autólogas y como un control positivo las DC sin tratar se cultivaron con células T alogénicas. Después de cuatro días de cultivo, se tomaron muestras de sobrenadante de cada experimento para el análisis por FACs. Las células se lavaron y se resuspendieron en 20% de suero autólogo inactivado por calor y se co-cultivaron con piel autóloga a una concentración de células de 1×10^6 células/pocillo en un volumen de 200 μ l/pocillo. A las muestras de biopsia de piel se le recortaron los excesos de dermis y se dividieron en secciones. Cada sección se cultivó por separado ya sea con las células DC tratadas con el fármaco cultivadas con células T autólogas, las DC's sin tratar con células T autólogas como un control negativo, en medio solo como un control negativo, las DC's sin tratar con células T alogénicas como un control positivo. Una muestra de piel normal fresca se fijó en 10% formalina tamponada. Después de 3 días de co-cultivo, los sobrenadantes y las células se colectaron y se congelaron para análisis por FACs. Los explantes de piel se fijaron en 10% de formalina tamponada, se seccionaron y se teñeron con hematoxilina y eosina. La evaluación histopatológica de los explantes de piel se realizó a ciegas y de forma independiente por al menos dos evaluadores por medio del uso del sistema de clasificación (grado I-IV) como se describe por Lerner-y otros y se muestra en las Figuras 2A-2D. Para las DC rápidas maduras tratadas con fármaco durante 4/5 días, después de la maduración de las DC se cultivaron como se ha descrito anteriormente, sin embargo, se añadieron los fármacos a los frascos de cultivo durante el cultivo de cuatro días antes de la adición de piel.

20

25

30

EJEMPLO 5

Daño histológico en el ensayo de explante de piel

35 Los compuestos de prueba de la Tabla 1 se sometieron al ensayo de explante de piel de la invención. El daño histológico observado con cada sensibilizador y no sensibilizador y/o alérgeno y no-alérgeno conocido se atribuyó a un grado de daño histológico de la piel definido (grados 0-IV).El daño histológico observado para cada compuesto de prueba en los ensayos de explantes de piel se describe en la Tabla 2 más abajo.

Tabla 2

Explantes de piel	Grado 0	Grado I	Grado II	Grado III	Grado IV	Total positivo
Normal	6	3				0/9
Medio		19		2		2/21
Auto		12	4	2		6/18

ES 2 455 598 T3

Explantos de piel	Grado 0	Grado I	Grado II	Grado III	Grado IV	Total positivo
Allo			4	16		20/20
Sensibilizadores						
eugenol			1	3	1	5/5
DNCB			2	4		6/6
2Mercp		1	1	2		3/4
NiSO4		1	3	1		4/5
CINN		2		2		2/4
No sensibilizadores						
SDS		3	3			3/6
Tritón-X		4				0/4
DMSO		2	1			1/3
LGA		2	1			1/3
ZnSO4		2	1	1		2/4
IP		5				0/5
PP		4	1			1/5
Gly		3		1		1/4
DMT		3				0/3
Tw		2				0/2
Alérgenos						
Penicilina			1	3		4/4
L amot			1	2	1	4/4
Amoxo			1	3	1	4/5
Neo		1	1	3		4/5
Bz				1		1/1

No-Alérgenos						
SimV		2		1		1/3
MET		2				0/2
MTX		1				0/1
Anticuerpos						
Medio + piel		4				0/4
Ac A 0.1ug/ml			2	2		4/4
Ac A 0.01ug/ml			3			3/3
Ac B0.1ug/ml			1	3		4/4
células PHA			2	2		4/4

La Figura 12 ilustra los cambios histológicos en la piel en respuesta a los alérgenos y los no alérgenos, observados por medio del uso del ensayo de explantes de piel de la invención. El aumento en la gravedad del daño histológico se clasifica de I-IV. Los alérgenos (centro y derecha) muestran daño grado II > mientras que los no-alérgenos (izquierda) muestran grado I.

La Figura 13 ilustra los cambios histológicos en la piel en respuesta a los sensibilizadores y no-sensibilizadores, observados por medio del uso del ensayo de explantes de piel de la invención. El aumento en la gravedad del daño histológico se clasifica de I-IV. Los sensibilizadores muestran daño grado II > mientras que los no-sensibilizadores muestran grado I.

10 EJEMPLO 6

Determinación de la exactitud del ensayo de explante de piel para sensibilizadores y no-sensibilizadores

Se realizó una prueba de Chi -cuadrado para ver si había una correlación positiva entre la observación esperada y los datos observados por medio del uso del ensayo de explantes de biopsia de piel. Como se ilustra en la Figura 14, la prueba mostró que había una fuerte correlación positiva entre el grado esperado y el grado observado en el explante de piel ($p < 0.0001$). Estos datos muestran que el explante de piel puede distinguir efectivamente entre un sensibilizador y un no-sensibilizador.

Determinación de la exactitud del ensayo del explante de piel para alérgenos y no-alérgenos

Del mismo modo se realizó una prueba de Chi-cuadrado para ver si había una correlación positiva entre los resultados obtenidos para los datos de alérgenos y no alérgenos y la observación esperada por medio del uso del ensayo del explante de biopsia de piel. Como se ilustra en la Figura 15, la prueba mostró que había una fuerte correlación positiva entre el grado esperado y el grado observado en el explante de piel ($p < 0.003$). Estos datos muestran que el explante de piel puede distinguir efectivamente entre un alérgeno y un no-alérgeno.

EJEMPLO 7

Comparación de LLNA de los productos químicos probados contra las pruebas que usan el ensayo del explante de piel

Los resultados del ensayo LLNA se obtuvieron a partir del sitio web disponible públicamente www.sens-it-iv y los resultados del ensayo de explantes de piel de la invención se compararon a los resultados de LLNA. La clasificación de LLNA se definió como 1=débil; 2 =moderado y 3=extremo. Estos criterios se compararon con los resultados del ensayo de explantes de piel clasificados como II o III positivo y grado I negativo en una prueba de Chi cuadrado. Se observó una correlación positiva ($p < 0.001$). El sulfato de níquel no se incluyó en esta prueba de correlación ya que no se detectó en el ensayo LLNA.

Los resultados de la comparación se ilustran en la Tabla 3 más abajo.

Tabla 3

Sensibilizadores químicos	Clase LLNA (N/A=no disponible)	Explante de piel	Resultado	IFNy medio
DNCB	Extremo	Grado III	x4	369.394
		Grado II	x2	
Cinamaldehído	Moderado	Grado I	x2	227.76
		Grado III	x2	
		Grado III	x2	
2-mercaptobenzotiazol	Moderado	Grado I	x1	628.81
		Grado II	x1	
		Grado III	x2	
Penicilina G	Débil	Grado III	x3	549.25
		Grado II	x1	
eugenol	Débil	Grado II	x1	425.66
		Grado III	x3	
Sulfato de níquel	Negativo	Grado III	x1	326.15
		Grado II	x3	
		Grado I	x1	
No sensibilizadores				
Sulfato de zinc	No sensibilizador	Grado III	x1	13.39
		Grado II	x1	
		Grado I	x2	
Isopropanol	No sensibilizador	Grado I	x5	207.26
Permanganato potásico	No sensibilizador	Grade I	X4	229.39
		Grado II	x1	
Tween	No sensibilizador	Grade I	x2	188.24
Glicerina		Grado I	x3	144.28

Sensibilizadores químicos	Clase LLNA (N/A=no disponible)	Explante de piel	Resultado	IFN γ medio
		Grado III	x1	
Dimetilformamida	No sensibilizador	Grade I	X3	158.59
SDS (Dodecil sulfato de sodio)	No sensibilizador	Grade I	x3	80.33
		Grado III	x3	
LGA (ácido glutámico)	n/a	Grado I	X2	48.40
		Grado II	X1	
DMSO	n/a	Grado I	X2	164.40
		Grado II	X1	
tritón-x	n/a	Grado I	X4	33.54

Determinación de la exactitud del ensayo de explante de piel contra el ensayo LLNA

5 Se realizó la prueba de Chi-cuadrado para ver si había una correlación positiva entre los resultados obtenidos para los datos de los sensibilizadores y no- sensibilizador por el ensayo LLNA y el ensayo de explante de piel de la invención. Como se muestra en la Figura 16, la prueba mostró que había una fuerte correlación positiva entre el ensayo LLNA y el grado observado en el explante de piel ($p < 0.0001$). Estos datos muestran que el explante de piel puede distinguir efectivamente entre un sensibilizador y un no-sensibilizador.

Coefficiente de correlación de la clasificación de LLNA con la lectura de GVHR del explante de piel

10 La Figura 17 ilustra el coeficiente de correlación de la clasificación de LLNA con la lectura de GVH R del explante de piel.

Los resultados se generaron como se describió anteriormente.

EJEMPLO 8

15 Para validar el ensayo se controlaron los niveles de proliferación de células T a través de la incorporación de $^3\text{[H]}$ -timidina. La liberación de citocina se determinó mediante la medición de los niveles de la expresión de IFN- γ y el nivel de daño histopatológico en el tejido se determinó por medio del uso del ensayo de explante de piel de la invención

Se realizó un ensayo de viabilidad por medio del uso de concentraciones tanto de alérgenos y no-alérgenos y sensibilizadores y no-sensibilizadores para determinar la concentración óptima para las pruebas. Las concentraciones seleccionadas posteriormente para su uso en el ensayo de proliferación modificado se indican en la Tabla 1.

Ensayo de proliferación de células T modificado y resultados de IFN- γ

20 Respuestas de proliferación de células T a alérgenos y no-alérgenos

Se escogieron los alérgenos Lam, Amox, Pen, Neo y Benz. Las concentraciones de los productos químicos usados fue 100 $\mu\text{g/ml}$ Lam, 100 $\mu\text{g/ml}$ Amox, 100 $\mu\text{g/ml}$ Pen, 10 $\mu\text{g/ml}$ Neo y 100 $\mu\text{g/ml}$ Benz. Lam se preparó en DMSO. Amox se preparó en 1 M NH_4OH . Pen se preparó en dH_2O . Neo se preparó en RPMI (Gibco UK). Benz se preparó en etanol.

25 Se escogieron los no alérgenos SimV, Met, y MTX. La concentración de los productos químicos usados fue 10 $\mu\text{g/ml}$ para cada uno de SimV, Met, y MTX. MTX se preparó en 0.1M hidróxido sódico. Met se disolvió en y SimV se preparó en RPMI (Gibco UK).

Las DC rápidas tratadas con fármaco con alérgenos (negro) y no-alérgenos (gris) durante 24 horas indujo la proliferación de las células T autólogas. Las DC rápidas tratadas con fármaco se co-cultivaron con células autólogas

durante cinco días. A las células se les dio un pulso con [³H] timidina en el día cinco y se recolectaron después de 18 horas.

5 Como se ilustra en la Figura 8, las DC rápidas no tratadas (control negativo) (n=19) y los no alérgenos Metformina (n=10), MTX (n=8) y simvastatina (n=6) indujeron una proliferación inferior de las células T autólogas. Los alérgenos Penicilina (Pen) (n=14), Amoxicilina (Amox) (n=13) y Lamotrigina (Lam) (n=14), Neomicina (Neo) (n=7) y Benzocaína (Benz) (n=7) indujeron niveles significativamente superiores de proliferación de células T autólogas en comparación con el control negativo (p=3.47E-11, p=7.86E-06, p=6.25E-12, p=7.59E-07 y p=1.93E-15, respectivamente). La comparación de los no-alérgenos con los alérgenos mostró que Lamotrigina indujo una proliferación significativamente mayor de células T autólogas comparado con Metformina (p=2.32E-05), MTX (p=6.09E-11) y Simvastatina (p=0.03). La Amoxicilina indujo una proliferación significativamente mayor de células T autólogas comparado con Metformina (p=0.0003) y MTX (p=1.005E-11) y Simvastatina (p=0.03)). La Penicilina indujo una proliferación significativamente mayor de células T autólogas comparado con Metformina (p=8.55E-05) y MTX (p=7.45E-08). La Neomicina indujo una proliferación significativamente mayor de células T autólogas comparado con Metformina (p=8.85E-06), MTX (p=1.53E-11) y Simvastatina (p=0.001). La Benzocaína indujo una proliferación significativamente mayor de células T autólogas comparado con Metformina (p=3.33E-07), MTX (p=5.34E-12) y Simvastatina (p=0.0001). Las DC rápidas sin tratar cultivadas con células T alogénicas (control positivo) (n=12) mostraron significativamente mayor proliferación de células T comparado con todos los no-alérgenos y todos los alérgenos con excepción de la Benzocaína.

Niveles de IFN- γ en respuesta a los alérgenos y no alérgenos

20 Se escogieron los alérgenos Lam, Amox, Pen, Neo y Benz. Las concentraciones de los productos químicos usados fue 100 μ g/ml Lam, 100 μ g/ml Amox, 100 μ g/ml Pen, 10 μ g/ml Neo y 10 μ g/ml Benz.

Se escogieron los no alérgenos SimV, Met, y MTX. La concentración de los productos químicos usados fue 10 μ g/ml para cada uno de SimV, Met, y MTX.

25 Las DC rápidas tratadas con fármaco con alérgenos (negro) y no-alérgenos (gris) se co-cultivaron con células autólogas durante cinco días. Los sobrenadantes se colectaron y los niveles de interferón- γ se midieron mediante análisis por FACs (citometría de flujo).

30 Como se ilustra en la Figura 9, las DC rápidas tratadas con fármaco se co-cultivaron con células autólogas durante cinco días, los sobrenadantes se recogieron y se midieron los niveles de interferón- γ mediante análisis por FACs. Las DC rápidas no tratadas (control negativo) (n=23) y los no alérgenos Metformina (n=13), MTX (n=10) y Simvastatina (n=10) produjeron niveles inferiores de IFN- γ . Las DC rápidas tratadas con alérgenos Lamotrigina (n=10), Amoxicilina (n=15), Penicilina (n=14), Neomicina (n=9) y Benzocaína (n=8) produjeron niveles significativamente superiores de IFN- γ comparado con el control negativo (p=0.01, p=0.001, p=0.001, p=0.004 y p=0.0007). La comparación de los alérgenos y no alérgenos mostró que la amoxicilina produjo niveles de IFN- γ significativamente superiores cuando se compara con simvastatina (p=0.001). La Penicilina produjo niveles de IFN- γ significativamente superiores cuando se compara con Metformina (p=0.05). La Neomicina produjo niveles de IFN- γ significativamente superiores cuando se compara con Simvastatina (p=0.06) y la benzocaína produjo niveles de IFN- γ significativamente superiores cuando se compara con Metformina, MTX y simvastatina (p=0.02, p=0.002 and p=0.05). Las DC rápidas no tratadas cultivadas con células T alogénicas (control positivo) (n=20) mostraron niveles de IFN- γ significativamente superiores comparado con las DC rápidas sin tratar + células T autólogas (p=0.0001).

Proliferación de las células T en respuesta a sensibilizadores y no-sensibilizadores

40 Se escogieron los sensibilizadores químicos, NiSO₄, 2Mercap, Cinn, DNCB y eugenol. Las concentraciones de los productos químicos usados fue 0.1 μ M DNCB, 15 μ M eugenol, 0.1 μ M NiSO₄, 0.1 μ M Cinn, y 0.1 μ M 2mercap. Los productos químicos se disolvieron según las instrucciones del proveedor sobre la solubilidad. El DNCB se disolvió en DMSO (LabScan, Dublin, Ireland), eugenol se disolvió en 70% alcohol etílico (Fisher Scientific, UK). NiSO₄, Cinn, 2Mercap se prepararon en dH₂O.

45 Se escogieron los no sensibilizadores químicos SDS, LGA, Triton-X, ZnSO₄, DMSO. La concentración de los productos químicos usados fue 10ng/ml SDS, 0.1 μ M LGA, 0.0001% Triton-X, 0.1 μ M ZnSO₄, 0.0001% DMSO. SDS, DMSO y tritón X-100 se disolvieron en RPMI (Gibco UK). ZnSO₄, LGA se preparó en dH₂O.

50 Las DC rápidas se trataron con sensibilizadores (negro) y no-sensibilizadores (gris) durante 24 horas antes de co-cultivar con las células autólogas durante cinco días. A las células se les dio un pulso con [³H] timidina en el día cinco y se recolectaron después de 18 horas.

55 Como se ilustra en la Figura 10, DC rápidas no tratadas (control negativo) (n=21) y no sensibilizadores SDS (n=13) tritón-X (n=6), ZnSO₄ (n=5), LGA (n=5), DMSO (n=5), permanganato potásico (n=7), isopropanol (n=7), dimetilformamida (n=3), glicerina (n=7), Tween 20 (n=5) indujeron una proliferación inferior de las células T autólogas. Los sensibilizadores eugenol (n=11), NiSO₄ (n=6), DNCB (n=6), 2 Mercap (n=8) y cinamaldehído (n=5) indujeron niveles significativamente superiores de proliferación de células T autólogas en comparación con el control negativo (p=1.63e-09, p=2.96e-07, p=3.05e-08, p=0.005 y p=1.67e-05, respectivamente). La comparación de los no

sensibilizadores con los sensibilizadores mostró que SDS indujo una proliferación significativamente inferior de las células T autólogas que los sensibilizadores eugenol, NiSO₄, DNCB y Cinn ($p=2.13E-06$, $p=3.29E-05$, $p=4.29E-06$, y $p=0.0004$). El Tritón-X indujo una proliferación significativamente inferior de las células T autólogas comparado con los sensibilizadores eugenol, NiSO₄, DNCB, y Cinn ($p=0.0001$, $p=0.0001$, $p=0.0001$, $p=9.45E-05$ y $p=0.004$, respectivamente). El ácido glutámico (LGA) indujo una proliferación significativamente inferior de las células T autólogas comparado con los sensibilizadores eugenol, NiSO₄ y DNCB y Cinn ($p=0.003$, $p=0.007$, $p=0.002$ y $p=0.02$). El sulfato de zinc (ZnSo₄) indujo una proliferación significativamente inferior de las células T autólogas comparado con los sensibilizadores eugenol, NiSO₄, DNCB y Cinn ($p=0.01$, $p=0.01$, $p=0.005$ y $p=0.02$). El no sensibilizador DMSO indujo una proliferación significativamente inferior de las células T autólogas comparado con los sensibilizadores DNCB ($p=0.05$). El permanganato potásico indujo una proliferación significativamente inferior de las células T autólogas comparado con los sensibilizadores eugenol, NiSO₄, DNCB, 2Mercap y Cinn ($p=4.24E-06$, $p=9.53E-06$, $p=1.63E-05$, $p=0.01$ y $p=2.36E-05$). El isopropanol indujo una proliferación significativamente inferior de las células T autólogas comparado con los sensibilizadores eugenol, NiSO₄, DNCB, 2Mercap y Cinn ($p=1.11E-05$, $p=4.65E-05$, $p=3.25E-05$, $p=0.03$ y $p=0.0002$). La Dimetilformamida indujo una proliferación significativamente inferior de las células T autólogas comparado con los sensibilizadores eugenol, NiSO₄, DNCB, 2Mercap y Cinn ($p=3.22E-06$, $p=5.05E-06$, $p=1.41E-05$, $p=0.009$ y $p=7.79E-06$). El glicerina indujo una proliferación significativamente inferior de las células T autólogas comparado con los sensibilizadores eugenol, NiSO₄, DNCB, 2Mercap y Cinn ($p=3.86E-08$, $p=5.32E-08$, $p=4.89E-07$, $p=0.0006$ y $p=5.09E-06$). Tween glicerina indujo una proliferación significativamente inferior de las células T autólogas comparado con los sensibilizadores eugenol, NiSO₄, DNCB, 2Mercap y Cinn ($p=7.77E-05$, $p=0.0001$, $p=0.0002$, $p=0.03$ y $p=0.0002$). Las DC rápidas no tratadas cultivadas con células T alogénicas (control positivo) ($n=21$) mostraron una proliferación significativamente mayor de células T comparado con todas las condiciones.

Niveles de IFN- γ en respuesta a sensibilizadores y no-sensibilizadores

Se escogieron los sensibilizadores químicos, NiSO₄, 2Mercap, Cinn, DNCB y eugenol. Las concentraciones de los productos químicos usados fue 0.1 μ M DNCB, 15 μ M eugenol, 0.1 μ M NiSO₄, 0.1 μ M Cinn, y 0.1 μ M 2mercap. Los productos químicos se disolvieron según las instrucciones del proveedor sobre la solubilidad. El DNCB se disolvió en DMSO (LabScan, Dublin, Ireland), eugenol se disolvió en 70% alcohol etílico (Fisher Scientific, UK). NiSO₄, Cinn, 2Mercap se prepararon en dH₂O.

Se escogieron los no sensibilizadores químicos SDS, LGA, Triton-X, ZnSO₄, y DMSO. La concentración de los productos químicos usados fue 10ng/ml SDS, 0.1 μ M LGA, 0.0001% Triton-X, 0.1 μ M ZnSO₄, 0.0001% DMSO. SDS y tritón X-100 se disolvieron en RPMI (Gibco UK). SDS y tritón X-100 y DMSO se disolvieron en RPMI (Gibco UK). ZnSO₄, LGA se preparó en dH₂O.

Las DC rápidas tratadas con fármaco con sensibilizadores (negro) y no-sensibilizadores (gris) se co-cultivaron con células autólogas durante cinco días. Los sobrenadantes se colectaron y los niveles de interferón- γ se midieron mediante análisis por FACs (citometría de flujo).

Como se ilustra en la Figura 11, las células T activadas en respuesta a los sensibilizadores (rojo) produjeron niveles de IFN- γ significativamente superiores en comparación con los no-sensibilizadores. El eugenol produjo niveles de IFN- γ significativamente superiores comparado con SDS, tritón-X, ZnSo₄ y LGA ($p=0.01$, $p=0.04$, 0.03 y $p=0.04$). El sensibilizador NiSO₄ produjo niveles de IFN- γ significativamente superiores comparado con SDS, tritón-X, ZnSO₄, LGA ($p=0.009$, $p=0.02$, $p=0.01$ y $p=0.003$). El sensibilizador DNCB produjo niveles de IFN- γ significativamente superiores comparado con todos los no sensibilizadores SDS, tritón-X, ZnSo₄ ($p=0.04$, y LGA $p=0.0003$). El cinamaldehido produjo niveles de IFN- γ significativamente superiores comparado con SDS, tritón -X, ZnSo₄ ($p=0.04$ y $p=0.02$, $p=0.009$). El sensibilizador 2Mercap produjo niveles de IFN- γ significativamente superiores comparado con SDS, y DMSO ($p=0.04$ y $p=0.02$).

Correlación entre los niveles de producción de IFN- γ y el nivel de daño histológico observado en el ensayo de explante de piel

Como se ilustra en la Figura 18, se observó una correlación positiva entre el aumento de los niveles de IFN- γ y el nivel de grados positivos en el ensayo de explantes de piel de la invención. Además, como se ilustra en la Figura 19, el coeficiente de correlación fue de producción de IFN γ con los grados del ensayo de explantes de piel de la invención.

Una prueba de correlación de rango de Spearman se usó para comparar los explantes de piel grados I, II y III. Los grados II y III se consideraron positivos y los grados 0-I negativo con niveles de IFN γ individuales.

Correlación entre los niveles de proliferación de células T y el daño histológico observado en el ensayo de explante de piel

Como se ilustra en la Figura 20 se observó una correlación positiva significativa entre el aumento de los niveles de proliferación de células T y los grados positivos en el ensayo de explantes de piel de la invención. Además, como se ilustra en la Figura 21 el coeficiente de correlación fue de los valores de proliferación de las células T con los grados del ensayo de explantes de piel de la invención.

Una prueba de correlación de rango de Spearman se usó para comparar los explantes de piel grados I, II y III. Los grados II y III se consideraron positivos y los grados 0-I negativos con resultados de proliferación de células T individuales.

EJEMPLO 9

5 Prueba de distintas formulaciones de anticuerpos sobre piel normal

10 Para validar el ensayo como una herramienta eficaz para la predicción de las respuestas alérgicas a nuevos tratamientos terapéuticos antes de probar en el hombre diversas formulaciones de anticuerpos se probaron en una biopsia de piel normal en presencia y ausencia de linfocitos autólogos en condiciones libres de suero. Dos anticuerpos se probaron (anticuerpo A y anticuerpo B). El anticuerpo B fue el control positivo y el anticuerpo A fue el anticuerpo de prueba usado a dos concentraciones diferentes. Se usó un control positivo adicional de células autólogas activadas con PHA. La piel incubada en medio solo se usó como un control negativo. Se midió la liberación de citocinas (IFN- γ y TNF- α) y aumentó significativamente en presencia de células autólogas (datos no mostrados).

15 El daño histológico en la piel en respuesta al anticuerpo A (0.1 ug/ml y 0.01 ug/ml) y el anticuerpo B (0.1 ug/ml) se ilustra en la Figura 22. La Figura 23 ilustra el daño histológico en la piel en respuesta al anticuerpo en ausencia de células autólogas. Se observó menor daño en ausencia de células autólogas (comparado con la presencia de células autólogas). Las imágenes muestran el daño histológico en la piel en el control negativo (medio solo) y el control positivo (anticuerpo B).

Los resultados ilustran que se observó un mayor grado de reacción donde las células autólogas y el anticuerpo se añadieron a la piel (Figura 22) comparado donde se añadió el anticuerpo solo a la piel (Figura 23).

20 Determinación de la exactitud del ensayo de explantes de piel para las respuestas de anticuerpos

25 Se realizó una prueba de Chi-cuadrado para ver si había una correlación positiva entre la observación esperada y los datos observados por medio del uso del ensayo de explante de biopsia de piel para el anticuerpo A (A+B) y el anticuerpo B (C+D). Las pruebas mostraron que había una fuerte correlación positiva entre el grado esperado y el grado observado en el explante de piel ($p < 0.005$). Estos datos muestran que el ensayo de explantes de biopsia de piel puede predecir la respuesta inmune de un anticuerpo.

Los anticuerpos se probaron con y sin células autólogas sobre la piel. Se realizó una prueba de Chi-cuadrado para comparar la observación esperada con la observación real y se observó una correlación positiva de $P < 0.005$ (es decir, un grado positivo II o por encima se correlacionó con un resultado positivo conocido) como se ilustra en la Figura 24.

30 El ensayo de la presente invención proporciona, hasta donde sabemos, la primera demostración de que una hipersensibilidad o reacción alérgica en explantes de piel se pueden usar para discriminar entre sensibilizadores y no-sensibilizadores. Los datos han mostrado que una reacción en la piel debido a la exposición ya sea a penicilina o un sensibilizador se puede detectar y proporciona la base para un ensayo robusto, exacto para probar nuevos compuestos para la hipersensibilidad y reacciones alérgicas

35 A través de toda la descripción y reivindicaciones de esta descripción, las palabras "comprender" y "contiene" y las variaciones de las palabras significa "que incluyen pero sin limitarse a", y no se pretende excluir (y no se excluyen) otras porciones, aditivos componentes, enteros o etapas. A través de toda la descripción y reivindicaciones de esta descripción, el singular abarca el plural a menos que el contexto lo requiera de cualquier otra forma. En particular, donde se use el artículo indefinido en la especificación, se entiende que contempla los plurales así como los singulares, a menos que el contexto requiera otra cosa.

40 Los rasgos, enteros, características, compuestos, porciones químicas o grupos descritos en conjunto con un aspecto particular, modalidad o ejemplo de la invención se entiende que son aplicables a cualquier otro aspecto, modalidad o ejemplo descrito en la presente a menos que sea incompatible con éste. Todas las características descritas en esta descripción (que incluye cualquier reivindicación anexa, resumen y dibujos), y/o todas las etapas de cualquier método o proceso así descrito, se puede combinar en cualquier combinación, excepto combinaciones donde al menos alguna de esas características y/o etapas son mutuamente exclusivas.

45

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para identificar compuestos químicos que son sensibilizadores o no sensibilizadores y/o alérgenos o no alérgenos, el método comprende
- 5 (i) preparar una muestra de sangre de donantes para aislar una población de células T y una población de células dendríticas derivadas de monocitos de ahí;
- (ii) incubar las células dendríticas derivadas de monocitos con un compuesto de prueba entre 2 a 24 horas;
- 10 (iii) incubar las células dendríticas derivadas de monocitos tratadas con el compuesto con la población de células T aisladas en la etapa (i) entre 3 a 7 días por medio del uso de las mismas condiciones de cultivo como para la etapa (ii) excepto que si el suero de ternera fetal se usa en la etapa (ii), se reemplaza con suero autólogo inactivado por calor;
- (iv) incubar las células T y las células dendríticas derivadas de monocitos tratadas con el compuesto de (iii) con una muestra de biopsia de piel obtenida a partir del mismo donante entre 1 a 3 días; y
- 15 (v) evaluar la hipersensibilidad y las reacciones alérgicas por cambios histológicos clasificados en la muestra de biopsia de piel en comparación con un control, en donde los cambios histológicos son ya sea vacuolización de las células epidérmicas, o daños a los queratinocitos basales o la conexión entre la epidermis y la dermis;
- en donde se usan condiciones de cultivo de células que permitan el crecimiento y mantenimiento de las células.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el donante es un donante humano.
- 20 3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en donde las células T y las células dendríticas derivadas de monocitos (DCs) se aíslan a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde las células dendríticas se generan a partir de monocitos CD14+ a partir de PBMCs y el resto de la población de PBMC agotada de monocitos se usa como la preparación de "células T" de la etapa (iii).
- 25 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde las células dendríticas son ya sea células dendríticas estándar o maduras rápido.
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la biopsia de piel es una biopsia de raspado o de ponche que comprende una tira o cuadrado de piel de aproximadamente 4 mm de área.
- 30 7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que incluyen adicionalmente el análisis de la expresión de las células T y/o las células dendríticas derivadas de monocitos.
8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el control se selecciona a partir del grupo que comprende:
- 35 (i) una muestra adicional o segunda que se ha sometido al método de la reivindicación 1, excepto que las células dendríticas derivadas de monocitos se ha incubado en la etapa (ii) con un compuesto que es un no-sensibilizador conocido en lugar de un compuesto de prueba;
- (ii) una muestra adicional o segunda que se ha sometido al método de la reivindicación 1, excepto que las células dendríticas derivadas de monocitos se han incubado en la etapa (ii) sin compuestos químicos adicionales en lugar de un compuesto de prueba;
- 40 (iii) una muestra adicional o segunda que se ha sometido al método de la reivindicación 1, excepto que las células dendríticas derivadas de monocitos se han incubado en la etapa (ii) sin compuestos químicos adicionales en lugar de un compuesto de prueba y las células dendríticas derivadas de monocitos de la etapa (iii) se incuban con células T alogénicas.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método es para determinar la potencia del compuesto, en donde la etapa (v) evalúa la potencia por cambios histológicos clasificados en la muestra de biopsia de piel tratada de (iv) en comparación con un control, en donde los cambios histológico son ya sea vacuolización de las células epidérmicas, o daños en los queratinocitos basales o la conexión entre la epidermis y la dermis.
- 45 10. Un ensayo *in vitro* para evaluar la hipersensibilidad y las reacciones alérgicas que comprende células dendríticas derivadas de monocitos y células T autólogas y una biopsia de piel derivada a partir del donante autólogo, en donde la hipersensibilidad y las reacciones alérgicas se evalúan por cambios histológicos clasificados en la muestra de biopsia de piel, en donde los cambios histológicos son o vacuolización de las células epidérmicas, o daños en los queratinocitos basales o la conexión entre la epidermis y la dermis.
- 50 11. Un método *in vitro* para identificar anticuerpos que son sensibilizadores o no-sensibilizadores y/o alérgenos o no alérgenos, el método comprende
- 55

(i) incubar una población de células mononucleares de sangre periférica aisladas a partir de una muestra de sangre del donante con un anticuerpo de prueba;

(ii) incubar las células mononucleares de sangre periférica tratadas con el anticuerpo de (i) con una muestra de biopsia de piel obtenida a partir del mismo donante; y

5 (iii) evaluar la hipersensibilidad y las reacciones alérgicas por cambios histológicos clasificados en la muestra de biopsia de piel tratada de (ii) en comparación con un control, en donde los cambios histológicos son ya sea vacuolización de las células epidérmicas, o daños a los queratinocitos basales o la conexión entre la epidermis y la dermis.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el donante es un donante humano.

10 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en donde la biopsia de piel es una biopsia de raspado que comprende una tira o cuadrado de piel de aproximadamente 4 mm de área.

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el método es para determinar la potencia de un anticuerpo, en donde la etapa (iii) evalúa la potencia por cambios histológicos clasificados en la muestra de biopsia de piel tratada de (ii) en comparación con un control, en donde los cambios histológicos son ya sea vacuolización de las células epidérmicas, o daños en los queratinocitos basales o la conexión entre la epidermis y la dermis.

15

15. Uso de un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para determinar el modo de acción de sensibilización de un compuesto de prueba.

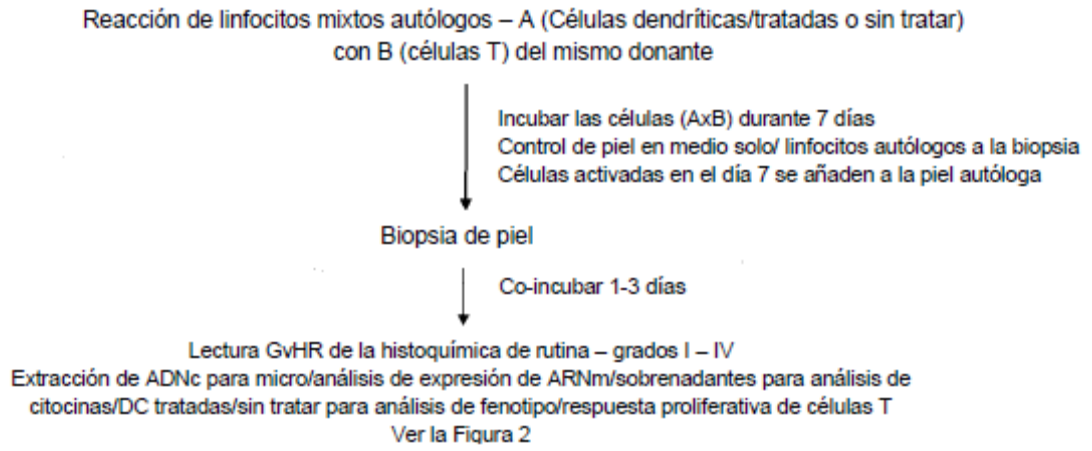


FIGURA 1

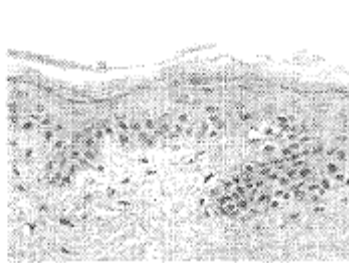


FIGURA 2A

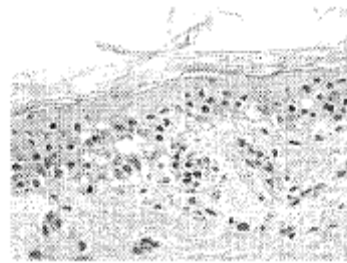


FIGURA 2B

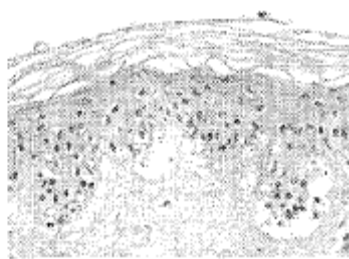


FIGURA 2C

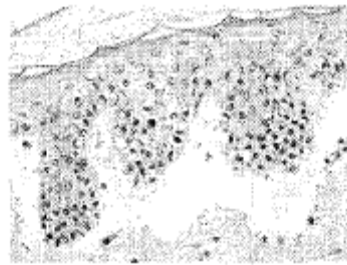


FIGURA 2D

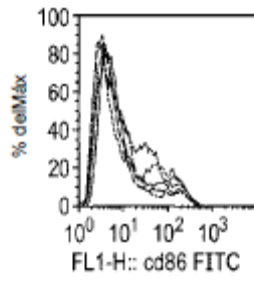


FIGURA 3A

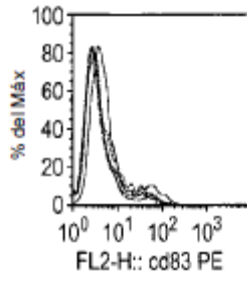


FIGURA 3B

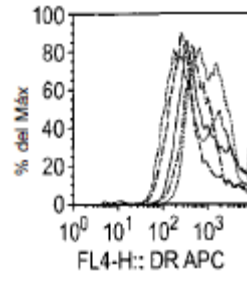


FIGURA 3C

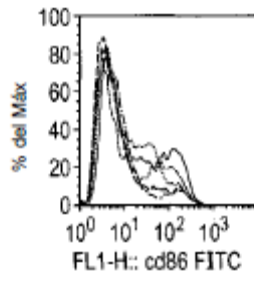


FIGURA 4A

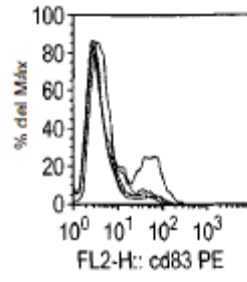


FIGURA 4B

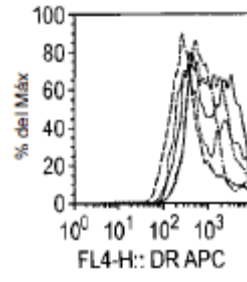


FIGURA 4C

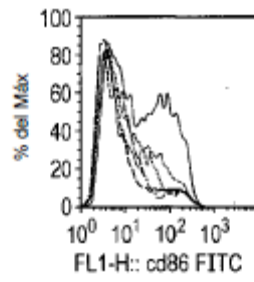


FIGURA 4D

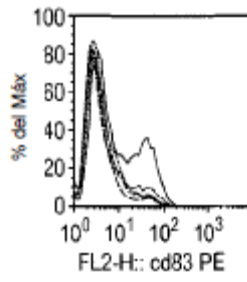


FIGURA 4E

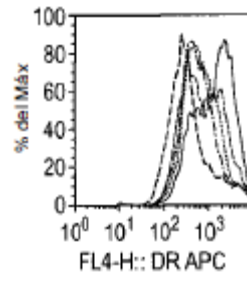
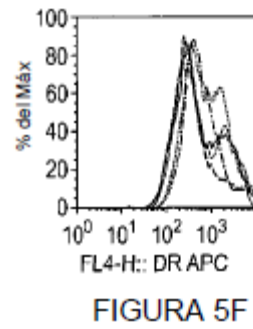
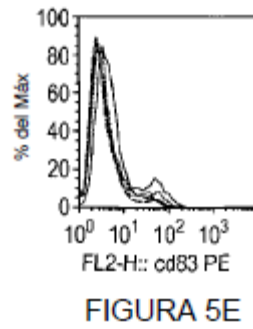
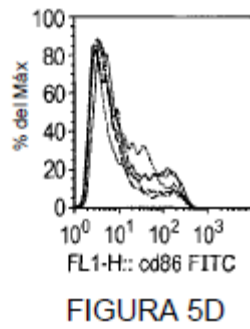
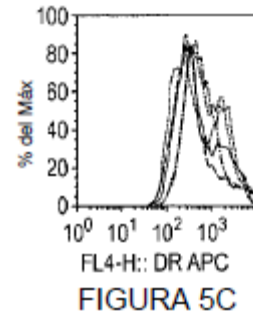
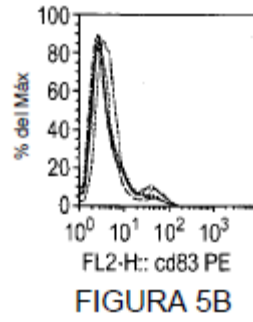
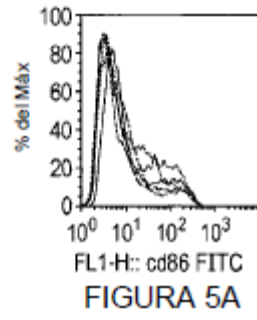


FIGURA 4F



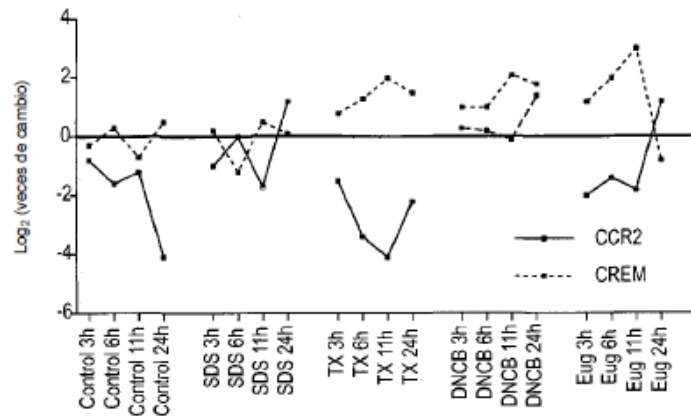


FIGURA 6

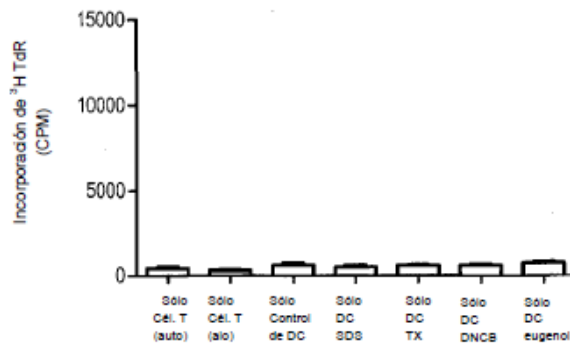


FIGURA 7A

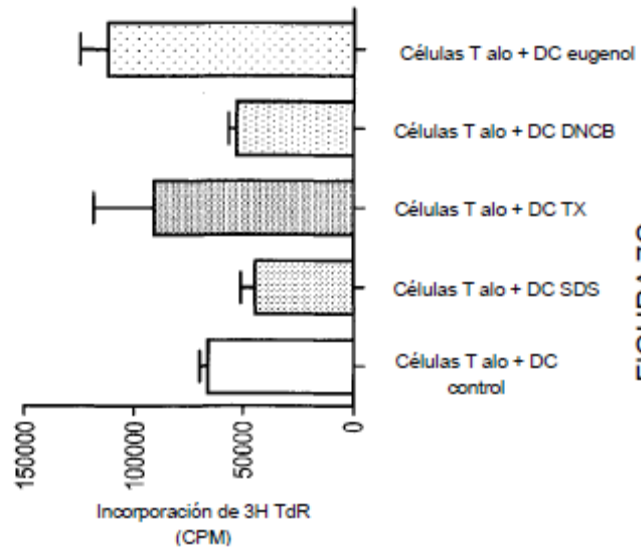


FIGURA 7C

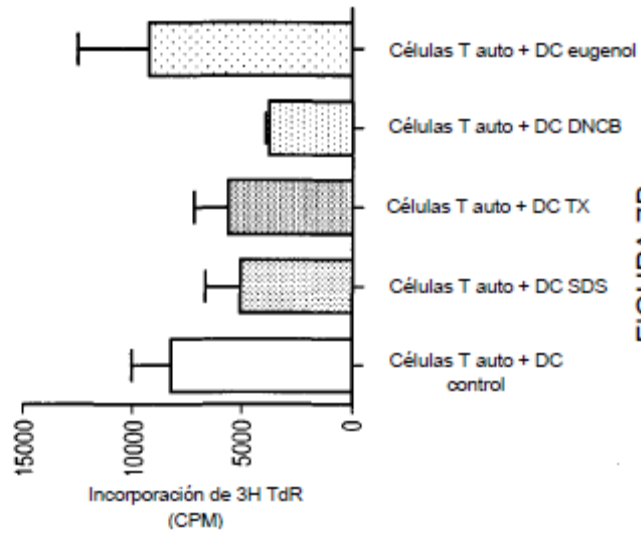


FIGURA 7B

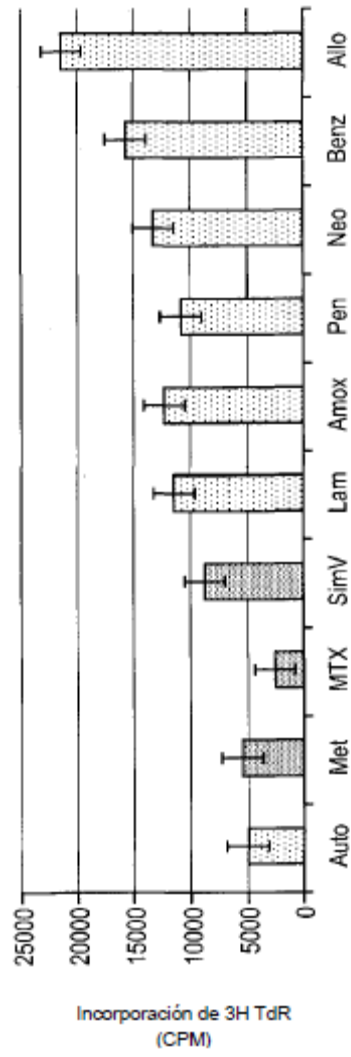


FIGURA 8

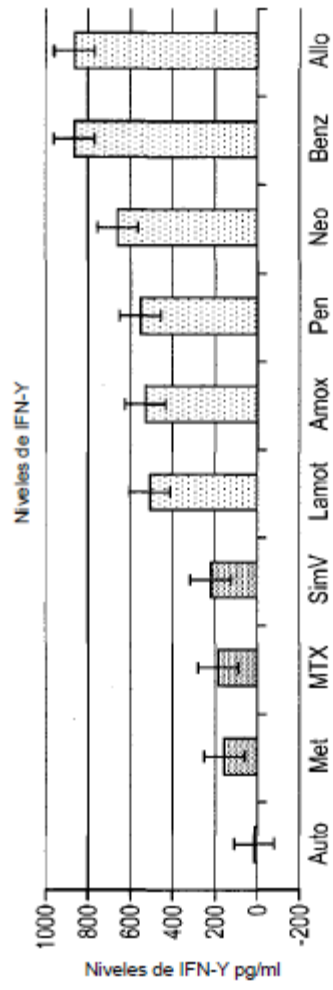


FIGURA 9

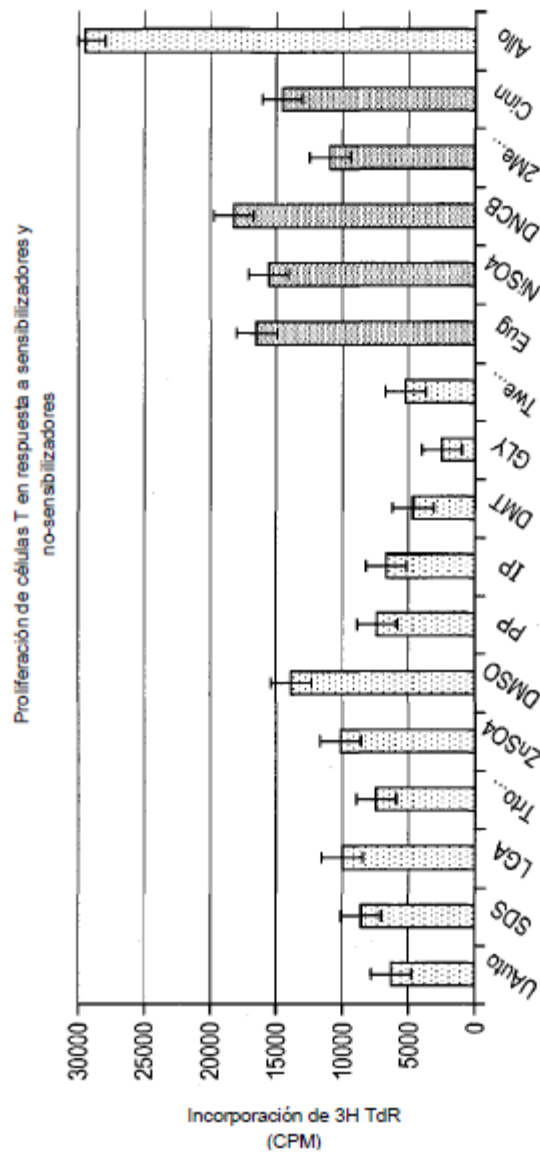


FIGURA 10

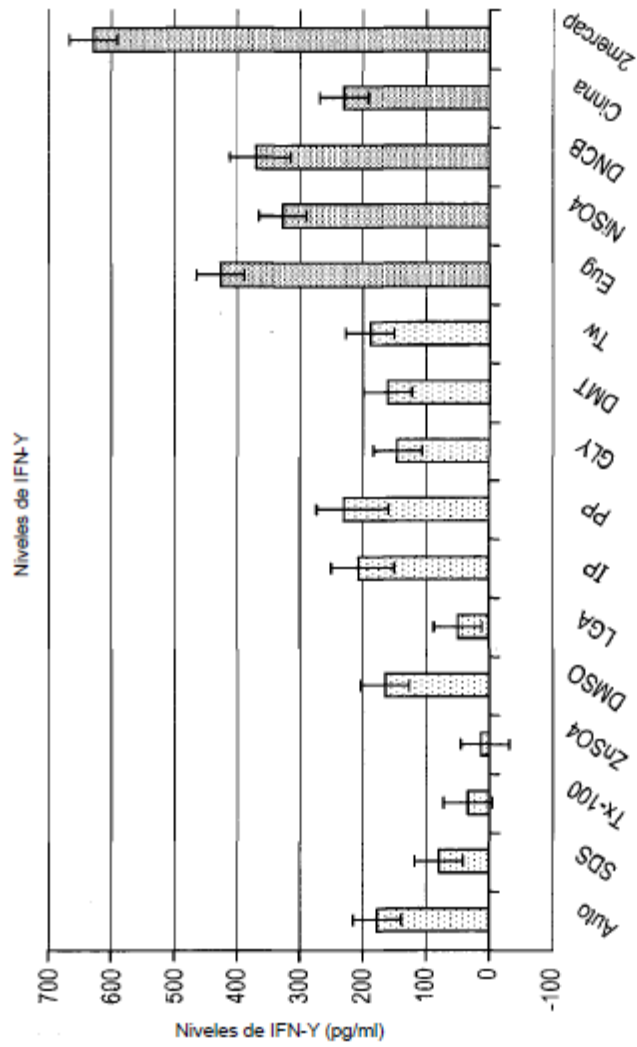


FIGURA 11

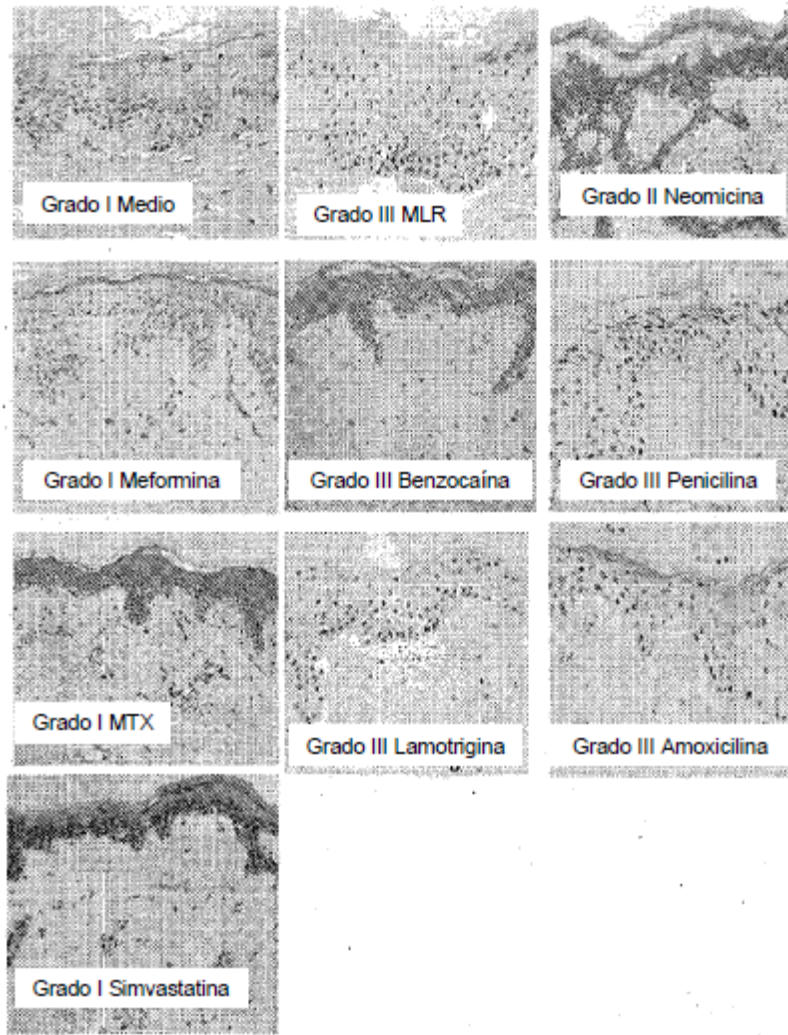


FIGURA 12

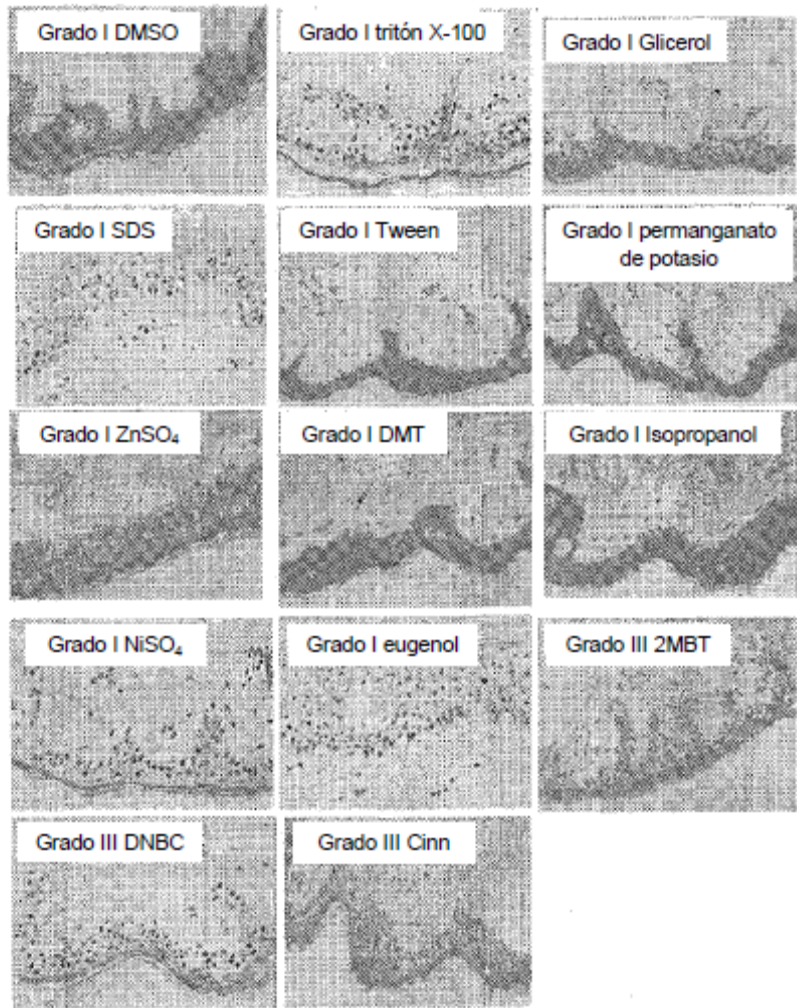
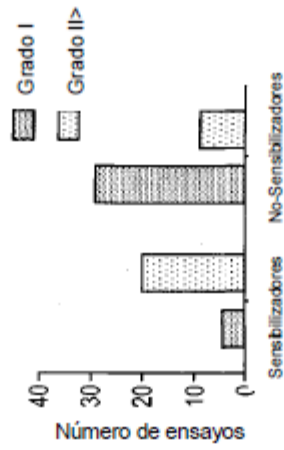
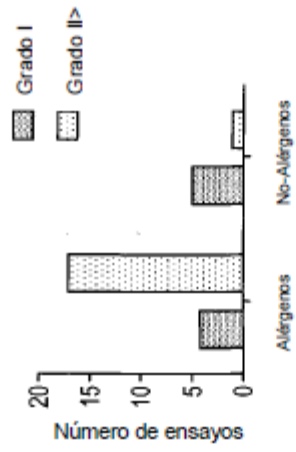


FIGURA 13



	Grado 1	Grado 2>	Total
Sensibilizadores	4	20	24
No-Sensibilizadores	29	9	38

FIGURA 14



	Grado 1	Grado 2>	Total
Alérgenos	4	17	21
No-Alérgenos	5	1	6

FIGURA 15

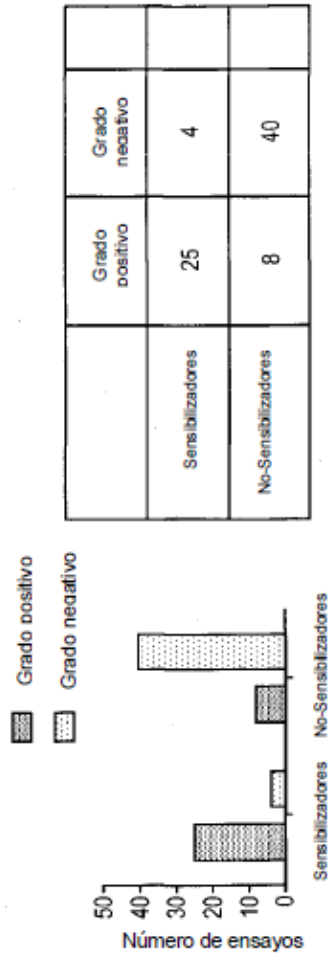


FIGURA 16

Correlaciones

		LLNA	GVHR
rho de Spearman	LLNA	1.000	.413**
	Coeficiente de correlación		
	Sig. (2 colas)		.004
	N	47	47
GVHR	GVHR	.413**	1.000
	Coeficiente de correlación		
	Sig. (2 colas)		.004
	N	47	47

** . La correlación es significativa al nivel de 0.01 (2 colas)

FIGURA 17

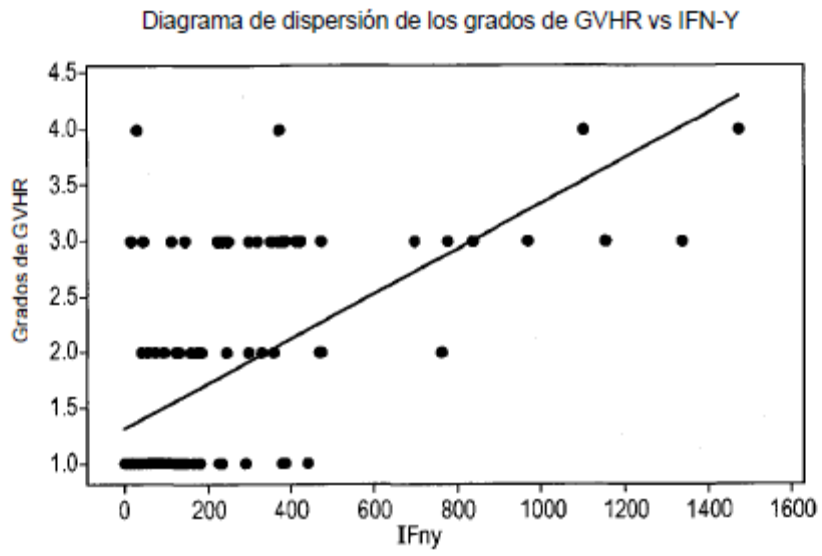


FIGURA 18

Correlaciones

		IFNy	Grados de GVHR
rho de Spearman	IFNy	1.000	.616**
	Coefficiente de correlación Sig. (2 colas) N		.000 106
Grados de GVHR	Coefficiente de correlación	.616**	1.000
	Sig. (2 colas) N	.000 106	

** . La correlación es significativa al nivel de 0.01 (2 colas)

FIGURA 19

Diagrama de dispersión de los grados de GVHR vs proliferación de células T

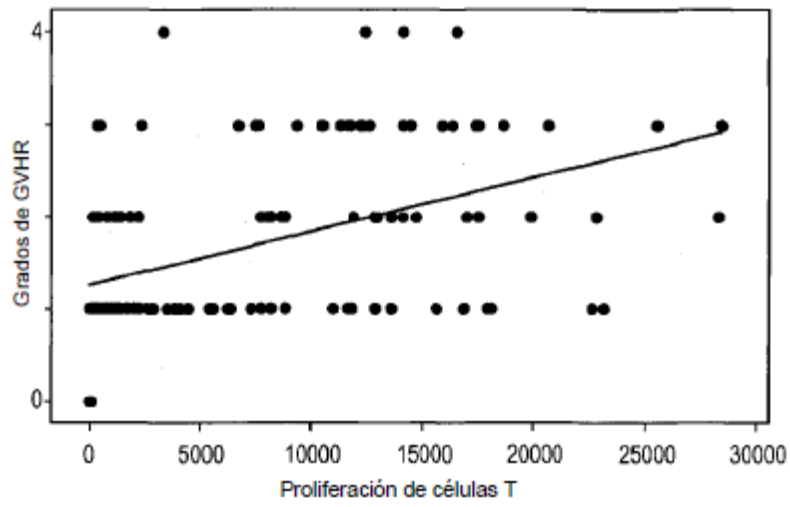


FIGURA 20

Correlaciones

		Prof. de células T	Grados de GVHR
rho de Spearman	Proliferación de células T	1.000	.449**
	Coefficiente de correlación Sig. (2 colas) N		.000 87
Grados de GVHR	Coefficiente de correlación	.449**	1.000
	Sig. (2 colas) N	.000 87	

** La correlación es significativa al nivel de 0.01 (2 colas)

FIGURA 21

(IHC representativa)

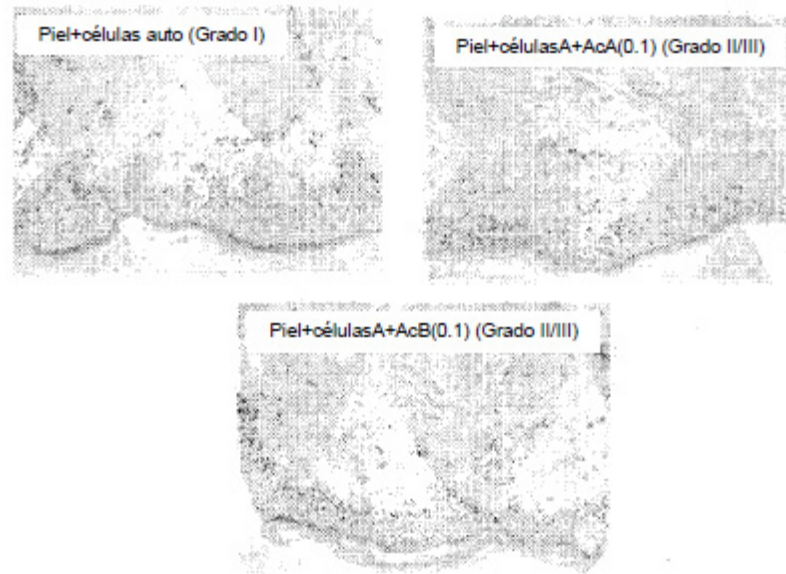


FIGURA 22

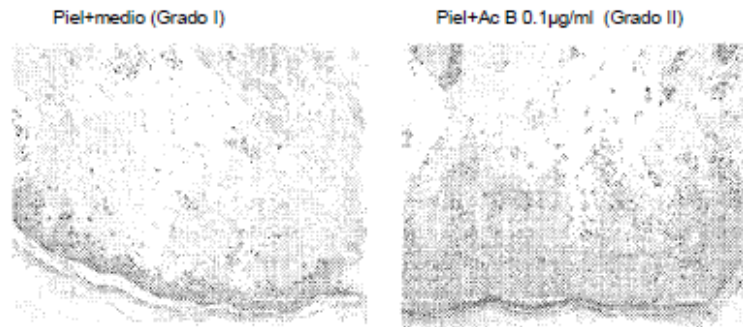


FIGURA 23

	Grado I	Grado II>	Total
Anticuerpo A	0	4	4
Medio	4	0	4

FIGURA 24A

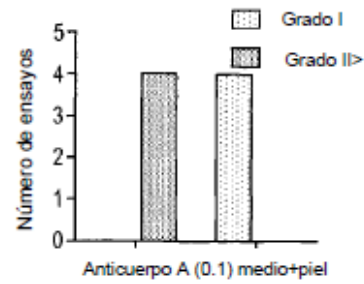


FIGURA 24B

	Grado I	Grado II>	Total
Anticuerpo B	0	4	4
Medio	4	0	4

FIGURA 24C

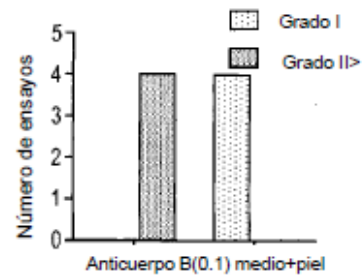


FIGURA 24D