



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 352 929**

⑫ Número de solicitud: 200930599

⑮ Int. Cl.:
A01K 67/02 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **14.08.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **24.02.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
24.02.2011

⑰ Solicitante/s: **Centro de Investigaciones
Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas
(CIEMAT)**
Avda. Complutense, 22
28040 Madrid, ES
Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del
Principado de Asturias

⑱ Inventor/es: **Jorcano Noval, José Luis;**
Meana Infiesta, Álvaro;
Carretero Trillo, Marta;
Larcher Laguzzi, Fernando;
Guerrero Aspizua, Sara;
García Díez, Marta y
Río Nechaevsky, Marcela del

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Modelo humanizado de psoriasis.**

㉑ Resumen:

Modelo humanizado de psoriasis.

La presente invención se refiere a un nuevo modelo animal humanizado de psoriasis. Dicho modelo se genera mediante el injerto de equivalentes de piel humanizada en el animal, la inyección de linfocitos T y citoquinas implicadas en la generación de la enfermedad en humanos, y la realización de la técnica de *tape-stripping* para generar un daño en dichos equivalentes injertados. Dicho modelo puede ser utilizado para el estudio de la enfermedad así como para la identificación y evaluación de la eficacia de compuestos frente a dicha enfermedad.

ES 2 352 929 A1

DESCRIPCIÓN

Modelo humanizado de psoriasis.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biotecnología y se refiere a un método para inducir un fenotipo psoriático en un mamífero no humano, al modelo animal de psoriasis obtenible por dicho método y a su uso para la identificación y evaluación de la eficacia de nuevos tratamientos.

Estado de la técnica anterior

10 La psoriasis es una enfermedad ampliamente extendida alrededor del mundo, y afecta a alrededor del 2% de la población, aunque su distribución no es homogénea. Se trata de una enfermedad caracterizada por la aparición de placas pápulo-escamosas de color rojo y cubiertas por escamas. Se encuentran en mayor medida en zonas del organismo sometidas a una alta fricción como, por ejemplo, la parte externa de rodillas y codos o la zona lumbosacra.
15 Además, se suele dar el fenómeno de Koebner, que se caracteriza por la aparición de placas en zonas sometidas a presión o que sufren algún trauma.

En cuanto a su etiología, cada vez existen un mayor número de indicios que apuntan hacia un origen multifactorial de la enfermedad. Esta parece estar determinada por elementos tanto genéticos como ambientales, así como por factores inmunológicos y epidérmicos. Dentro del componente inmunológico se ha demostrado que los elementos con una mayor importancia en la inducción y progresión de la inflamación subyacente a la enfermedad, son los linfocitos T. Existe una estrecha relación entre el desequilibrio Th1/Th2 y la aparición de ciertas enfermedades autoinmunes. Está bien documentado que las células T activadas son, en parte, responsables de los cambios fenotípicos observados en la piel psoriática. Entre ellas, las células de tipo 1 parecen jugar un papel fundamental en la patogénesis de la psoriasis (Schlaak *et al.* 1994. *J Invest Dermatol*; 102: 145-149). Otra subpoblación de células T, denominada Th17, se ha caracterizado recientemente como una subpoblación distinta de las subpoblaciones de células Th1 y Th2. Inicialmente se informó de que estas células desempeñaban papeles importantes en la inmunopatología de diferentes modelos experimentales de ratón autoinmune (encefalomielitis autoinmune experimental (EAE); artritis inducida por colágeno (CIA)) (Cua *et al.* 2003 *Nature*; 421:744-748; Murphy *et al.* 2003. *J Exp Med*; 198:1951-1957) y más recientemente se han identificado en varias dolencias patológicas humanas (dermatitis de contacto (RA), enfermedad de Crohn (CD) y psoriasis) (Albanesi *et al.* 1999. *J Immunol*; 162: 494-502; Aarvak *et al.* 1999. *J Immunol*; 162: 1246-1251; Annunziato *et al.* 1999. *J Leukoc Biol*; 65: 691-699; Lowes *et al.* 2008. *J Invest Dermatol*; 128: 1207-1211). En consecuencia, varios autores han descrito el perfil característico de las citoquinas de las subpoblaciones Th1/Th17, producido por las células T presentes en una placa psoriática, lo que proporciona grandes cantidades de IL-2, IFN- γ , IL-22 e IL-17 y poco o nada de IL-4 y IL-10 (Schlaak *et al.* 1994. *J Invest Dermatol*; 102: 145-149; Austin *et al.* 1999. *J Invest Dermatol*; 113: 752-759; Wolk *et al.* 2004. *Eur J Immunol* 36: 1309-1323; Blauvelt, 2008. *J Invest Dermatol*; 128: 1064-1067; Lowes *et al.* 2007. *Nature*; 445: 866-873 y Nickoloff *et al.* 2007. *Clin Dermatol*; 25: 568-573).

Por otro lado, varios estudios (Sano *et al.* 2005. *Nat Med*; 11: 43-49; Zenz *et al.* 2005. *Nature*; 137: 369-375; Danilenko. 2008. *Vet Pathol*; 45: 563-575) demostraron evidencias concluyentes que indican que las rutas de señalización alteradas en los queratinocitos podrían tener un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad. Adicionalmente, estudios recientemente publicados de amplia asociación con el genoma revelaron que una función de barrera comprometida actúa como un factor clave en la susceptibilidad a la psoriasis (Zhang *et al.* 2009. *Nat Genet*; 41: 205-210; de Cid *et al.* 2009. *Nat Genet*; 41:211-215).

A pesar de todo esto existe un gran desconocimiento respecto a esta enfermedad. Este desconocimiento se debe fundamentalmente a la dificultad para encontrar un modelo animal adecuado que reproduzca fielmente las características de la enfermedad, ya que ésta solo se da en humanos, y su generación en animales de experimentación es deficiente. Esta incapacidad de recrear de manera fehaciente la enfermedad humana en modelos animales radica fundamentalmente en las diferencias arquitectónicas y funcionales entre la piel de humanos y otros animales.

La primera aproximación que se llevó a cabo fue el uso de animales que presentaban mutaciones espontáneas y mostraban un fenotipo con algunas características similares al fenotipo de la psoriasis en el ser humano. Un ejemplo es el uso de ratones con piel escamosa (Ttc7^{fsn}/Ttc7^{fsn}) (Beamer *et al.* 1995. *Blood*; 86: 3220-3226), los cuales presentaban hiperproliferación e infiltrado inflamatorio, así como un aumento de la vascularización de la zona. Estos ratones presentaban como desventaja que estas características eran independientes de células T, y que además los tratamientos antipsoriáticos de utilidad en humanos, no mostraban eficacia contra dichos elementos, demostrando que los mecanismos implicados debían ser diferentes. Por otro lado, este fenotipo era muy complejo y presentaba características que diferían del fenotipo psoriático humano, por lo que este modelo animal no permitía reproducir la enfermedad en su totalidad.

Otros modelos utilizados para el estudio de la enfermedad han sido los animales genéticamente modificados. Existen modelos con alteraciones, por ejemplo, en TGF- β (Li *et al.* 2004. *EMBO J*; 23: 1770-1781), STAT-3 (Sano *et al.* 2005. *Nat Med*; 11: 43-49), o VEGF (Xia *et al.* 2003. *Blood*; 102: 161-168). Mediante estos modelos animales se ha podido estudiar el papel de estos factores en el trastorno psoriático, pero en general de forma independiente, y no en un contexto adecuado. Esto supone una limitación ya que esta enfermedad es multifactorial y, por lo tanto, el estudio independiente de cada factor no conduce a resultados aplicables a la enfermedad en humanos, aunque contribuye a desentrañar los complejos mecanismos moleculares subyacentes a la patología.

Dentro de estos modelos genéticos, también se engloban modelos con alteraciones en citoquinas como IL-12 o IL-23 (Kopp *et al.* 2001. *J Invest Dermatol*; 117: 618-626; Kopp *et al.* 2003. *J Immunol*; 170: 5438-5444) que han servido para comprender, al menos parcialmente, la implicación de las mismas en el desarrollo de la enfermedad. Esto ha aportado algo de luz sobre el origen, y mecanismos de acción de la enfermedad. A pesar de ello, esta aproximación tampoco ofrece todos los datos necesarios para el conocimiento del complejo desarrollo de la patología.

Por otro lado, teniendo en cuenta la supuesta implicación del sistema inmune en el desarrollo de la enfermedad, también se han desarrollado otros modelos para tratar de dilucidar esta implicación. Para ello, se han realizado también diversas aproximaciones como, por ejemplo, el trasplante de médula ósea de un individuo psoriático a un individuo inmunodeprimido. Esto produjo lesiones en la piel del individuo receptor, las cuales presentaban un fenotipo semejante al psoriático. Esto determinó que los linfocitos T derivados del donante, eran responsables de la inducción de fenotipos psoriátiformes y, por tanto, que los linfocitos T estaban implicados en el desencadenamiento y desarrollo de la psoriasis (Snowden and Heaton. 1997. *Br J Dermatol*; 137:130-132).

Otro modelo de estudio utilizado en la actualidad es el xenotrasplante de piel. Éste consiste en transferir piel afectada por psoriasis a animales inmunodeficientes, junto con la inyección de linfocitos autólogos, lo que permite la incorporación al modelo animal de todos los elementos (tanto genéticos como fenotípicos) de la psoriasis. Esta aproximación presenta algunos problemas como es la necesidad de obtener grandes cantidades de piel psoriática para los trasplantes.

En la actualidad se han desarrollado algunos otros modelos que aúnan en un mismo individuo varios de los elementos presentes en la psoriasis, y que por lo tanto, arrojan unas mejores condiciones para el estudio de esta enfermedad. Tal es, por ejemplo, el modelo de ratón inmunodeficiente, al cual se le administran a linfocitos T e interleuquina-12 (WO0034459A1). De esta forma se genera un fenotipo psoriático con características más parecidas a la enfermedad en humanos que los modelos previamente descritos, si bien no refleja la totalidad de los elementos presentes en la enfermedad.

Por lo tanto, se ha tratado de generar un modelo animal que fuese útil para el estudio de la enfermedad y presentase todas las características del fenotipo psoriático en humanos mediante distintos mecanismos. Por desgracia, y a pesar de las múltiples aproximaciones que se han realizado, hasta la fecha no se ha conseguido este objetivo. Por tanto, se hace necesaria la consecución de un modelo que reproduzca fielmente las características de la psoriasis en humanos en modelos animales para poder hacer un estudio en profundidad de los diversos factores implicados en la patogénesis, las relaciones entre ellos, así como analizar la utilidad y capacidad para prevenir o tratar la enfermedad de diversos compuestos.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un método para inducir un fenotipo psoriático en un mamífero no humano, al modelo animal de psoriasis obtenible por dicho método y a su uso para la identificación y evaluación de la eficacia de nuevos tratamientos.

La psoriasis es una enfermedad multifactorial compleja, que para poder ser estudiada, necesita disponer de un modelo animal que reproduzca sus características y permita el análisis de los diversos elementos que participan en su generación y desarrollo.

La presente invención ofrece una solución a la generación de un modelo adecuado para el estudio multifactorial de la psoriasis mediante la reproducción, en un animal, de un entorno inmunológico y epidérmico similar al presente en la enfermedad en humanos.

En la presente invención se describe un método para la generación de un fenotipo psoriático en animales, que puede ser útil para el estudio de la enfermedad ya que reproduce en el animal las características típicas de la enfermedad en humanos como son hiperproliferación epidérmica, elongación y fusión de las crestas epidérmicas interpapilares, acantosis focal, paraqueratosis, pérdida parcial del estrato granuloso, infiltrado inflamatorio dérmico y aumento de la vascularización de la región. Los autores en la presente invención demuestran que la realización de los pasos de forma independiente o la combinación de alguno de ellos, no reproduce fielmente todas las características de la psoriasis. Por lo tanto, todos los pasos son imprescindibles para generar un modelo útil de estudio de psoriasis.

El proceso se inicia mediante el injerto de equivalentes cutáneos o sustitutos dermo-epidérmicos humanos generados por ingeniería de tejidos. Mediante el uso de equivalentes de piel humana se permite una mejor reproducción de la psoriasis ya que la enfermedad no se da en animales no humanos de forma natural. Además permite un mejor análisis del fenotipo resultante. Posteriormente, se aplican de forma intradérmica en este injerto linfocitos T activados de la subpoblación Th1, que han demostrado estar implicados en el inicio, desarrollo y mantenimiento de la enfermedad. También se aplican intradérmicamente, en la zona injertada, citoquinas producidas por la otra subpoblación de linfocitos T implicada en el desarrollo de la enfermedad (subpoblación Th17). En la presente invención se demuestra que para la generación de un fenotipo psoriático completo, resulta necesario el uso de una combinación de al menos dos de estas citoquinas. Por último se realiza la técnica de *tape-stripping* (sucesivas adhesiones y retiradas de una cinta adhesiva) sobre el injerto de piel para producir una disrupción de la función barrera de la piel. Todo este proceso genera

un entorno en el injerto similar al que se produce en las regiones con placas psoriáticas en humanos, permitiendo el estudio completo de la enfermedad.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método (a partir de ahora, método de la invención) para inducir un fenotipo psoriático en un mamífero no humano que comprende:

- a) Realizar un injerto de un equivalente de piel humana, en el mamífero no humano,
- b) Administrar intradérmicamente en el equivalente injertado del paso a) de forma simultánea o secuencial:
 - Linfocitos T humanos de la subpoblación Th1, y
 - al menos dos citoquinas producidas por linfocitos Th17, y
- c) Aplicar y retirar al menos 1 vez una cinta adhesiva sobre el injerto del paso (a) para producir una disrupción de la función barrera epitelial.

Se entiende por fenotipo psoriático en la presente invención aquel fenotipo que presenta características similares a la enfermedad de la psoriasis en humanos y que se caracteriza por presentar hiperproliferación epidérmica, elongación y fusión de las crestas epidérmicas interpapilares, acantosis focal, paraqueratosis, pérdida parcial del estrato granuloso, infiltrado inflamatorio dérmico y aumento de la vascularización de la región.

En la presente invención se entiende por fenotipo, aquellas características observables en un organismo, las cuales vienen determinadas por su constitución genética y el ambiente en el vive y se desarrolla.

Se entiende por equivalente de piel en la presente invención a aquel sustituto bicapa dermo-epidérmico humano, generado *in vitro* y que puede ser injertado en animales de forma que regenere permanentemente una piel arquitectónica y funcionalmente análoga a la humana.

En la presente invención se entiende por ingeniería de tejidos el uso de una combinación de células, factores bioquímicos y/o materiales en función de sus características bioquímicas y fisicoquímicas para la generación tejidos susceptibles de reemplazar parcial o totalmente tanto estructural como funcionalmente algún tejido de un organismo.

En esta memoria se entiende por “animal” cualquier organismo del superreino Eukaryota y reino Metazoa. El término “mamífero” se utiliza para referirse a cualquier organismo del superreino Eukaryota, reino Metazoa, phylum Chordata, subphylum Craniata, superclase Gnathostomata y clase Mammalia. El término mamífero humano se refiere a organismos del superreino Eukaryota, reino Metazoa, phylum Chordata, subphylum Craniata, superclase Gnathostomata, clase Mammalia, orden Primates, Familia Hominidae, género Homo y especie *Homo sapiens*.

La realización de la técnica de *tape-stripping* tiene como función realizar una ruptura de la función barrera de la piel. Esto se realiza para reproducir el daño que, en la mayoría de las ocasiones, es el elemento desencadenante para la formación de las placas psoriáticas. Este daño ha de ser el suficiente para desencadenar la respuesta, sin llegar a generar un daño que comprometa la integridad del injerto de piel realizado. Por ello, en una realización preferida de este aspecto de la invención la adhesión y retirada de la cinta adhesiva se realiza al menos 5 veces. En una realización más preferida de este aspecto de la invención la adhesión y retirada de la cinta adhesiva se realiza al menos 10 veces. En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención la adhesión y retirada de la cinta adhesiva se realiza al menos 15 veces.

Para un correcto desarrollo del modelo, es necesario que el equivalente de piel humana tenga una evolución adecuada dentro del organismo huésped. Para ello se ha de producir la vascularización e inervación de la región injertada. Además, es necesario que no se produzca un rechazo injerto-huésped. Por ello, es aconsejable el uso de animales inmunodeficientes para la generación del modelo. Además estos individuos inmunodeficientes permiten una mejor actuación de los linfocitos T administrados y un mejor desarrollo del fenotipo psoriático. Por todo ello, en otra realización preferida de este aspecto de la invención el mamífero no humano es inmunodeficiente.

En la presente invención se entiende por individuo inmunodeficiente aquel organismo que presenta deficiencias en la respuesta inmune caracterizada por una disminución numérica y/o funcional de linfocitos T y/o B, y por tanto no es capaz de rechazar xenotrasplantes (trasplantes de una especie a otra).

Para realizar los equivalentes de piel humana, se hace necesario que en estos equivalentes se encuentren células de origen humano que le confieran esa característica de equivalente humano. Estos equivalentes normalmente están compuestos por una matriz dérmica formada uno o más elementos de la lista que comprende, aunque sin limitarnos, colágeno, ácido hialurónico y/o fibrina, y junto, sobre o dentro de la cual se encuentran uno o más tipos celulares de la lista que comprende, aunque sin limitarnos, queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y/o fibroblastos. Las células más abundantes, y de mayor relevancia en la generación de estos equivalentes de piel son los queratinocitos en la epidermis y los fibroblastos en la región dérmica. Debido a todo esto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el equivalente esta formado por una matriz de fibrina, que contiene fibroblastos y queratinocitos humanos. En la presente invención se demuestra que los fibroblastos y queratinocitos provenientes tanto de individuos

sanos, sin psoriasis, como de individuos con psoriasis, son capaces de producir el fenotipo psoriático llevando a cabo el método de la invención. Por lo tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, los fibroblastos y queratinocitos del equivalente de piel humana provienen de un enfermo de psoriasis. En otra realización preferida, los fibroblastos y queratinocitos del equivalente de piel humana provienen de un individuo sano, sin psoriasis.

En la evolución de la psoriasis en humanos se ha visto que los linfocitos que realmente se encuentran implicados son los linfocitos T, y más concretamente los pertenecientes a las subpoblaciones Th1 y Th17. Estas subpoblaciones se encuentran definidas por el perfil de citoquinas que producen y que dan lugar a diversas repuestas inmunes. La subpoblación Th1 se caracteriza por la secreción de interferón- γ e interleuquina-2, y la presencia del receptor de citoquinas CCR5. Por su parte la subpoblación de linfocitos Th17 viene caracterizada por la expresión de interleuquina-17 e interleuquina-22. Para la generación de un entorno adecuado para la evolución del fenotipo psoriático, es necesaria la aplicación de linfocitos T de la subpoblación Th1, y al menos dos citoquinas generadas por la otra subpoblación de linfocitos implicada, los linfocitos Th17 de forma intradérmica en el injerto realizado. Las citoquinas producidas por la subpoblación linfocítica Th17 que se han demostrado más importantes en la evolución de la psoriasis son las interleuquinas IL-17 e IL-22. Según los datos presentados en la presente memoria, la administración de interleuquina-22 junto al resto de los pasos ya genera un modelo hiperproliferativo útil para su estudio. Sin embargo, la administración además de IL-17 genera un modelo más completo de psoriasis. Por ello, en una realización preferida de este aspecto de la invención las citoquinas que se administran son interleuquina-22, e interleuquina-17.

Como es bien conocido, los modelos animales más extendidos para el estudio de enfermedades son aquellos realizados en roedores, principalmente ratones. Esto se debe fundamentalmente a la reducción de espacio que suponen estos animales frente otros de mayor tamaño, y a la facilidad de cría y manejo de los mismos. Por ello en una realización preferida de este aspecto de la invención, el mamífero no humano es un roedor. En una realización más preferida de este aspecto de la invención, el mamífero es un ratón.

Teniendo en cuenta que los animales inmunodeficientes presentan una mejor respuesta a los xenotrasplantes y a la administración de linfocitos, y a la mayor facilidad de manejo de ratones, se hace necesario el uso de ratones inmunodeficientes para la generación del modelo animal. Los ratones inmunodeficientes más utilizados en experimentación son aquellos que bien son ratones desnudos, los cuales presentan aplasia tímica, y por lo tanto presentan deficiencias en el desarrollo de linfocitos, o bien son ratones que presentan inmunodeficiencia combinada severa (SCID). Los ratones NOD-SCID (ratones diabéticos no obesos con inmunodeficiencia combinada severa) son ratones que no presentan linfocitos T ni B además de tener linfopenia e hipogammaglobulinemia, por lo que su respuesta inmune es deficiente. Por su parte, los ratones NMRI Foxn1^{nu} son ratones que presentan aplasia tímica debido a deficiencias en el desarrollo del epitelio tímico. Por esa deficiencia en el desarrollo tímico, presentan deficiencias en la generación de células inmunes y por lo tanto también presentan una respuesta inmune disminuida. Por todo ello, en una realización aún más preferida de la presente invención el ratón utilizado es un ratón inmunodeficiente NMRI Foxn1^{nu} o NOD-SCID.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al modelo animal generado por el método de la invención.

El modelo animal generado al presentar las características de la psoriasis en humanos, tiene una elevada utilidad tanto para el estudio de la enfermedad, como para la búsqueda de tratamientos destinados a la atenuación de los síntomas o a la curación de la enfermedad. Esto, destinado a la mejora de la calidad de vida de las personas, justifica claramente el posible sufrimiento producido en el animal para la generación del modelo. Por todo ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del modelo generado por el método de la invención para la identificación de un compuesto o composición para la prevención o tratamiento de la psoriasis. Otro aspecto de la invención se refiere al uso del modelo para evaluar la eficacia de un tratamiento preventivo o terapéutico contra la psoriasis.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Diagrama esquemático del diseño experimental para la generación del modelo animal de psoriasis.

Fig. 2. Análisis por citometría de flujo de las subpoblaciones de linfocitos T diferenciados *in vitro*. PBLs (linfocitos de sangre periférica ó *peripheral blood lymphocytes*) de donantes sanos se cultivaron con Dynabeads CD3/CD28 T Cell Expander (relación 1:1) y 30 U/ml de interleuquina-2 humana. Las células se cultivaron durante 6 días bajo estas condiciones (T0), y se añadieron IL-12 y anti-IL-4 al cultivo (T1) para inducir diferenciación. Los análisis por citometría de flujo se realizaron al sexto día de diferenciación. A) Dot plots representativos de los marcadores de superficie en las subpoblaciones T0 y T1 diferenciadas *in vitro*. B) Dot plots de patrones de tinción de citoquinas intracelulares. Los porcentajes son relativos a la proporción de células positivas definidas por la unión de anticuerpos control.

Fig. 3. *Análisis histológico de la piel humana regenerada tras la administración de linfocitos y citoquinas.* La tinción con hematoxilina/eosina se llevó a cabo en secciones, fijadas en formalina e incluidas en parafina, de injertos humanos que fueron inyectados intradérmicamente con linfocitos diferenciados de la subpoblación Th1, y/o con IL-22 e IL-17 recombinantes. Se realizó *tape-stripping* (TS) donde se indica. Se observaron áreas de hipogranulosis (HG) y paraqueratosis (PK) cuando el injerto era inyectado con citoquinas recombinantes junto con linfocitos T y se aplicaba el *tape-stripping*. Las flechas indican la presencia de capilares dilatados en la dermis (BV).

Fig. 4. *Respuesta proliferativa a la inyección dérmica y/o tape stripping en piel humana regenerada.* Las secciones fijadas con formalina se tiñeron para el marcador de proliferación Ki-67. El índice de proliferación se calculó por el porcentaje de núcleos positivos para Ki-67 por cada 100 núcleos de la capa basal, en varias áreas seleccionadas al azar.

Fig. 5. *Análisis inmunohistoquímico de marcadores epidérmicos.* Secciones consecutivas fijadas con formalina e incluidas en parafina son usadas en las figuras 3 y 4. A) Estas se tiñen para los marcadores de diferenciación involucrina y loricrina, así como para queratina-1. B) La tinción de los marcadores de hiperproliferación queratina-6 y queratina-17, y de psoriasina (hS100A7) se realizaron también en secciones consecutivas.

Fig. 6. *Análisis inmunohistoquímico y de inmunofluorescencia de células dérmicas.* La composición del infiltrado inflamatorio se analizó por análisis inmunohistoquímico de secciones consecutivas de tejido embebido en parafina y fijado con formalina, utilizando un anticuerpo anti-mieloperoxidasa (MPO) para detectar células de las series granulocíticas. Análisis de inmunofluorescencia en secciones congeladas para el antígeno específico de células T CD3- ϵ indicaron la presencia de las células T inyectadas en las secciones de criostato obtenidas de muestras de tejido adyacentes a las obtenidas para los análisis inmunohistoquímicos.

Fig. 7. *Análisis de inmunofluorescencia de la reacción angiogénica de tejido.* Se muestra el análisis de inmunofluorescencia doble para el antígeno específico de células endoteliales CD31 y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

Diseño experimental para la generación de un modelo de piel humanizada con fenotipo psoriático

La contribución de los componentes (epidérmico e inmune) a la patogénesis de la enfermedad, se consideró un factor crítico para el diseño experimental presentado en este documento con el fin de imitar la dolencia humana tanto como fuera posible. Con este fin, el conjunto de linfocitos T1 se obtuvo de sangre periférica a partir de polarización *in vitro* dirigida por citoquinas. Estas células inmunes se reintrodujeron en la piel madura de un modelo de ratón de piel humanizada mediante inyección intradérmica junto con las citoquinas recombinantes de la subpoblación Th17 IL-17 e IL-22. El modelo de ratón de piel humanizada se generó obteniendo queratinocitos y fibroblastos por digestión enzimática de una biopsia de piel humana tanto de un paciente psoriático (Figura 1A) como de un donante sano (Figura 1B). Las células se amplificaron en cultivo y se ensamblaron en un cultivo organotípico basado en fibrina que se injertó en la espalda de ratones inmunodeficientes mediante un sistema previamente caracterizado en nuestro laboratorio (Del Rio *et al.* 2002. *Hum Gene Ther*; 13:959-968; Llamas *et al.* 2004. *Transplantation*; 77:350-355). Este sistema permite obtener un gran número de ratones injertados con una área significativa de piel procedente de un único donante, siendo una de las principales ventajas de este modelo frente a otros modelos humanizados como puede ser el del xenotrasplante (Boehcke *et al.* 1996. *Nature*; 379:777; Wrone-Smith and Nickoloff 1996. *J Clin Invest*; 98: 1878-1887). Además se comprometió la función barrera de la piel usando la técnica de *tape-stripping*, un procedimiento bien caracterizado para eliminar las capas superficiales del estrato córneo y que produce hiperproliferación sin inflamación grave (Ahn *et al.* 1999. *J Invest Dermatol*; 113:189-195).

Ejemplo 2

Diferenciación In vitro de las subpoblaciones de células T1

Los autores diferenciaron células T *in vitro* hacia un fenotipo tipo 1 mediante activación y polarización dirigida por citoquinas. Con este fin, se activaron PBLs (linfocitos de sangre periférica) procedentes de pacientes psoriáticos o de donantes sanos y obtenidos por separación mediante gradiente de densidad, usando una combinación de anticuerpos

CD3/CD28 conjugados con perlas magnéticas en presencia de IL-2. La diferenciación hacia Th1 y Th2 está controlada mediante IL-12 (p35-p40) y IL-4, respectivamente. Adicionalmente, se sabe que estas citoquinas inhiben la generación del subconjunto Th opuesto. Por lo tanto, los autores usaron un procedimiento bien establecido para obtener la polarización de Th1 dirigida por citoquinas, cultivando los linfocitos T activados durante 6 días en presencia de IL-12 y anti-IL-4. Las células T0 correspondían a linfocitos T activados en cultivo en presencia de IL-2 sólo. A día 6, la proporción de células CD3+ variaba del 70% al 90% dependiendo del donante, con una relación CD4:CD8 de 1,2-1,8. El estado de activación se evaluó mediante expresión en la superficie celular de CD25 (IL-2R α), HLA-DR y CD69. Los perfiles de FACs correspondientes a un donante sano se muestran en la Figura 2A. En este caso y tras 6 días de cultivo, un elevado porcentaje de células CD4+ también expresaron CD25 (66,61% de células T1 CD4+ vs. 73,61% de células T0 CD4+). La proporción de células CD8+ que expresaba conjuntamente CD25 fue menor (44,71% de células T1 CD8+ vs. 54,49% de células T0 CD8+). En ambas poblaciones de células T CD4+ y CD8+, una elevada proporción de células expresaron HLA-DR bajo condiciones de polarización T0 o T1 (78,64% de células T1 CD8+ vs. 91,61% de células T0 CD8+ y 71,82% de células T1 CD4+ vs. 74,06% de células T0 CD4+). Por el contrario, el marcador de activación temprano mostró bajos niveles de expresión, especialmente bajo condiciones de polarización Th1 (6,61% de CD4+ y 2,60% de CD8+ en células T1 vs. 14,52% de CD4+ y 17,62% de CD8+ en células T0).

El perfil de citoquinas en las células T diferenciadas *in vitro* se evaluó mediante citometría de flujo en las subpoblaciones de células T CD4+ y CD8+ tras su estimulación con acetato de miristato de forbol (PMA) e ionomicina. En el día 6 de diferenciación de T1 un elevado porcentaje de células expresó IFN- γ (42,9% comparado con 21,69% expresando células T0 en el día 6) cuando se activaron. Una proporción reducida de células expresaron IL-2 (22,39% comparado con 42,69% células T0 que presentan expresión) y únicamente una pequeña proporción de células T1 y T0 expresaron IL-4 e IL-10 (Figura 2B). Las células T1 también produjeron grandes cantidades de GM-CSF (factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos) según se evalúa mediante un ensayo ELISA específico (datos no mostrados).

Ejemplo 3

Inyección intradérmica de linfocitos T1 diferenciados y citoquinas recombinantes en el modelo de piel humanizada

Los análisis histológicos mostraron que la inyección de linfocitos T1 junto con IL-22 recombinante y *tape-stripping* indujeron los cambios epidérmicos típicos asociados con la psoriasis, incluyendo elongación y fusión de las crestas interpapilares, acantosis focal, paraqueratosis y pérdida parcial de la capa granular. La dermis se caracteriza por un leve infiltrado inflamatorio y un aumento en la vascularización con la presencia de capilares dilatados. Cuando se añadió IL-17 recombinante a la combinación anteriormente mencionada, se observó una respuesta dérmica inflamatoria incluso más intensa en presencia de esta citoquina. Esta reacción se observó tanto en un contexto autólogo, donde la piel regenerada y las células inmunes procedían de un paciente psoriático (Figuras 1A y 3A), como, y lo que es más importante, en un contexto alogénico, donde la piel regenerada y las células inmunes procedían de donantes sanos no relacionados (Figuras 1B y 3B). En este caso, y para excluir una reacción adversa por el reconocimiento alogénico, se deplecionó la población de linfocitos T1 de células CD8+ utilizando perlas magnéticas antes de cada inyección. En este caso, y al igual que en el caso anterior, las principales características del fenotipo psoriático estaban presentes. Por el contrario, la inyección de linfocitos T1 junto con IL-22 recombinante sola no indujo el fenotipo psoriático en ausencia de *tape-stripping*, observándose únicamente una ligera reacción de hiperplasia epidérmica. De manera similar, el *tape-stripping* sólo, no indujo una reacción psoriatiforme (Figura 3B). La inmunotinción con Ki-67 reveló un aumento en el número de células positivas para Ki-67 en la epidermis procedente de injertos de piel inyectados con IL-22 sola, células T1 más IL-22 (datos no mostrados) o *tape-stripping* sólo (Figura 4), que se aumentó adicionalmente cuando se administraron conjuntamente células T1 más IL-22/IL-17 en presencia de *tape-stripping*. En este caso, las células positivas no se restringieron a la capa basal, sino que incluyeron células suprabasales (Figura 4).

Algunas de las anomalías encontradas en las lesiones psoriáticas se identificaron por análisis inmunohistoquímico de algunos marcadores de la diferenciación de queratinocitos (expresión de involucrina, loricrina y queratina). La inyección simultánea de células T1 más las citoquinas recombinantes IL-22 y IL-17 en los injertos de piel junto con *tape-stripping* es la condición que más estrechamente se parece a los rasgos inmunohistoquímicos de la psoriasis humana. La involucrina parece estar sobreexpresada, mientras que la expresión de loricrina se redujo en las áreas en las que la generación de una capa granular bien diferenciada estaba impedida. La expresión de queratina K1 también resultó perturbada con una inhibición focal de su expresión, mientras que una clara sobreexpresión de K6 y K17 fue coincidente con la presencia de una epidermis hiperproliferativa usando esta condición. Además, la expresión de la proteína antimicrobiana S100A7 (psoriasina) también estaba inducida (Figuras 5A y B).

Se observó un infiltrado inflamatorio más prominente cuando se administró simultáneamente IL-17 recombinante con injertos de piel inyectados con T1 más IL-22 en presencia de *tape-stripping* (Figura 3A y B). Los análisis inmunohistoquímicos para evaluar la composición celular del infiltrado revelaron un influjo incrementado de granulocitos y macrófagos en el punto de inyección (Figura 6). El análisis usando anticuerpos específicos anti-CD3, mostró la localización de las células T1 inyectadas en los injertos de piel humanizada (Figura 6). La inmunofluorescencia con CD31 mostró la presencia de capilares dilatados en la dermis de los injertos de piel humanizada inyectados simultáneamente con IL-22 e IL-17 más Th1 en presencia de *tape-stripping*, y esto correlaciona con una expresión aumentada de ICAM-1 en los vasos (Figura 7).

Materiales y Métodos empleados

Pacientes

Todos los pacientes incluidos en este estudio mostraban la variante psoriasis vulgar de la enfermedad, con un inicio temprano y altas puntuaciones PASI (índice de severidad y área afectada). Algunos de ellos también mostraban algún caso de psoriasis en su historial familiar. En el momento en que se tomaron biopsias de la piel, la medicación se había interrumpido durante varios meses. Se tomaron muestras con anestesia local tanto de la piel asintomática como de placas psoriáticas usando una aguja de biopsia de 6 mm. Los pacientes psoriáticos se reclutaron en el Hospital Básico de la Defensa (Valencia, España) y firmaron un consentimiento informado. YCP: Años con psoriasis diagnosticada; PFH: Historial familiar de psoriasis; PASI: índice de severidad y área afectada; BSA: Superficie corporal afectada.

TABLA 1

Pacientes psoriáticos participantes en el estudio

Número de paciente	Edad (años)	Peso (Kg)	YCP	PFH	PASI	BSA
1	51	72	6	No	10	5,84
2	46	83	20	Si	12	8,35
3	56	84	28	Si	12	22,86
4	29	70	20	No	10,4	11,43
5	60	85	20	No	18	17,68
6	78	90	3	No	20,4	23,2

Aislamiento de linfocitos y expansión de células T

Se usó sangre periférica tanto de pacientes psoriáticos como donantes VIH-seronegativos (proporcionados por el Centro de Transfusiones, Madrid, España) para aislar las células mononucleares de sangre periférica (PBMC o Peripheral Blood Mononuclear Cells) mediante gradiente de densidades Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Piscataway, NJ). Las células se cultivaron en RPMI 1640, suplementado con suero fetal bovino térmicamente inactivado al 10% (FCS) y fueron estimulados con Dynabeads CD3/CD28 T Cell Expander® (relación 1:1) y 30 U/ml de interleuquina-2 humana (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) durante 4-6 días. Para la diferenciación a T1 se añadieron también al cultivo IL-12 (20 ng/ml) (R&D Systems Inc.) junto con anticuerpo anti-IL-4 (5 µg/ml) (BD Pharmingen, San Diego, CA). Las células Th1 se obtuvieron mediante selección negativa de estos cultivos utilizando el kit de aislamiento de linfocitos T CD4+ de Miltenyi Biotec (Auburn, CA).

Análisis por citometría de flujo

Se realizó un análisis de fenotipo de las subpoblaciones de linfocitos, antes y después de la expansión de células T, mediante citometría de flujo (FCM) usando un citofluorímetro EPICS (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Las células se cultivaron, lavaron y suspendieron en solución salina tamponada con fosfato y con albúmina de suero bovino al 1% (Sigma-Aldrich). Se incubaron alícuotas (2×10^5 células) en oscuridad a 4°C (30 minutos) con anticuerpos monoclonales conjugados y se lavaron (anticuerpos monoclonales humanos anti CD3, CD4, CD8, CD25, CD69, HLA-DR (Becton, Dickinson and Company, San José, CA)). Se determinó la fluorescencia inespecífica usando anticuerpos monoclonales anti-isotipo. Para la tinción intracelular se añadió monensina (GolgiStop de Pharmingen) al final de las 4 h de activación de las células T. A continuación, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y se permeabilizaron con saponina al 0,1%. La tinción se llevó a cabo con los anticuerpos anti-IFNγ, anti-IL-2, anti-IL-4 y anti-IL-10 (conjugados con PE (ficoeritrina) o FITC (isotiocianato de fluoresceína), Pharmingen) en saponina al 0,1%. Las células se lavaron y sometieron a análisis mediante citometría de flujo por fluorescencia (FACS o Fluorescence Activated Cell Sorter).

Cultivos primarios de queratinocitos y fibroblastos humanos

Los queratinocitos y fibroblastos dérmicos humanos se obtuvieron de biopsias de la piel realizadas en donantes por digestión enzimática (Rheinwald and Green 1975. *Cell*; 3:331-343). Los cultivos se realizaron tras aprobación ética y habiendo obtenido previamente el consentimiento informado de los donantes. El estudio se llevó a cabo según la Declaración de Principios de Helsinki. Los queratinocitos primarios se cultivaron sobre una capa alimenticia de células 3T3-J2 irradiadas letalmente (rayos X; 50 Gy) (obsequio del Dr. J. Garlick, SUNY, Stony Brook, NY) tal

como se ha descrito anteriormente (Meana *et al.* 1998. *Burns*; 24: 621-630; Del Rio *et al.*, 2002. *Hum Gene Ther*; 13: 959-968). El medio de siembra de los queratinocitos fue una mezcla 3:1 de Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) y F12 de HAM (GIBCO-BRL) conteniendo suero fetal bovino al 10% (FCS), toxina colérica 0,1 nM, triiodotirosina (T3) 2 nM, insulina 5 µg/ml, 0,4 µg/ml de hidrocortisona y 10 ng/ml de EGF (Sigma, St Louis, MO). Los fibroblastos primarios se cultivaron sobre plástico en DMEM conteniendo FCS al 10%. Las células se cultivaron a 37°C en atmósfera húmeda que contenía CO₂ al 5%. El medio de cultivo se cambió cada 2 días.

Animales

Se usaron ratones Rj: NMRI-Foxn1^{nu} (NMRI nu) inmunodeficientes (6-8 semanas de edad) (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Los ratones se alojaron durante el experimento en la Instalación de Animales de Laboratorio del CIEMAT (número de registro español 28079-21A) en condiciones libres de patógenos usando jaulas tipo IIL individualmente ventiladas con microaislantes, con un máximo de seis ratones por jaula, con 25 cambios de aire por hora y con briquetas de madera blanda térmicamente tratadas como cama. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación española y europea, y según la normativa de protección y uso de animales en investigación científica. Los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación con Animales de los autores de acuerdo con todas las directrices internas y externas de bioseguridad y bioética.

Equivalentes de piel humana diseñados por ingeniería de tejidos e injertados

El equivalente de piel humana biodiseñado se basa en el uso de fibroblastos vivos contenidos en una matriz de fibrina como componente dérmico (Meana *et al.* 1998. *Burns*; 24: 621-630). Para su generación se añadieron 1,5 ml de disolución de fibrinógeno (procedente de sangre de cerdo crioprecipitada) a 5 ml de medio de crecimiento de queratinocitos que contenía 2,5 x 10⁵ de fibroblastos dérmicos y 250 IU de aprotinina bovina (Trasylol; Bayer, West Haven, Connecticut). Inmediatamente después, se añadieron 0,5 ml de Cl₂Ca 0,025 mM, con 5,5 IU de trombina bovina (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO). La mezcla se colocó en una placa de cultivo de 6 pocillos (Corning Costar Corp., Cambridge, MA) y se dejó solidificar a 37°C durante 2 horas. Los queratinocitos se sembraron sobre esta matriz y se crecieron en cultivo sumergido hasta llegar a confluencia. Los ratones fueron limpiados asépticamente y se trasplantaron siguiendo el método previamente descrito en nuestro laboratorio (Del Rio *et al.* 2002. *Hum Gene Ther*; 13: 959-968; Llamas *et al.* 2004. *Transplantation*; 77: 350-355 Serrano *et al.* 2003. *Hum Gene Ther*; 14: 1579-1585).

Inyección intradérmica de las subpoblaciones de linfocitos T y citoquinas recombinantes

De nueve a doce semanas tras el trasplante, las subpoblaciones de linfocitos T derivadas *in vitro*, (10⁶/50 µl) o las citoquinas recombinantes (200 ng/50 µl) diluidas en PBS estéril, se inocularon mediante inyección intradérmica en la piel con injerto humano estable cada dos días durante 8 días. En algunos casos, antes de la inyección se aplicó 15 veces la técnica de *tape-stripping* sobre la misma área del trasplante. Los ratones se sacrificaron por asfixia con dióxido de carbono dos días después de la última inyección intradérmica y se tomaron biopsias de la piel, las cuales se procesaron para análisis histológico e inmunohistoquímico.

Análisis histológico e inmunohistoquímico

Secciones de parafina fijadas con formalina (4-6 µm) se desparafinaron por fusión durante 30-60 min. a 60°C, se limpiaron en xileno tres veces durante 5 min. y se rehidrataron en disoluciones acuosas que contenían porcentajes decrecientes de etanol. Para determinar la arquitectura del tejido, las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina (Gill 2 Haematoxylin and Eosin Y alcoholic; Thermo Sandon, Cheshire, UK) siguiendo el procedimiento estándar.

Para la tinción con inmunoperoxidasa, las secciones se trataron para la inactivación de la peroxidasa endógena, se bloquearon e incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios específicos contra marcadores de epidermis y granulocitos humanos. Los anticuerpos se usaron a diluciones finales de 1:500 y 1:300 para los anticuerpos anti-queratinas 1 y 17, respectivamente (Sigma Aldrich), 1:1000 para el anticuerpo monoclonal anti-queratina 6 (clon LHK6B, Neomarkers, Fremont, CA), 1:2000 para el anticuerpo policlonal anti-loricrina (Babeo, Richmond, CA) y 1:50 para el anticuerpo anti-mieloperoxidasa (MPO) (HyCult biotechnology b.v., Uden, Holanda). Para establecer el origen humano de la piel regenerada, se usó un anticuerpo específico frente a involucrina humana (clon SY5; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) para marcar los queratinocitos humanos. Se evaluó la proliferación celular mediante detección con inmunoperoxidasa del antígeno Ki-67 usando un anticuerpo monoclonal de conejo (Clon SP6, Neomarkers). Los anticuerpos secundarios biotinilados específicos para cada caso se obtuvieron de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Todas las tinciones con inmunoperoxidasa se realizaron con procedimientos estándar usando el kit Vectastain ABC (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina y se deshidrataron en una disolución acuosa que contenía porcentajes crecientes de etanol. Finalmente, los portos se incubaron 15 minutos en histoclear (National Diagnostic, Atlanta, GA) y se montaron. Se tomaron imágenes con un microscopio Olympus Bx41 con cámara digital.

ES 2 352 929 A1

Los análisis por inmunofluorescencia se realizaron en secciones de criostato de 8-10 μm que se obtuvieron de regiones de tejidos adyacentes a las mencionadas en el párrafo anterior y que se embebieron en medio OCT (optimal cutting temperature) (TissueTek). Para analizar la densidad vascular, se utilizaron secciones fijadas en acetona fría. Los portas se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-CD31 (PECAM-1) (clon MEC 13.3, Pharmingen) diluido 1:100. Se realizó doble inmunofluorescencia con un anticuerpo policlonal anti-ICAM-1 diluido 1:50 (Santa Cruz Biotech, Santa Clara, CA). Secciones consecutivas se tiñeron con el anticuerpo policlonal anti-CD3 ϵ (Dako, Glostrup, Denmark). Los anticuerpos secundarios acoplados a FITC o Texas Red se compraron a Jackson ImmunoResearch Laboratories.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para inducir un fenotipo psoriático en un mamífero no humano que comprende:

- a) Realizar un injerto de un equivalente de piel humana, en el mamífero no humano,
- b) Administrar intradérmicamente en el equivalente injertado del paso a) de forma simultánea o secuencial:
 - Linfocitos T humanos de la subpoblación Th1, y
 - al menos dos citoquinas producidas por linfocitos Th17, y
- c) Aplicar y retirar al menos 1 vez una cinta adhesiva sobre el injerto del paso (a) para producir una disrupción de la función barrera epitelial.

2. Método según la reivindicación 1 donde en el paso (b) se administran de forma simultánea los linfocitos T humanos de la subpoblación Th1 y al menos dos citoquinas producidas por linfocitos Th17.

3. Método según de la reivindicación 1 ó 2 donde el mamífero no humano es inmunodeficiente.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el equivalente de piel para realizar el injerto del paso (a), es una matriz de fibrina con fibroblastos y queratinocitos humanos.

5. Método según la reivindicación 4 donde los fibroblastos y queratinocitos del equivalente de piel humana provienen de un enfermo de psoriasis.

6. Método según la reivindicación 4 donde los fibroblastos y queratinocitos del equivalente de piel humana provienen de un individuo sano.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la citoquinas del paso (b) son interleuquina 17 e interleuquina-22.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde el mamífero no humano es un roedor.

9. Método según la reivindicación 8 donde el roedor es un ratón.

10. Método según la reivindicación 9 donde el ratón es un ratón inmunodeficiente NMRI-Foxn1^{nu} o NOD-SCID.

11. Modelo animal no humano que muestra un fenotipo psoriático obtenible por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. Uso del modelo según la reivindicación 11 para la identificación de un compuesto o composición para la prevención o el tratamiento de la psoriasis.

13. Uso del modelo según la reivindicación 11 para evaluar la eficacia de un tratamiento preventivo o terapéutico contra la psoriasis.

FIG. 1A

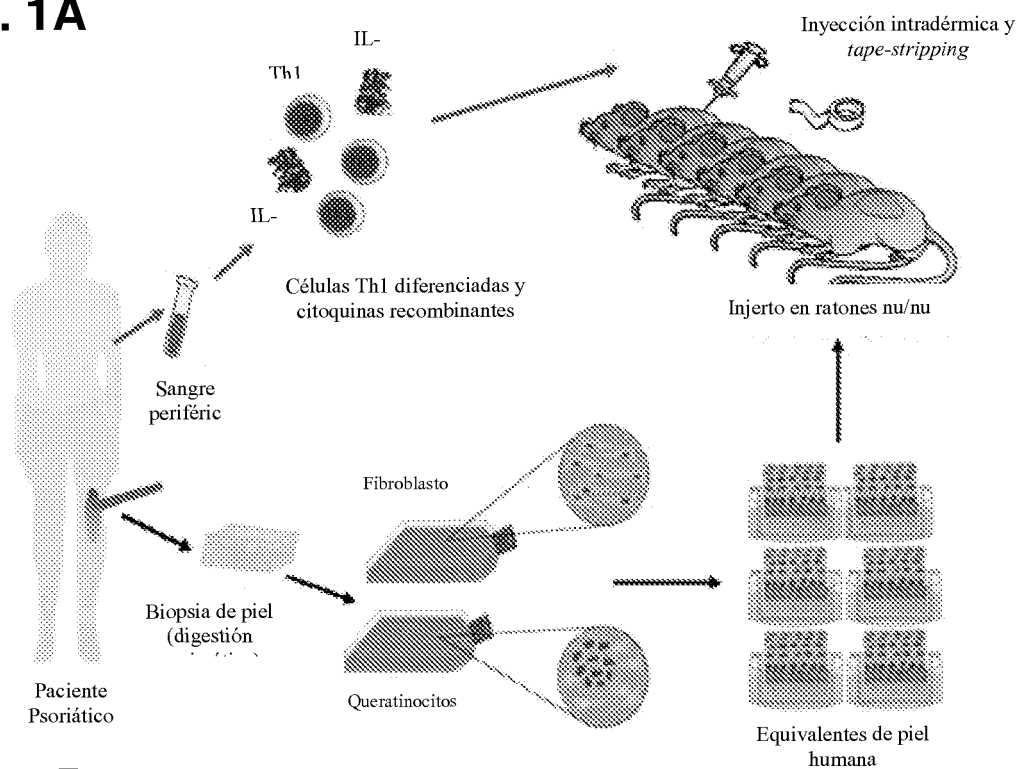


FIG. 1B

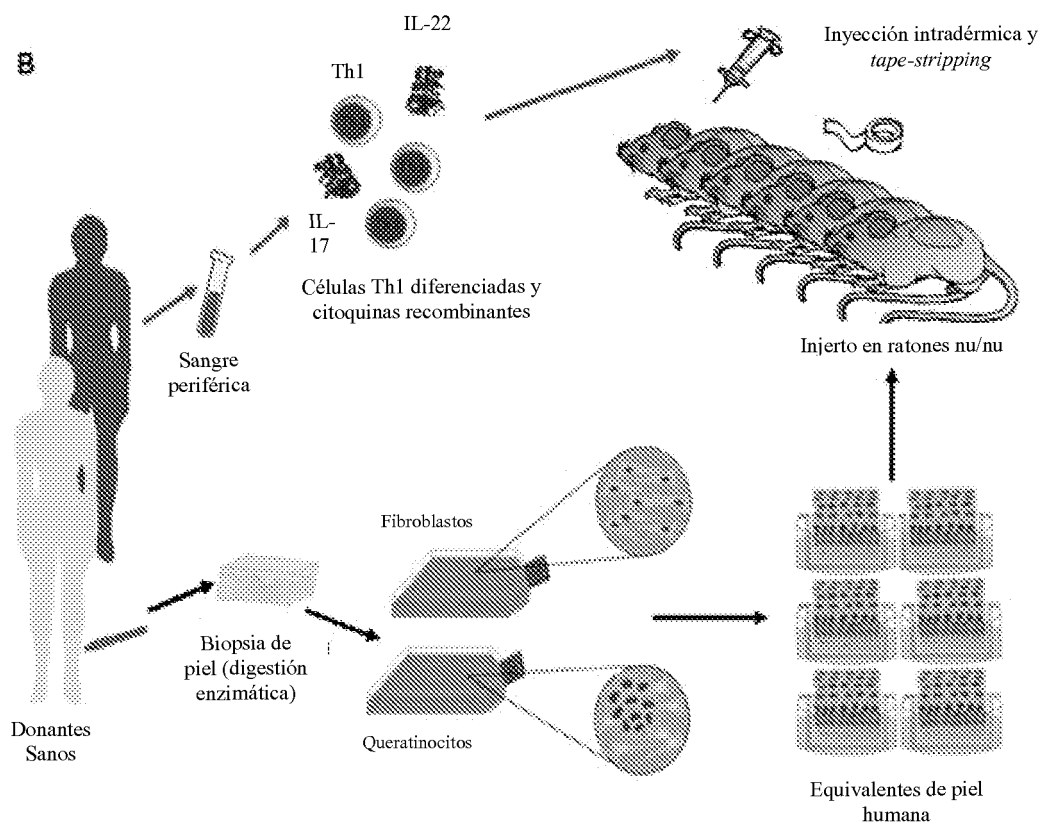


FIG.2A

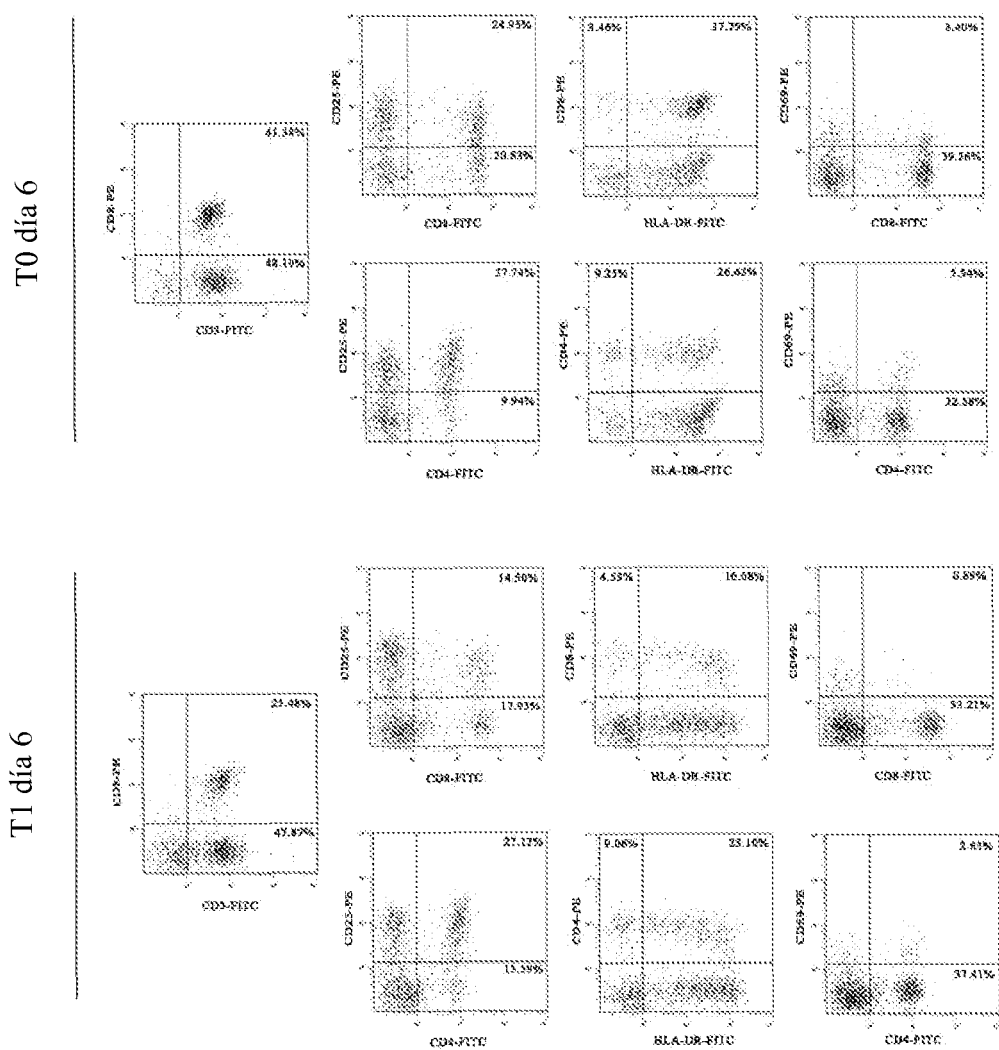


FIG. 2B

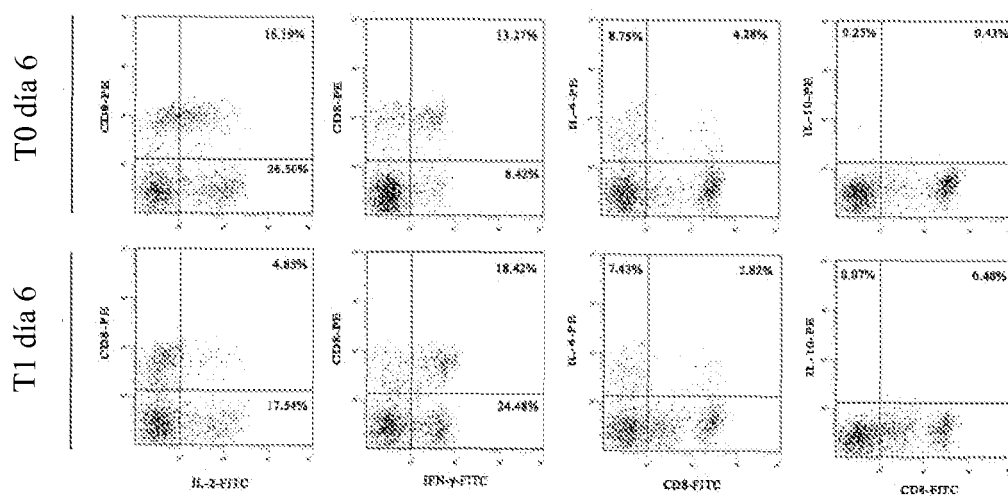


FIG. 3A

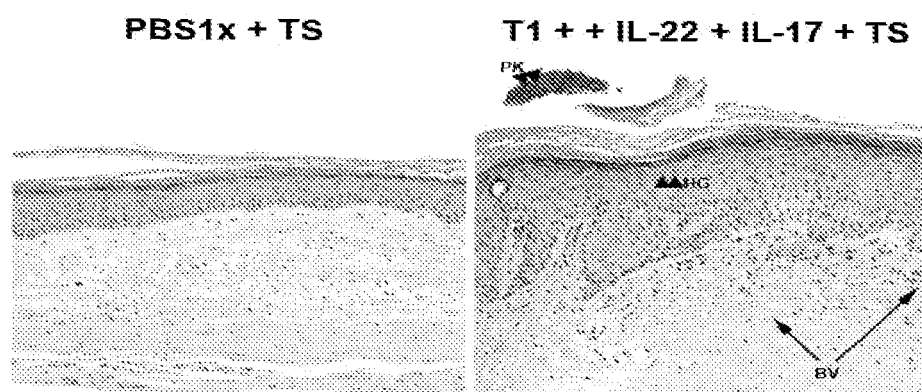


FIG. 3B

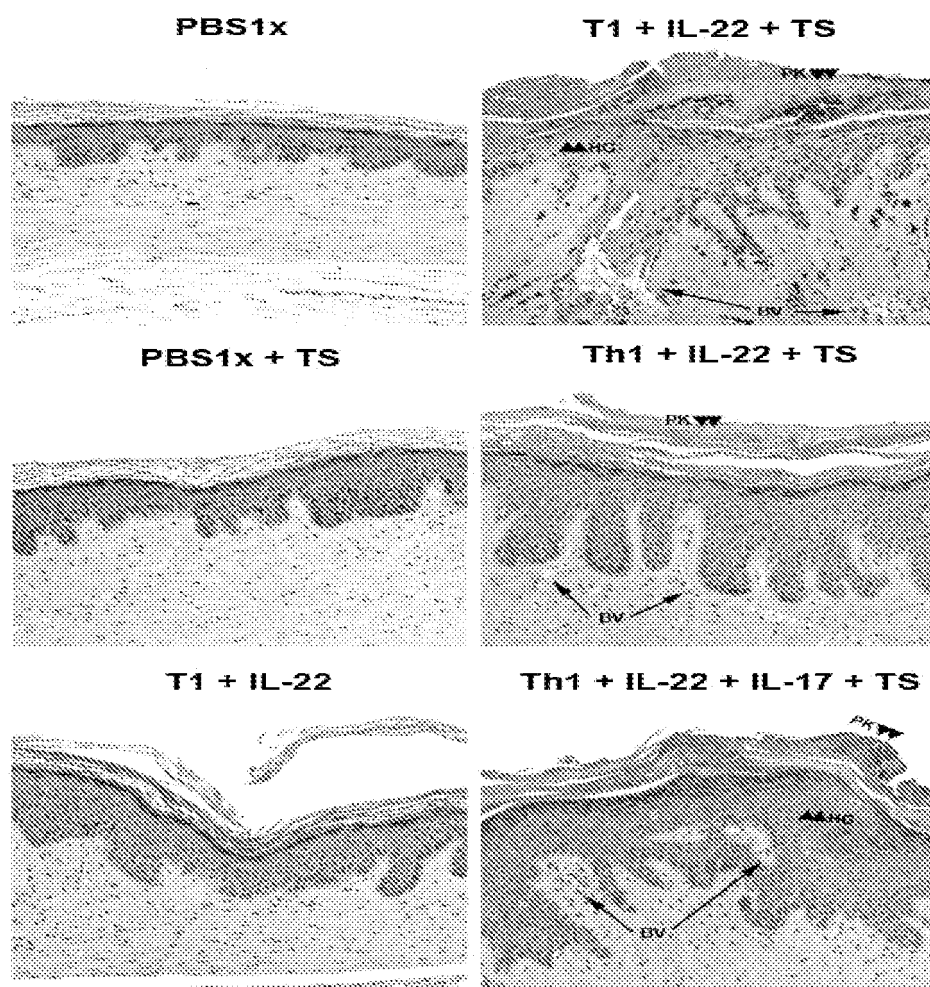


FIG. 4

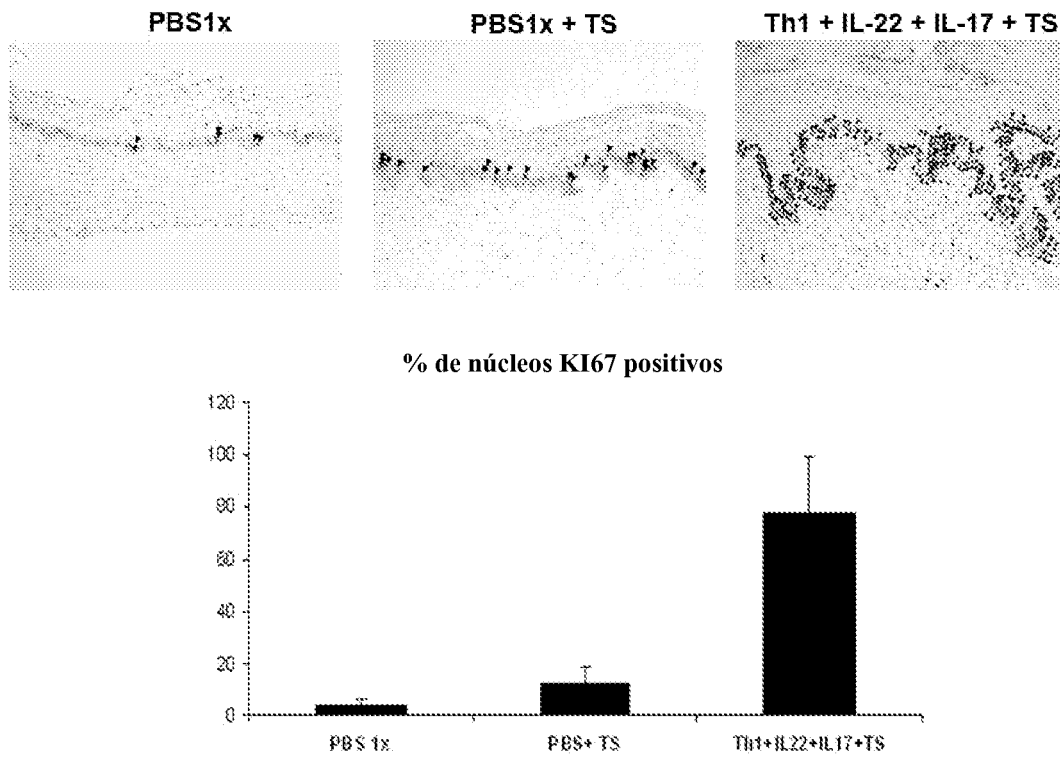


FIG. 5A

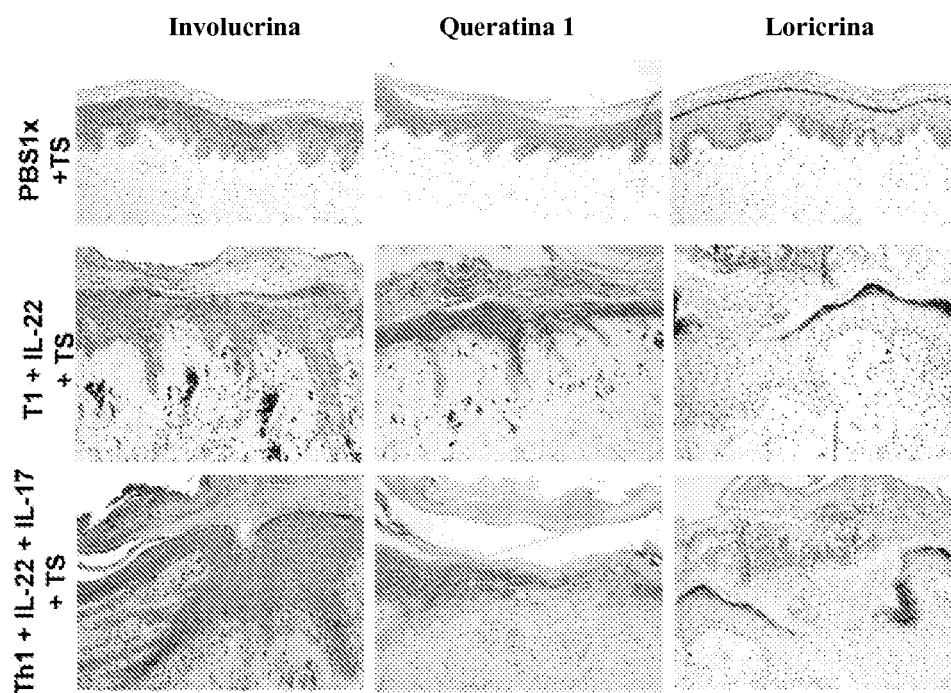


FIG. 5B

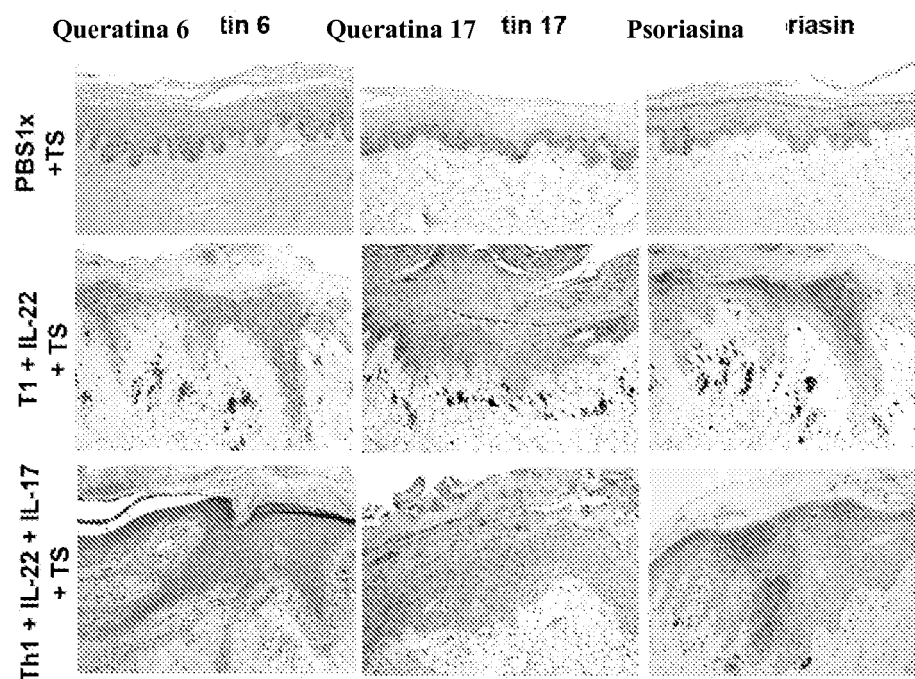


FIG. 6

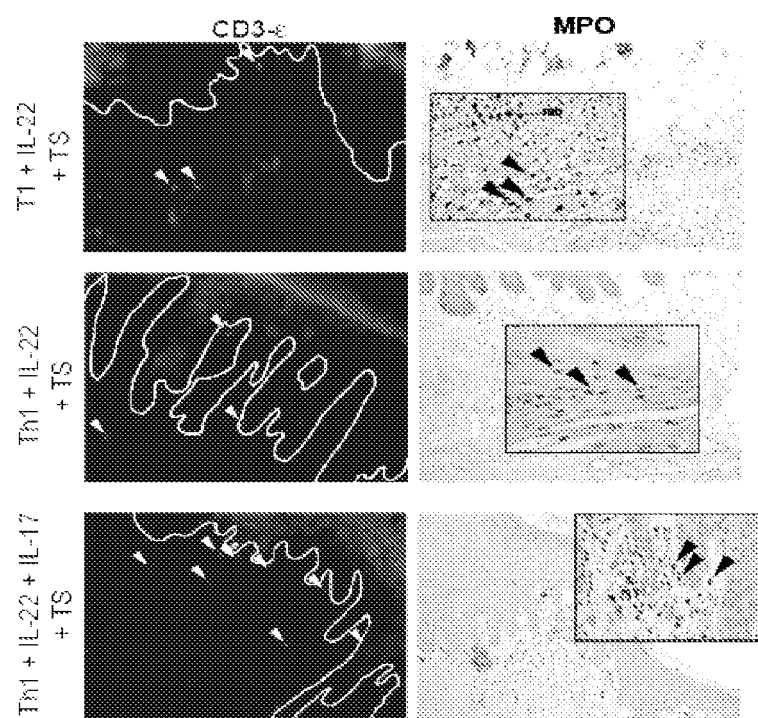
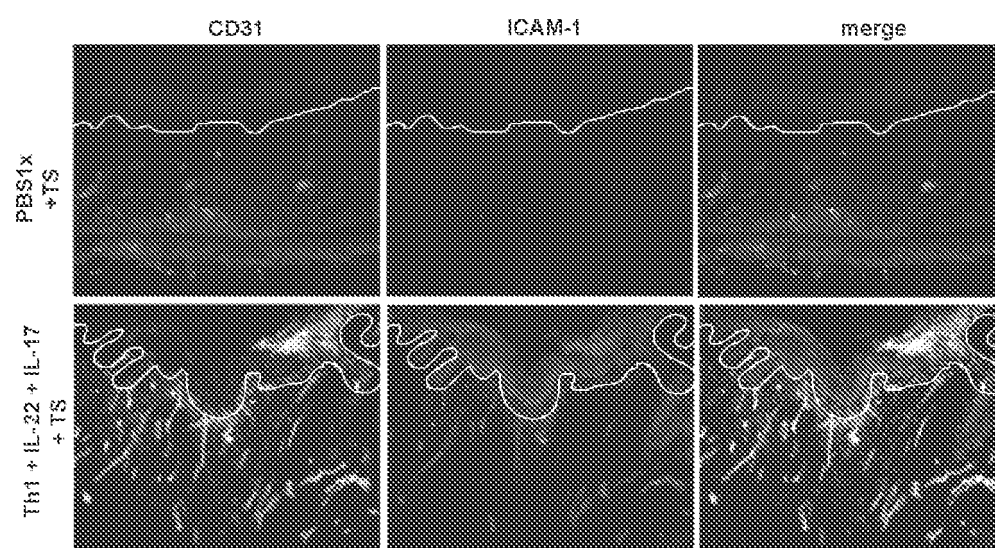


FIG. 7





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930599

②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.08.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A01K67/02**(2006.01)
G01N33/00(2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2009099590 A2 (UNIV BROWN) 13-08-2009 todo el documento.	1-13
A	EP 1557085 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INT GMBH) 27-07-2005 todo el documento.	1-13
A	9844095 A1 (VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INST BIOTECHNOG) 08-10-1998 todo el documento.	1-13
A	9627019 A1 (IMPERIAL CANCER RES TECHNOLOGY) 06-09-1996 todo el documento.	1-13
A	0034459 A1 (PROTEIN DESIGN LABS INC) 15-06-2000 todo el documento. Citado en la solicitud	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 01.12.2010	Examinador M. Hernandez Cuellar	Página 1/4
--	------------------------------------	---------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01K, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC,WPI,CAPLUS,MEDLINE,EMBASE,BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.12.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2009099590 A2 (UNIV BROWN)	13.08.2009
D02	EP 1557085 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INT GMBH)	27.07.2005
D03	9844095 A1 (VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INST BIOTECHNOG)	08.10.1998
D04	9627019 A1 (IMPERIAL CANCER RES TECHNOLOGY)	06.09.1996
D05	0034459 A1 (PROTEIN DESIGN LABS INC)	15.06.2000

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención de la presente solicitud se refiere a un método para obtener un modelo animal humanizado que presenta todas las características del fenotipo psoriático. Este modelo se obtiene mediante el injerto de equivalentes de piel humanizada en el animal, la inyección intradérmica de linfocitos T de la subpoblación Th1 y al menos dos citoquinas, IL-17 e IL-22, producidas por los linfocitos Th17, y finalmente la realización de la técnica tape-stripping para producir lesiones en dichos equivalentes injertados. Asimismo la invención reivindica el uso de este modelo para la identificación de compuestos o composiciones para la prevención o tratamiento de la psoriasis y para evaluar la eficacia de un tratamiento preventivo o terapéutico contra la psoriasis.

1.- NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

Los documentos D01-D05 describen modelos animales, en concreto ratones, que presentan determinadas características del fenotipo psoriático. Los documentos D01-D04 se refieren a diferentes animales transgénicos. El documento D05 describe un modelo de ratón inmunodeficiente al que se administran Linfocitos T e IL-12.

Los métodos de obtención de los diferentes modelos descritos en los documentos D01-D05 son completamente distintos a método propuesto en la invención de la presente solicitud . Además ninguno de estos modelos reproduce la totalidad de los elementos presentes en la psoriasis. En consecuencia, en opinión de este Oficina, las reivindicaciones 1-13 son nuevas y cumplen el requisito de actividad inventiva