

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 906 329**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**C12Q 1/6883** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2017 PCT/EP2017/073675**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2018 WO18050927**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2017 E 17768146 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.12.2021 EP 3516070**

54 Título: **Método de evaluación del potencial de irritación ocular de productos químicos**

30 Prioridad:

**19.09.2016 FR 1658746**

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

**18.04.2022**

73 Titular/es:

**IMMUNOSEARCH (100.0%)  
Les Cyclades Bat E Chemin de Camperousse  
06130 Le Plan de Grasse, FR**

72 Inventor/es:

**GROUX, HERVÉ;  
COTTREZ, FRANÇOISE;  
ALEPEE, NATHALIE y  
LEBLANC, VIRGINIE**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 906 329 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**

Método de evaluación del potencial de irritación ocular de productos químicos

5 La presente invención se refiere a un método de evaluación y de categorización del potencial de irritación ocular de productos químicos.

10 Para evaluar la inocuidad de productos químicos en el ojo, se conoce la prueba de Draize que es una prueba toxicológica invasiva basada en un protocolo de experimentación animal, desarrollada en 1944 por John H. Draize y Jacob M. Spines, toxicólogos de la Food and Drug Administration (FDA). La prueba consiste en probar un producto en el ojo de un animal con el fin de evaluar su inocuidad ocular.

15 En la práctica, consiste en aplicar 0,1 mililitros o 0,1 gramos de una sustancia en el ojo de un animal consciente, con frecuencia un conejo, durante de una a veinticuatro horas. Se observa después, durante un tiempo que puede ir hasta los 21 días, la eventual aparición de una opacidad de la córnea, de una conjuntivitis, de un edema, o incluso de secreciones.

20 La utilización de animales en laboratorio en el marco de la prueba de Draize es un tema combatido por los defensores de los animales. Dentro de la Unión Europea, la experimentación animal está regulada por la directiva 2010/63, que fomenta el desarrollo de métodos de ensayo alternativos.

25 Los productos químicos se clasifican según un sistema globalizado y desarrollado por las Naciones Unidas conocido bajo la expresión "United Nations Globally Harmonized System" y se refiere a las propiedades de irritación ocular, los productos se clasifican en varias categorías. La categoría 1 se refiere a los productos que causan daños, cuya reversibilidad no se constata después de 21 días, la categoría A2 se refiere a los productos irritantes para los ojos de manera reversible antes de 21 días, y la categoría 2B se refiere a los productos medianamente irritantes para los ojos de manera reversible antes de 21 días. Los productos no irritantes no están clasificados. La legislación europea combina las categorías 2A y 2B en una sola categoría 2 calificada como irritante de manera reversible para los ojos.

30 Se conoce también un procedimiento para estimar la molestia ocular o el potencial irritante de un producto químico tal como un producto cosmético. Este procedimiento comprende el cultivo *in vitro* de un modelo de epidermis, el depósito del producto que se desea estudiar sobre el modelo de epidermis cultivado, y la cuantificación del número de células vivas supervivientes con el fin de evaluar la molestia ocular o el potencial irritante del mismo. Dicho procedimiento, desarrollado en sustitución de la experimentación animal, adolece del inconveniente de ser largo y costoso y poco discriminante. Además, este método no constituye un método de sustitución integral, ya que no permite detectar de manera fiable toda la gama de irritaciones intermedias.

35 Así, parece que existe la necesidad de una prueba o método que permita, por un lado, sustituir la prueba de Draize, y proporcionar en particular un método que permita diferenciar y categorizar rápidamente los compuestos que causan una irritación ocular irreversible en 21 días de aquellos cuyos efectos son reversibles antes de 21 días.

40 Los inventores de la presente solicitud se han centrado, por lo tanto, en el desarrollo de una prueba *in vitro* para la detección del potencial irritante de productos químicos que combina un modelo celular corneal con una selección de marcadores moleculares predictivos y cualitativos que permiten clasificar los compuestos en 3 categorías, a saber, daños no reversibles para los ojos 21 días después de la aplicación (categoría 1), daños reversibles para los ojos 21 días después de la aplicación (categoría 2) y sin irritación (sin categoría).

45 De manera sorprendente, los inventores han puesto en evidencia que la respuesta consecutiva a la acción de una sustancia irritante se produce directamente sobre un epitelio corneal reconstruido *in vitro*, y que el grado de irritación, y la calificación de esta irritación de una molécula, se puede determinar gracias a la utilización de biomarcadores específicos de la irritación ocular. Se debe observar, y esto constituye una característica sorprendente del presente método, que los marcadores moleculares utilizados no se han descrito o divulgado nunca en relación con la irritación ocular.

50 Los inventores han puesto en evidencia que un epitelio corneal reconstruido *in vitro* constituye un modelo suficiente para poner en evidencia unos biomarcadores específicos de la irritación ocular en el ser humano, y que estos biomarcadores permiten además predecir el grado de irritación y, por lo tanto, clasificar de manera predictiva los productos probados según las 3 categorías tales como las indicadas anteriormente.

55 Así, la presente invención se refiere a un método de evaluación del potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, que comprende las etapas siguientes:

- 60
- a) poner en contacto un compuesto de ensayo con una muestra corneal reconstruida *in vitro*;
  - b) medir la expresión de por lo menos un gen seleccionado de entre el grupo constituido por: HSP90AA1,
- 65

COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61, caracterizado por que:

5 - la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma sólida, en la que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos un gen seleccionado de entre el grupo constituido por: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2, CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 y MUC4,

10 o

- la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma líquida, en la que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos un gen seleccionado de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 y CCND1,

15 - y por que comprende además una etapa c) de determinación de un índice de irritación ocular de un compuesto de ensayo.

20 Preferentemente, el método comprende también una etapa d) de categorización de dicho compuesto como presentando un potencial de irritación ocular según el valor del índice de irritación ocular obtenido.

Preferentemente, el método según la presente invención es un método *in vitro*.

25 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "muestra corneal reconstruida *in vitro*" se refiere a una muestra de células epiteliales de córnea cultivadas en un medio de cultivo definido o cualquier modelo que utilice unas células epiteliales escamosas humanas y que presente una morfología similar a la córnea humana, tales como los modelos de córnea *in vitro* del tipo de los comercializados bajo la marca EpiOcular®

30 Más particularmente aún, esta "muestra corneal reconstruida *in vitro*" es una muestra que comprende, o que está constituida por, células epiteliales de córnea inmortalizadas, cultivadas en un medio de cultivo definido y dispuestas en cada fina sobre una membrana sintética en la interfaz agua-aire.

Preferentemente, dichas células epiteliales de córnea inmortalizadas son unas células humanas.

35 En un modo de realización particular, esta "muestra corneal reconstruida *in vitro*" es una muestra HCE SkinEthic® comercializada por la compañía Episkin (Lyon, Francia) que es un epitelio de córnea reconstruido constituido por queratinocitos de córnea humana, particularmente por células transformadas para hacerse inmortales.

40 En el sentido de la presente invención, la medición de la expresión de dicho por lo menos un gen de la etapa b) permite determinar el nivel de expresión de dicho gen.

El compuesto de ensayo puede ser un compuesto de naturaleza, estructura y origen variados, especialmente un compuesto biológico, un compuesto químico, sintético, etc.

45 El compuesto de ensayo puede ser cualquier producto que se presente en forma aislada o en mezcla con otros productos. El compuesto de ensayo se puede definir en términos de estructura y/o de composición, o definir en el plano funcional. El compuesto de ensayo puede ser, por ejemplo, un producto aislado y estructuralmente definido, un producto aislado de estructura indefinida, una mezcla de productos conocidos y caracterizados o una composición que comprende uno o varios productos. Así, se pueden probar uno o varios compuestos, en mezcla o de manera separada.

50 La presente invención es particularmente adecuada para la identificación de un importante número de compuestos. Este cribado simple y eficaz se puede llevar a cabo en un periodo de tiempo muy corto. Los métodos descritos pueden ser en particular parcialmente automatizados, permitiendo así el cribado eficaz y simultáneo de compuestos diversos y numerosos, o bien en forma de mezcla, o bien en forma separada.

55 Preferentemente, en el método según la presente invención, el nivel de expresión de dicho gen se evalúa mediante la medición del nivel de expresión del polipéptido codificado por dicho gen o un fragmento del mismo, o mediante la medición del nivel de expresión del ARNm de dicho gen o de un fragmento del mismo.

60 En un modo de realización preferido, la expresión de dicho por lo menos un gen se efectúa mediante el análisis de la expresión de transcritos de ARNm o de precursores de ARNm, tal como un ARN nativo, de dicho gen. Dicho análisis se puede realizar preparando el ARNm/ADNc de células de una muestra biológica de un paciente, y la hibridación del ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia. El ARNm/ADNc preparado se puede utilizar en un análisis por hibridación o amplificación que incluye, sin limitarse a los mismos, los análisis Southern y Northern,

65

los análisis por PCR ("polymerase chain reaction"), tal como la PCR cuantitativa (Taqman) y el uso de sondas ("probes arrays") tales como las matrices ADN GeneChip® (AFFYMETRIX).

5 Ventajosamente, el análisis de la expresión del nivel de ARNm transcrito de dicho por lo menos un gen implica un procedimiento de amplificación de los ácidos nucleicos, como por ejemplo la RT-PCR (modo de realización experimental descrito en la patente US 4,683,202), la reacción en cadena por la ligasa (BARANY, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, p: 189-193, 1991), la replicación de secuencias autosostenida ("self sustained sequence replication") (GUATELLI *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 87, p: 1874-1878, 1990), el sistema de amplificación transcripcional (KWOH *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 86, p: 1173-1177, 1989), la "Q-Beta Replicase (LIZARDI *et al.*, Biol. Technology, vol. 6, p: 1197, 1988), la "rolling circle replication" (patente US nº 5,854,033), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido de una etapa de detección de las moléculas amplificadas mediante unas técnicas bien conocidas por el experto en la materia. Estos modos de detección son particularmente útiles para la detección de moléculas de ácidos nucleicos en cantidades muy pequeñas.

15 Así, según un modo de realización preferido, el método según la presente invención comprende una etapa suplementaria de amplificación del ARNm o del ADNc de dicho gen, de la secuencia complementaria de esta o de un fragmento de la misma.

20 Tal como se utilizan en este documento, los cebadores de amplificaciones se definen como un par de moléculas de ácidos nucleicos que pueden emparejarse respectivamente a las regiones 3' y 5' de un gen de manera específica (hebras positiva o negativa, o a la inversa) y encuadran una región corta de dicho gen. De manera general, los cebadores de amplificación tienen una longitud de 10 a 30 nucleótidos, y permiten la amplificación de una región de una longitud comprendida entre 50 y 200 nucleótidos.

25 En otro modo de realización preferido, la medición de la expresión de dicho por lo menos un gen se realiza mediante la medición del nivel de expresión del polipéptido codificado por dicho gen. Dicho análisis se puede realizar utilizando un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo radiomarcado, marcado con un cromóforo, un fluoróforo, o una enzima), un derivado de anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo conjugado con un sustrato o con una proteína o un ligando de una proteína de un par ligando/proteína (por ejemplo biotina-estreptavidina)) o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de una sola cadena, una región hipervariable de un anticuerpo aislado, etc.) que se une específicamente al polipéptido codificado por dicho gen. Dichos análisis se pueden realizar mediante numerosas técnicas al alcance del experto en la materia, que incluyen, sin limitarse a las mismas, los ensayos inmunológicos basados en la utilización de la actividad enzimática ("enzyme immunoassay" EIA), los ensayos inmunológicos basados en la utilización de isótopos radiactivos (RIA), el análisis por transferencia Western y los ensayos ELISA ("enzyme linked immunoabsorbante assay").

35 En el sentido de la presente invención, se entiende por "polipéptido" una secuencia que comprende por lo menos dos aminoácidos, y los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se pueden utilizar indistintamente.

40 Por "fragmento del ARNm o del ADNc", se entiende una secuencia de por lo menos 50 ácidos nucleicos, a título de ejemplo de por lo menos 100 o 150 ácidos nucleicos, preferentemente de por lo menos 200 ácidos nucleicos, a título de ejemplo de por lo menos 250 o 350 ácidos nucleicos, y de manera particularmente preferida un polipéptido de por lo menos 400 ácidos nucleicos.

45 Por "fragmento del polipéptido" se entiende una secuencia de por lo menos 50 aminoácidos, a título de ejemplo de por lo menos 100 o 150 aminoácidos, preferentemente de por lo menos 200 aminoácidos, a título de ejemplo de por lo menos 250 o 350 aminoácidos, y de manera particularmente preferida un polipéptido de por lo menos 400 aminoácidos.

50 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos dos genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.

55 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos tres genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.

60 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos cuatro genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.

- 5 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos cinco genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.
- 10 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos seis genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.
- 15 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos siete genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.
- 20 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos ocho genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.
- 25 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos nueve genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.
- 30 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos diez genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.
- 35 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos once genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.
- 40 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos doce genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.
- 45 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos trece genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.
- 50 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos trece genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61.
- 55 El método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma líquida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos un gen seleccionado de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 y CCND1.
- 60 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma líquida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos dos genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 y CCND1.
- 65

5 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma líquida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos tres genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 y CCND1.

10 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma líquida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos cuatro genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 y CCND1.

15 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma líquida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos cinco genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL1R2 y CCND1.

20 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma líquida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos seis genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL1R2 y CCND1.

25 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma líquida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos siete genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL1R2 y CCND1.

30 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma líquida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos ocho genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL1R2 y CCND1.

35 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma líquida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos nueve genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL1R2 y CCND1.

40 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma líquida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de los genes del grupo constituido por: HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL1R2 y CCND1.

45 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma líquida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos un gen seleccionado de entre el grupo constituido por: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2, CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 y MUC4.

50 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma sólida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos dos genes seleccionados de entre el grupo constituido por: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2, CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 y MUC4.

55 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma sólida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos tres genes seleccionados de entre el grupo constituido por: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2, CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 y MUC4.

60 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma líquida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos cuatro genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 y CCND1.

particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma sólida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos cuatro genes seleccionados de entre el grupo constituido por: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 y MUC4.

5 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma sólida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos cinco genes seleccionados de entre el grupo constituido por: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 y MUC4.

10 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma sólida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos seis genes seleccionados de entre el grupo constituido por: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 y MUC4.

15 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma sólida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos siete genes seleccionados de entre el grupo constituido por: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 y MUC4.

20 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma sólida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos ocho genes seleccionados de entre el grupo constituido por: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 y MUC4.

25 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma sólida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos nueve genes seleccionados de entre el grupo constituido por: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 y MUC4.

30 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma sólida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos diez genes seleccionados de entre el grupo constituido por: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 y MUC4.

35 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma sólida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos once genes seleccionados de entre el grupo constituido por: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 y MUC4.

40 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma sólida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos doce genes seleccionados de entre el grupo constituido por: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 y MUC4.

45 Preferentemente, dicho método permite evaluar el potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, en particular cuando la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma sólida, en el que la etapa b) comprende la medición de la expresión de los genes del grupo constituido por: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 y MUC4.

50 En un modo de realización particular del método, en la etapa a), el compuesto de ensayo puesto en contacto con la muestra corneal reconstruida *in vitro* está en forma líquida o sólida. Cuando el compuesto de ensayo es líquido, se puede utilizar puro o diluido.

55 El compuesto se puede diluir en un disolvente fisiológicamente aceptable, tal como un tampón PBS (Phosphate Buffer Saline) por ejemplo, y está presente, por lo tanto, a una concentración másica comprendida entre el 0,1% y el 100%. Cuando el compuesto está diluido, está presente a una concentración másica comprendida entre el 10 y

el 60%, más particularmente entre el 20 y el 50%, más particularmente entre el 25% y el 40%, y más particularmente aún el 30%.

La etapa c) del método comprende la determinación de un índice de irritación ocular del compuesto.

Más particularmente, la determinación del índice de irritación ocular del compuesto comprende la atribución de un valor umbral de sobreexpresión a cada gen cuya expresión se mide.

El valor umbral de sobreexpresión corresponde a un factor de aumento de la expresión del gen cuando tiene lugar la puesta en contacto con el compuesto a ensayar con respecto a la expresión de dicho gen cuando tiene lugar la puesta en contacto con un control.

Preferentemente, el método según la presente invención comprende además una etapa de comparación del nivel de expresión de dicho gen con un valor de referencia. Este valor de referencia puede servir de control positivo y/o negativo.

Se puede efectuar un control positivo, por ejemplo, comparando el nivel de expresión de dicho por lo menos un gen en presencia del compuesto de ensayo con el nivel de expresión de dicho por lo menos un gen en presencia de un compuesto conocido como irritante ocular.

Por ejemplo, si el nivel de expresión de dicho por lo menos un gen en presencia del compuesto de ensayo es superior o igual al nivel de expresión de dicho por lo menos un gen en presencia de un compuesto cuyo potencial irritante es conocido, se podrá concluir el potencial irritante de dicho compuesto.

Se puede realizar un control negativo en ausencia del compuesto de ensayo o en presencia de un compuesto conocido como no irritante, como, por ejemplo, el aceite de oliva, el 1,9-decadieno (CAS # 1647-16-1), el triclocarban (CAS # 101-20-2), o el tampón en el que se disuelve o diluye el producto a ensayar durante su utilización en el método.

En el marco de la presente invención, se podrá concluir que un compuesto de ensayo presenta un potencial irritante ocular si se observa una sobreexpresión de dicho gen con respecto a su nivel de expresión en ausencia de dicho compuesto de ensayo.

Se entiende por "sobreexpresión" un nivel de expresión significativamente más elevado de dicho gen con respecto a su nivel de expresión normal. Preferentemente, se entiende por sobreexpresión un nivel de expresión en una muestra biológica que es superior a por lo menos un 20% del nivel normal de expresión de dicho gen (es decir 1,2 veces más), preferentemente superior a por lo menos un 50% del nivel normal de expresión de dicho gen (es decir 1,5 veces más), y de manera particularmente preferida superior en por lo menos un 90% del nivel normal de expresión de dicho gen (es decir también 1,9 veces más).

El "nivel de expresión en ausencia de dicho compuesto de ensayo" o "nivel normal" es el nivel de expresión de dicho gen en una muestra control que corresponde potencialmente a la muestra biológica de un tejido que no presenta ninguna reacción de irritación o, preferentemente, a la media del nivel de expresión de dicho gen en diferentes muestras control no expuestas al compuesto de ensayo.

Preferentemente, la etapa b) se realiza entre 2 y 24 horas después de la etapa a), de manera aún más preferida entre 4 y 18 horas después de la etapa a), de manera particularmente preferida entre 5 y 7 horas después de la etapa a), y de manera aún más preferida 6 horas después de la etapa a).

El control que presenta un nivel de expresión normal consiste en la puesta en contacto de la muestra corneal reconstruida *in vitro* con un líquido fisiológicamente aceptable no irritante, tal como por ejemplo el líquido en el que se disuelve o se diluye el compuesto a ensayar, por ejemplo un tampón, más particularmente por ejemplo un tampón PBS.

El valor umbral que indica una sobreexpresión significativa del gen cuya expresión se mide puede estar comprendido entre 1,1 y 10, más particularmente entre 1,1 y 7, más particularmente entre 1,4 y 6, más particularmente aún entre 2 y 5, más particularmente aún entre 2 y 4.

Como se ha indicado anteriormente en uno de los grupos de genes seleccionados, en el caso de compuestos de ensayo puestos en contacto en la etapa a) en forma líquida, los genes preferidos se seleccionan de entre el grupo que comprende por lo menos, o que consiste en, HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 y CCND1.

Para HSP90AA1, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,1 y 2, más particularmente 1,4.

Para CASP1, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,1 y 2, más particularmente es de

## ES 2 906 329 T3

aproximadamente 1,5.

Para DLK1, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 3 y 8, más particularmente es de aproximadamente 5, más particularmente aún 5,25.

5

Para CLEC4D, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,1 y 4, más particularmente es de aproximadamente 3,6.

Para IL-24, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 3 y 8, más particularmente es de aproximadamente 6,2.

10

Para SLIT2, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,1 y 2, más particularmente es de aproximadamente 1,3.

Para HSPA1A, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,1 y 5, más particularmente es de aproximadamente 3.

15

Para FSHR, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,1 y 4, más particularmente es de aproximadamente 2,6.

20

Para IL-1R2, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,1 y 2, más particularmente es de aproximadamente 1,3.

Para CCND1, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,1 y 2, más particularmente es de aproximadamente 1,5.

25

Como se ha indicado anteriormente, para otro grupo de genes posibles, en el caso de compuestos de ensayo puestos en contacto en la etapa a) en forma sólida, los genes preferidos se seleccionan de entre el grupo que comprende por lo menos, o que consiste en, IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 y MUC4.

30

Para IL-24, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,5 y 15, más particularmente entre 2 y 10, más particularmente 2,3.

Para IL-24, el valor umbral de sobreexpresión puede estar también comprendido entre 5 y 15, más particularmente 10.

35

Para IL-23R, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,5 y 3, más particularmente es de aproximadamente 1,9.

40

Para DDIT3, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,5 y 3, más particularmente es de aproximadamente 5, más particularmente aún 2.

Para MMP8, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,1 y 2,5, más particularmente es de aproximadamente 1,4.

45

Para DLK1, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 2 y 8, más particularmente es de aproximadamente 4.

Para HAS1, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,5 y 5, más particularmente es de aproximadamente 3.

50

Para CYR61, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,1 y 2, más particularmente es de aproximadamente 1,3.

55

Para IL-1R2, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,4 y 3, más particularmente es de aproximadamente 2.

Para CLEC4D, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,5 y 3,5, más particularmente es de aproximadamente 2,8.

60

Para ICAM2, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 3 y 5, más particularmente es de aproximadamente 4.

Para CASP1, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,1 y 2, más particularmente es de aproximadamente 1,4.

65

Para MUC13, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 1,4 y 3, más particularmente es de aproximadamente 1,8.

5 Para MUC4, el valor umbral de sobreexpresión está comprendido entre 2 y 4, más particularmente es de aproximadamente 2,5.

El valor umbral de sobreexpresión significativo puede, para cada gen, ser evaluado y determinado fácilmente por un experto en la materia.

10 Más particularmente aún, la determinación del índice de irritación ocular comprende la atribución de un valor de peso a cada gen si se alcanza el valor umbral de sobreexpresión de dicho gen tras la medición de la expresión.

15 Así, cuando se alcanza el umbral de sobreexpresión significativo de un gen dado, a este gen se le atribuye un valor de peso que puede ser diferente o idéntico según el gen. Este valor de peso puede adoptar unos valores discretos o continuos, preferentemente unos valores discretos escalonados entre 1 y 10, es decir seleccionados de entre el grupo que consiste en los valores 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Más particularmente, los valores discretos se podrán seleccionar de entre el grupo que consiste en los valores 1, 2, 3, 4, 5. Más particularmente, dichos valores discretos podrán ser 1 o 2.

20 A título ilustrativo, y sin ser de ninguna manera limitativo, el valor de peso podrá limitarse a dos valores, 1 o 2, valor que se atribuirá al gen cuando se alcance o se supere su umbral de sobreexpresión significativo.

25 La elección de atribuir un valor de peso más o menos elevado depende de la naturaleza del gen considerado y de su implicación en la respuesta celular al estrés, en la vía metabólica de la interleucina, en el proceso inflamatorio, en la regulación del crecimiento celular, en la cicatrización, en la remodelación celular, por ejemplo, pero también del valor umbral de sobreexpresión del gen.

30 Asimismo, a título puramente ilustrativo y para los genes seleccionados en este documento seleccionados de entre el grupo que comprende, o que consiste en, HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL1R2 y CCND1; el valor de peso podrá adoptar un valor seleccionado entre 1 y 2.

Para HSP90AA1, el valor de peso podrá ser de 2.

35 Para CASP1, el valor de peso podrá ser de 2.

Para DLK1, el valor de peso podrá ser de 2.

40 Para CLEC4D, el valor de peso podrá ser de 2.

Para IL24, el valor de peso podrá ser de 1.

Para SLIT2, el valor de peso podrá ser de 1.

45 Para HSPA1A, el valor de peso podrá ser de 2.

Para FSHR, el valor de peso podrá ser de 2.

50 Para IL-1R2, el valor de peso podrá ser de 1.

Para CCND1, el valor de peso podrá ser de 2.

55 De la misma manera, y para los genes seleccionados en este documento escogidos de entre el grupo que comprende, o que consiste en, IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2, CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 y MUC4; el valor de peso podrá adoptar un valor seleccionado entre 1 y 4.

Para IL-24, con un valor umbral de sobreexpresión de 2,3, el valor de peso podrá ser de 1.

60 Para IL-24, con un valor umbral de sobreexpresión de 10, el valor de peso podrá ser de 4.

Para IL-23R, el valor de peso podrá ser de 4.

Para DDIT3, el valor de peso podrá ser de 2.

65 Para MMP8, el valor de peso podrá ser de 1.

Para DLK1, el valor de peso podrá ser de 2.

Para HAS1, el valor de peso podrá ser de 2.

5 Para CYR61, el valor de peso podrá ser de 1.

Para IL-1R2, el valor de peso podrá ser de 4.

10 Para CLEC4D, el valor de peso podrá ser de 2.

Para ICAM2, el valor de peso podrá ser de 4.

Para CASP1 el valor de peso podrá ser de 2.

15 Para MUC13, el valor de peso podrá ser de 3.

Para MUC4, el valor de peso podrá ser de 4.

20 Más particularmente, el índice de irritación ocular se determina mediante la adición de los valores de peso de los genes cuya expresión supera el valor umbral de sobreexpresión.

El método según la invención puede comprender también una etapa de categorización del compuesto de ensayo que comprende la atribución de una categoría de irritación al compuesto de ensayo en función del valor del índice de irritación ocular obtenido.

25 El método según la invención pone así a disposición del experto en la materia un método predictivo que permite clasificar un compuesto según su potencial de irritación ocular según la clasificación europea, a saber no irritante, irritante reversible o irritante no reversible.

30 Los resultados expuestos en la parte experimental de la presente solicitud demuestran que esta ventaja de la invención y la superioridad de este método con respecto a los existentes se desprenden de la evidencia de estos resultados.

## 35 Ejemplos

### Materiales y métodos

#### Modelo de epitelio de córnea humana reconstruida (SkinEthic™ HCE)

40 El modelo de epitelio de córnea humana reconstruida, (SkinEthic™ HCE) se adquirió en Episkin en Lyon. El modelo está constituido por células epiteliales de córnea humana inmortalizadas cultivadas en un medio definido en la unión aire-líquido. La estructura tisular obtenida es un epitelio multicapa similar a la estructura tisular natural de la córnea humana que comprende 5-7 capas para una superficie de 0,5 cm<sup>2</sup>. También están presentes las células poliédricas y las células aladas. El tejido comprende también unas ultraestructuras específicas como los filamentos intermedios, los hemidesmosomas maduros y los desmosomas. También se detectó la citoqueratina de 65 kD (K3) (Nguyen *et al.*, 2003). Los tejidos se envían a una capa semisólida de medio de cultivo de agarosa. En la recepción, los tejidos se transfieren a un medio de mantenimiento (1 ml/pocillo) en unas placas de 6 pocillos, y se incuban en una estufa húmeda a 37°C, al 5% de CO<sub>2</sub>. Los tejidos se utilizan 24h más tarde.

#### 50 Productos químicos

Todos los productos químicos ensayados se adquirieron en Sigma, Francia. La pureza era de más del 87% para todos los productos químicos ensayados, que cubrían un amplio campo de potenciales irritantes oculares posibles.

#### 55 Preparación de los productos químicos líquidos

Los productos líquidos se ensayaron para su solubilidad en tampón PBS (tampón fosfato salino) o en aceite de oliva. En resumen, se mezclan 100 µl de producto a ensayar con 200 µl de PBS o de aceite de oliva. La muestra se mezcla en un vórtice. La turbidez y la eventual separación de fase se evalúan visualmente. Los productos se ensayan puros o diluidos al 30%. Los productos que no son solubles en el PBS o en el aceite de oliva no se pueden ensayar al 30%.

#### Protocolo de tratamiento para los productos líquidos

65 El procedimiento de aplicación de los productos líquidos sobre los tejidos se optimizó de la siguiente manera: los productos químicos se ensayan a dos concentraciones, al 100% y al 30%. En resumen, la superficie del tejido se

humidifica mediante la adición de 20 µl de PBS a 37°C y una incubación durante 10 minutos a 37°C/al 5% de CO<sub>2</sub>. Los epitelios corneales se tratan a continuación tópicamente con 50 ± 2 µl del producto ensayado (lo cual corresponde a 100 µl/cm<sup>2</sup>), y después se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los tejidos se lavan a continuación con PBS estéril (2 x 25 ml) a 37°C. El PBS se deposita sobre el reborde del inserto (no directamente sobre el tejido) para crear un vórtice suave que retira el producto químico. Los tejidos sobre sus insertos se "sumergen" a continuación en 5 ml de medio de mantenimiento a temperatura ambiente durante 30 minutos con el fin de retirar al máximo el producto restante en la superficie del tejido. El medio se retira a continuación golpeando suavemente el inserto sobre papel absorbente y se añaden 50 µl de medio de mantenimiento a 37°C. Los insertos se incuban a continuación durante 6 h a 37°C/al 5% de CO<sub>2</sub>.

#### Protocolo de tratamiento para los productos sólidos

El procedimiento de aplicación de los productos sólidos (en polvo) sobre los tejidos se optimizó de la manera siguiente. En primer lugar, los productos se reducen a polvo lo más fino posible mediante un mortero. Los productos químicos se ensayan en una sola dosis. En resumen, la superficie del tejido se humidifica mediante la adición de 20 µl de PBS a 37°C, y una incubación durante 10 minutos a 37°C/al 5% de CO<sub>2</sub>. Los epitelios corneales se tratan a continuación tópicamente con 30 ± 2 mg (que representan 60 mg/cm<sup>2</sup>), y después se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los tejidos se lavan después con PBS estéril (2 x 25 ml) a 37°C. El PBS se deposita sobre el reborde del inserto (no directamente sobre el tejido) para crear un vórtice suave que retira el producto químico. Los tejidos sobre sus insertos se "sumergen" después en 5 ml de medio de mantenimiento a temperatura ambiente durante 30 minutos con el fin de retirar al máximo el producto restante en la superficie del tejido. El medio se retira a continuación golpeando suavemente el inserto sobre papel absorbente, y se añaden 50 µl de medio de mantenimiento a 37°C. Los insertos se incuban a continuación durante 6 h a 37°C/al 5% de CO<sub>2</sub>.

#### Purificación de los ARN totales

El procedimiento de purificación de los ARN totales ha sido descrito por Cottrez *et al.*, 2015. En resumen, los tejidos de la córnea se recuperan con unas pinzas y se colocan en unos tubos para una congelación rápida en nitrógeno líquido. Los ARN se extraen a continuación mediante la técnica de Qiazol (Qiagen, Courtaboeuf, Francia) con un kit "RNeasy Mini Kit" según las instrucciones del fabricante. En resumen, los tejidos se colocan en 1 ml de Qiazol y se homogeneizan utilizando el TissueLyser II (Qiagen, Courtaboeuf, Francia) con 2 bolas de acero. Después de la centrifugación, se recoge el sobrenadante y se añaden 0,2 ml de bromocloropropano (Sigma, Francia), y después se mezcla el conjunto vigorosamente. El homogeneizado se centrifuga a 12'000 g durante 15 minutos a 4°C. La fase superior (fase acuosa) se añade a 600 µl de etanol al 70% e inmediatamente se mezcla por pipeteo. La mezcla se transfiere a una columna RNeasy spin colocada en un tubo de recogida de 2 ml, y se recoge el ARN según las instrucciones del fabricante (Qiagen, Courtaboeuf, Francia).

#### Análisis por RT-PCR cuantitativa

El procedimiento de RT-PCR cuantitativa se ha descrito por Cottrez *et al.*, 2015. En resumen, la transcripción del ARN total se realiza con 1 µg de ARN total en un volumen final de 20 µl utilizando unos "Random Primers" (Invitrogen, Francia) y la "SuperScript III Reverse Transcriptase" (Invitrogen, Francia) según las instrucciones del fabricante. La RT-PCR cuantitativa utiliza una mezcla reactiva de PCR: el SYBR Green real time PCR Master Mix (ROCHE, Francia) con 0,4 µM de cada cebador nucleotídico en un volumen final de 25 µl. La reacción se realiza en un LC480 System (ROCHE, Francia). El programa de amplificación comprende un ciclo a 95°C durante 1 minuto, seguido de 40 ciclos con una desnaturalización a 95°C durante 15 s, una fase de hibridación y de amplificación a 60°C durante 15 s, seguida de una fase de elongación final a 72°C durante 40 s.

La cantidad relativa de cada transcrito se normaliza con respecto a la cantidad media de expresión de 5 genes "housekeeping" (Glucuronidasa β-GUSB, vacuolar ATPase-ATP6V0E1, Familia de Histonas H2A Histone Family, Member Y- H2AFY, Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase-G6PD and "non-POU domain containing, octamer-binding"-NONO).

#### **Análisis de los datos**

##### Medición de la expresión de genes

La tasa de expresión de los genes se mide mediante un método de análisis de cuantificación absoluta mediante el método que utiliza un algoritmo basado en el máximo de la derivada de segundo orden desarrollada por Roche. La tasa de sobreexpresión relativa (fold increase) se calcula a continuación con respecto a los tejidos tratados con PBS solo.

##### Definición del modelo de predicción del ensayo de irritación ocular para los líquidos

La expresión de 10 genes (es decir: HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, CCND1 (marcados con unas estrellas en la figura 1) se mide en los modelos de epitelio corneal después de la

5 aplicación o bien de una dosis del 100%, o bien de una dosis del 30% del producto a ensayar, tal como se ha indicado anteriormente. Los valores de sobreexpresión significativos se fijaron para cada uno de los genes a respectivamente: 1,4; 1,5; 5,25; 3,6; 6,2; 1,3; 3; 2,6; 1,3 y 1,5. Cada gen sobreexpresado recibe a continuación un valor fijo de respectivamente: 2; 2; 2; 2; 1; 1; 2; 2; 1 o 2. Se calcula a continuación un índice de irritación ocular para las sustancias líquidas (LII: Liquid Irritation Index) mediante la adición de los valores atribuidos a cada gen sobreexpresado para un valor máximo de 17. Cuando, después del tratamiento de los tejidos con el producto ensayado, la destrucción tisular se considera demasiado elevada (el ARN total recogido representa menos del 10% de la cantidad de ARN recogido en los tejidos tratados con PBS), se atribuye un valor de LII de 20.

10 El modelo de predicción y de clasificación funciona de la manera siguiente. Cada producto se ensaya al 100% y al 30% (véase anteriormente). Si  $LII \geq 10$  al 100% y al 30%, el producto ensayado se clasifica como "Cat I". Si  $LII \geq 10$  al 100% y  $< 10$  al 30%, el producto ensayado se clasifica como "Cat 2". Si  $LII < 10$  al 100% y al 30%, el producto ensayado se clasifica como "Sin-Cat".

#### 15 Definición del modelo de predicción del ensayo de irritación ocular para los sólidos

20 La expresión de 13 genes (es decir: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13, MUC4 (marcados con unas estrellas en la figura 2)) se mide en los modelos de epitelio corneal después de la aplicación de una dosis de 60 mg/cm<sup>2</sup> del producto a ensayar, tal como se ha indicado anteriormente. Los valores de sobreexpresión significativos se fijaron para cada uno de los genes a respectivamente: 2,3 y 10 para IL-24; y después para cada uno de los otros genes en el orden 1,9; 2; 1,4; 4; 3; 1,3; 2; 2,8; 4; 1,4; 1,8 y 2,5. Cada gen sobreexpresado (o cada umbral superado por IL-24) recibe entonces un valor fijo de respectivamente: 1; 4; 4; 2; 1; 2; 2; 1; 4; 2; 4; 2; 3 y 4. Se calcula a continuación un índice de irritación ocular para las sustancias sólidas (SII: Solid Irritation Index) mediante la adición de los valores atribuidos a cada gen sobreexpresado para un valor máximo de 36. Cuando, después del tratamiento de los tejidos con el producto ensayado, la destrucción tisular se considera demasiado elevada (el ARN total recogido representa menos del 10% de la cantidad de ARN recogido en los tejidos tratados por PBS) se atribuye un valor de SII de 40.

30 El modelo de predicción y de clasificación funciona de la manera siguiente. Cada producto se ensaya a 60 mg/cm<sup>2</sup> (véase anteriormente). Si  $SII \geq 20$  el producto ensayado se clasifica como "Cat I". Si  $10 \leq SII < 20$  el producto ensayado se clasifica como "Cat 2". Si  $SII < 10$ , el producto ensayado se clasifica como "Sin-Cat".

#### Criterios de aceptabilidad para los líquidos

35 Se ensayan dos productos químicos "control" en paralelo con los productos ensayados. Uno no irritante: el 1,9-decadieno (CAS # 1647-16-1) ensayado al 100%, y un producto de Categoría 2: el 2-metil-1-pentanol (CAS # 105-30-6) ensayado al 100% y al 30%. El ensayo se considera como válido si los valores de LII obtenidos para el 1,9-dicadieno ensayado al 100% y el 2-metil-1-pentanol ensayado al 30% son inferiores a 10, y si el LII para 2-metil-1-pentanol ensayado al 100% es  $>10$ .

40 Cada producto químico se ensaya dos veces en dos lotes diferentes de tejido de epitelio de córnea. Si estos dos análisis dan la misma clasificación, el ensayo se considera como válido, de lo contrario se efectúa un tercer o un cuarto análisis.

#### 45 Criterios de aceptabilidad para los sólidos

50 Se ensayan dos productos químicos "control" en paralelo con los productos ensayados. Uno no irritante: el triclocarban (CAS # 101-20-2) y un producto de Categoría 2: el naftaleno diona (CAS # 83-56-7). El ensayo se considera como válido si el valor de SII obtenido para el triclocarban es  $<10$ , y si el valor obtenido para el naftaleno diona está comprendido entre 10 y 20.

55 Cada producto químico se ensaya dos veces en dos lotes diferentes de tejido de epitelio de córnea. Si estos dos análisis dan la misma clasificación, el ensayo se considera como válido, de lo contrario se efectúa un tercer o un cuarto análisis.

#### Análisis estadístico

##### Estadísticas de Cooper

60 Los valores del análisis estadístico según Cooper (Sensibilidad, Especificidad y Precisión) (Cooper *et al.*, 1979) se calculan para la prueba de irritación ocular utilizando como referencia los datos de la bibliografía para la prueba de Draize (Barroso *et al.*, 2016). Se construye una tabla de contingencia 2X2 con los irritantes y los no irritantes como parámetro, utilizando los resultados obtenidos con la prueba de irritación ocular. Se calculan a continuación la Sensibilidad, la Especificidad y la Precisión utilizando las recomendaciones de Cooper (Cooper *et al.*, 1979).

65

Análisis por matriz de confusión

Para las estadísticas que utilizan las matrices de confusión y el cálculo de Kappa, se utilizaron las recomendaciones de Landis y Koch (Landis y Koch, 1977).

ResultadosSelección de los genes biomarcadores de los mecanismos de irritación ocular

Para identificar los genes implicados en los mecanismos de irritación ocular, se utilizó una herramienta de análisis de datos desarrollada en colaboración con Dieng-Kuntz *et al.* (Dieng-Kuntz *et al.*, 2006). Se seleccionó un primer grupo de 900 genes. Entre este importante grupo de genes candidatos, se seleccionaron unos genes cuya expresión se modula en unas muestras extraídas de la superficie del ojo humano mediante un dispositivo de recogida de huellas conjuntivales (Roy *et al.*, 2013). Después, se utilizó un análisis de la expresión del gen obtenido después de la utilización de un grupo de 10 productos químicos (Tabla 1 #1-10) aplicado sobre el modelo de tejido Skinethic HCE, asociado a una búsqueda por data Mining de la bibliografía existente. Este análisis ha permitido definir un grupo de 92 genes implicados en los mecanismos que dan lugar a una irritación ocular (Tabla 2).

Desarrollo del modelo de predicción del ensayo de irritación ocular para los líquidos

La modificación de la expresión de los 92 genes que se seleccionaron como representativos de potenciales candidatos biomarcadores (Tabla 2) se analizó después del tratamiento con 39 productos químicos (Tabla 1). Utilizando un subgrupo de 29 genes: HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61 (figura 1), fue posible clasificar los 39 productos químicos en una de las 3 categorías de irritación ocular establecidas por el sistema de referencia UN-GHS. Sin embargo, como algunos de los genes tenían un papel redundante y podían ser sustituidos entre sí, se pudo seleccionar un subgrupo de 10 genes que permitieron desarrollar un índice de irritación para los líquidos (LII) capaz de discriminar las 3 categorías de irritantes. La lista de los genes seleccionados para los líquidos incluye: HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 y CCND1 (indicados en la figura 1). El LII se elaboró en dos etapas. Se seleccionó en primer lugar un valor umbral para cada gen que permitiera poner en evidencia una sobreexpresión significativa. Se ensayaron diferentes valores umbral, y los valores óptimos adoptados para estos 10 genes fueron respectivamente de: 1,4; 1,5; 5,25; 3,6; 6,2; 1,3; 3; 2,6; 1,3 y 1,5. Se atribuyó a continuación un peso a estos valores en función de la importancia de la sobreexpresión del gen considerado en los mecanismos de irritación ocular. Cada gen sobreexpresado por encima del valor umbral recibió entonces un valor ponderado de respectivamente: 2; 2; 2; 2; 1; 1; 2; 1 y 2. Se calcula a continuación el LII sumando los valores de peso para cada uno de los genes sobreexpresados con un máximo de 17. Cuando el nivel de destrucción tisular se considera demasiado elevado (véase Materiales y Métodos) se aplica un valor de 20.

Análisis de los resultados obtenidos mediante la prueba de irritación ocular con los 39 productos líquidos ensayados

Las predicciones de clasificación obtenidas con las pruebas de irritación ocular sobre los 39 productos químicos (Tabla 3) se compararon con las obtenidas con la prueba de Draize en una tabla de contingencia 2X2 para evaluar la predictibilidad de la prueba para distinguir en primer lugar los productos irritantes (Cat 1 y Cat 2) de los productos no irritantes (Sin-Cat) (Tabla 4). Se obtuvieron una especificidad, una sensibilidad y una precisión del 100% en este grupo de 39 productos químicos.

Se analizó a continuación una matriz de confusión que contenía 3 clases (Cat 1, Cat 2 y Sin-Cat, véase la Tabla 5) para calcular los rendimientos de la prueba para clasificar los productos según las normas UN-GHS. Se obtuvo una precisión para el usuario del 91,66%, del 93,33% y del 100% para los productos clasificados Cat 1, Cat 2 y Sin-Cat respectivamente. Con una precisión general del 95% y una kappa muy significativa de 0,923.

Estos resultados muestran que el ensayo de irritación ocular es muy eficaz para clasificar el potencial de irritación ocular de los productos químicos líquidos en las 3 clases definidas por el sistema de referencia UN-GHS.

Desarrollo del modelo de predicción de la prueba de irritación ocular para los sólidos

Para los sólidos, se ensayaron 15 productos químicos (Tabla 6). Utilizando el mismo grupo de 29 genes: HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61 (figura 2) fue posible clasificar los 15 productos químicos en una de las 3 categorías de irritación ocular establecidas por el sistema de referencia UN-GHS. Sin embargo, como algunos de los genes tenía un papel redundante y podían ser sustituidos entre sí, se pudo seleccionar un subgrupo de 13 genes que permitiera desarrollar un índice de irritación para los sólidos (SII) capaz de discriminar las 3 categorías de irritantes. La lista de los genes seleccionados para los sólidos incluye: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2, CLEC4D,

ICAM2, CASP1, MUC13, MUC4 (figura 2). El SII se elaboró en dos etapas. En primer lugar, se seleccionó un valor umbral para cada gen que permitiera poner en evidencia una sobreexpresión significativa. Se ensayaron diferentes valores umbral, y los valores óptimos adoptados para estos 13 genes fueron respectivamente de 2,3 y 10 para IL-24; y después, para cada uno de los otros genes, en el orden 1,9; 2; 1,4; 4; 3; 1,3; 2; 2,8; 4; 1,4; 1,8 y 2,5. Se atribuyó a continuación un peso a estos valores en función de la importancia de la sobreexpresión del gen considerado en los mecanismos de irritación ocular. Cada gen sobreexpresado por encima del valor umbral recibía entonces un valor ponderado de respectivamente: 1; 4; 4; 2; 1; 2; 2; 1; 4; 2; 4; 2; 3 y 4. Se calcula a continuación el SII sumando los valores de peso para cada uno de los genes sobreexpresados con un máximo de 36. Cuando el nivel de destrucción tisular se considera demasiado elevado (véase Materiales y métodos) se aplica un valor de 40.

Análisis de los resultados obtenidos por el ensayo de irritación ocular con los 15 productos sólidos ensayados

Las predicciones de clasificación obtenidas con las pruebas de irritación ocular sobre los 15 productos químicos sólidos (Tabla 7) se compararon con los obtenidos con la prueba de Draize en una tabla de contingencia 2X2 para evaluar la predictibilidad de la prueba para distinguir en primer lugar los productos irritantes (Cat 1 y Cat 2) de los productos no irritantes (Sin-Cat) (Tabla 8). Se obtuvieron una especificidad, una sensibilidad y una precisión del 100% en este grupo de 15 productos químicos.

A continuación, se analizó una matriz de confusión que contiene 3 clases (Cat 1, Cat 2 y Sin-Cat, véase la Tabla 9) para calcular los rendimientos de la prueba para clasificar los productos según las normas UN-GHS. Se obtuvo una precisión para el usuario del 100% para los productos clasificados Cat 1, Cat 2 y Sin-Cat. Con una precisión general del 100% y una kappa perfectamente significativa de 1.

Estos resultados muestran que la prueba de irritación ocular es muy eficaz para clasificar el potencial de irritación ocular de los productos químicos en las 3 clases definidas por el sistema de referencia UN-GHS.

**Leyenda de las figuras**

Figura 1 A, B, C, D: Análisis de expresión génica en el tejido corneal humano reconstruido en 3D tratado con diferentes productos químicos líquidos irritantes y no irritantes.

El valor de la tasa de sobreexpresión (fold increase) para los 29 genes indicados se ha representado para 4 productos químicos de categoría 1 (barras negras, en el orden de izquierda a derecha, ácido láctico, tioglicolato de metilo, lauril sulfato sódico (15%), cloruro de benzalconio (10%)), 4 productos químicos de categoría 2 (barras grises, en el orden de izquierda a derecha, alfa hexil cinamaldehído, acetona, metil etil cetona, 3-cloro propano nitrilo), y 4 productos no clasificados (Sin categoría, barras blancas, en el orden de izquierda a derecha: 1,9-decadieno, glicerol, Tween 20, 2,4-pentanodiol). Cada producto químico se aplicó al 100% (A y B) o se diluyó al 30% (C y D). Los genes utilizados para el ejemplo son HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 y CCND1.

Figura 2 A y B: Análisis de expresión génica en el tejido corneal humano reconstruido en 3D tratado con diferentes productos químicos sólidos irritantes y no irritantes.

El valor de la tasa de sobreexpresión (fold increase) para los 29 genes indicados se ha representado para 5 productos químicos de categoría 1 (barras negras, en el orden de izquierda a derecha, ácido 2-hidroxiisobutírico, hidrocloreuro de prometazina, oxalato sódico, 2,5-dimetilheanodiol, ácido 1-naftalenoacético), 2 productos químicos de categoría 2 (barras grises en el orden de izquierda a derecha, naftalenodiol, canfeno), y 8 productos no clasificados (Sin categoría, barras blancas, en el orden de izquierda a derecha, triclocarbán, metilenobis benzotriazol tetrametilbutilfenol, pirimetranilo, miristato de miristilo, 4,4'-metilen-bis-(2,6-di-terc-butilfenol), 4-bromofenetol, tetrafluoroborato de potasio). Cada producto químico se aplicó puro en polvo (30 ± 2 mg (que representa 60 mg/cm<sup>2</sup>)). Los genes seleccionados para el ejemplo son IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2 CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13, MUC4.

Tabla 1: Lista de los productos líquidos estudiados

n°	Químico	CAS RN	UN GHS
1	Triton X100 al 10%	9002-93-1	Cat 1
2	Triton X100 al 5%	9002-93-1	Cat 2A
3	Triton X100 al 1%	9002-93-1	Sin Cat
4	Laurilsulfato sódico al 3%	151-21-3	Sin Cat
5	Metil etil cetona	78-93-3	Cat 2A
6	Acetona al 100%	67-64-1	Cat 2A
7	Ácido láctico	50-21-5	Cat 1
8	Clorhexidina al 50%	55-56-1	Cat 1

n°	Químico	CAS RN	UN GHS
9	Cloruro de benzalconio al 5%	8001-54-5	Cat 1
10	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 10%	57-09-0	Cat 1
11	Triton X-100 al 10%	9002-93-1	Cat 1
12	Cloruro de benzetonio al 10%	121-54-0	Cat 1
13	Tioglicolato de metilo	2365-48-2	Cat 1
14	Dietilaminopropionitrilo	5351-04-2	Cat 1
15	Diacrilato de tetraetilengicol	17831-71-9	Cat 1
16	1-Clorooctan-8-ol	23144-52-7	Cat 1
17	[3-(2-Aminoetilamino)propil]trimetoxisilano	1760-24-3	cat 1
18	Hidróxido sódico al 0,3%	1310-73-2	Cat 2A
19	Cloruro de 2,6-diclorobenzoilo	4659-45-4	Cat 2A
20	Gammabutirolactona	96-48-0	Cat 2A
21	Alcohol alílico	107-18-6	Cat 2A
22	Gluconato de clorhexidina (20%)	18472-51-0	Cat 2A
23	Disolvente Propasol P	1569-01-3	Cat 2A
24	2-metil-1-pentanol	105-30-6	Cat 2B
25	iso-Butanal	78-84-2	Cat 2B
26	3-Cloropropionitrilo	542-76-7	Cat 2B
27	Etil-2-metilacetoacetato	609-14-3	Cat 2B
28	Ácido glicólico (10%)	79-14-1	Cat 2B
29	dietiltoluamida	134-62-3	Cat 2B
30	Glicerol	56-81-5	Sin Cat
31	Tween 20	9005-64-5	Sin Cat
32	octiltrimetoxisilano (SILAN 108)	3069-40-7	Sin Cat
33	1,9-decadieno	1647-16-1	Sin Cat
34	2,4-Pentanediol	625-69-4	Sin Cat
35	Metacrilato de 2-etoxietilo	2370-63-0	Sin Cat
36	Disulfuro de dipropilo	629-19-6	Sin Cat
37	Bromuro de n-hexilo	111-25-1	Sin Cat
38	Aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno (Kolliphor)	61788-85-0	Sin Cat
39	Étilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolío	342573-75-5	Sin Cat

Tabla 2: Lista de los genes analizados por RT-PCR

SÍMBOLO	DESCRIPCIÓN	Función	REFSEQ
ALB	Albúmina	Proteína principal de la córnea	NM_000477
ATP6V0E1	ATPasa, transportadora de H+, lisosomal 9 kDa, V0 subunidad e1	Implicado en la fosforilación oxidativa y fagosoma	NM_003945.3
B4GALT6	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosiltransferasa, polipéptido 6	Necesario para la biosíntesis de glicofosfolípidos. Más expresado en la córnea que los otros miembros de la familia.	NM_004775
CASP1	caspara 1, cisteína peptidasa relacionada con la apoptosis (interleucina 1, beta, convertasa)	Activación de IL-1.	NM_033292
CCL22	ligando 22 de quimiocina (motivo C-C)	Ligando de CCR4; implicado en el tránsito de las células T.	NM_002990.3
CCND1	ciclina D1	Regulador positivo del ciclo celular	NM_053056
CCNF	ciclina F	Regulador del ciclo celular	NM_001761.2
CCS	Chaperona de cobre para superóxido dismutasa	Proporciona el cobre al zinc superóxido dismutasa dependiente del cobre (SOD1)	NM_005125
CLEC4D	Familia 4 del dominio de lectina tipo C, miembro D	Receptor endocítico. Implicado en el tratamiento de los antígenos.	NM_080387.4
COL17A1	colágeno, tipo XVII, alfa 1	Desempeña un papel en la sujeción de los queratinocitos basales a la membrana basal.	NM_000494
COL6A2	colágeno, tipo VI alfa 2	Desempeña el papel proteína de unión celular	NM_001849.3
COL7A1	colágeno, tipo VII, alfa 1	Proteína de membrana del epitelio escamoso estratificado.	NM_000094

ES 2 906 329 T3

SÍMBOLO	DESCRIPCIÓN	Función	REFSEQ
COL8A2	colágeno, tipo VIII, alfa 2	Componente principal de la membrana de Descemet de células endoteliales corneales. Marcadores de las células endoteliales corneales humanas.	NM_005202.2
CRYAB	crystalina, alfa B	Susceptible de contribuir a la transparencia y al índice de refracción de la lente	NM_001885
CSF2	Factor 2 estimulante de colonias (Granulocitos-macrófagos)	Factor de crecimiento de las células hematopoyéticas	NM_000758.2
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conjuntivo	Tejido conectivo microatractivo principal segregado por las células endoteliales vasculares	NM_001901.2
CTSZ	catepsina Z	Cisteína proteinasa implicada en la degradación proteica lisosomal y extracelular	NM_001336.2
CXCL1	ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimulante de crecimiento de melanoma, alfa)	Dispone de una actividad quimiotáctica para los neutrófilos.	NM_001511.1
CXCL9	Ligando 9 de quimiocina (motivo C-X-C)	Dispone de una actividad quimiotáctica para las células T. Se une a CXCR3	NM_002416.1
CXCR1	Receptor 1 de quimiocina (motivo C-X-C)	Receptor de interleucina-8, factor quimiotáctico de neutrófilos.	NM_000634.2
CYR61	Inductor angiogénico, rico en cisteína, 61	Implicado en la neo vascularización de la córnea	NM_001554.4
CYYR1	Proteína 1 rica en cisteína/tirosina	Marcador específico para células endoteliales corneales humanas	NM_052954.2
DDIT3	Transcrito 3 inducible por el daño al ADN	Marcador de apoptosis	NM_004083.4
DEFB1	defensina, beta 1	Implicado en la defensa mucosal contra la agresión	NM_005218
DLK1	Homólogo tipo delta 1 ( <i>Drosophila</i> )	Ligando no canónico implicado en el desarrollo de los tejidos	NM_003836
DUOX2	Oxidasa dual 2	Miembro de la familia de NADPH oxidasas	NM_014080
DUSP6	Fosfatasa 6 con especificidad dual	Se dirige a la familia de ERK, y desempeña un papel en la proliferación de las células corneales.	NM_001946.2
ELN	elastina	Proteína principal de la estructura de los tejidos.	NM_000501.2
ESR1	Receptor 1 de estrógeno 1	Receptor nuclear hormonal. Afecta a la proliferación celular, y a la diferenciación de los tejidos diana.	NM_000125
FBN1	fibrillina 1	Las fibrillinas son unos componentes estructurales, asociados a veces a la elastina.	NM_000138
FBN2	fibrillina 2	Las fibrillinas son unos componentes estructurales, asociados a veces a la elastina.	NM_001999
FDXR	ferredoxina reductasa	flavoproteína mitocondrial que inicia el transporte de electrones para los citocromos P450 que reciben unos electrones del NADPH	NM_004110.3
FGF2	Factor 2 de crecimiento de fibroblastos (básico)	Factor de crecimiento y agente angiogénico.	NM_002006
FGFR1	Receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos	Receptor para factores de crecimiento de fibroblastos (FGF1 y FGF2)	NM_015850

SÍMBOLO	DESCRIPCIÓN	Función	REFSEQ
FOS	Homólogo del oncogén viral del osteosarcoma murino FBJ	Fosfoproteína nuclear que forma un complejo fuerte pero no covalente con el factor de transcripción JUN/AP-1.	NM_005252
FOXO1	Caja de cabeza de tenedor O1	Factor de transcripción implicado en las vías metabólicas de la insulina	NM_002015
FSHR	Receptor de la hormona estimulante de folículos	Receptor para la hormona estimulante de folículos (FSH).	NM_000145
FST	Folistatina	Inhibidor de FSH	NM_013409.2
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Produce unas pentosas para la síntesis de ácidos nucleicos, y principal productor de poder reductor de NADPH	NM_000402
GAA	Glucosidasa, alfa; ácido	Esencial para la degradación del glicógeno en glucosa en los lisosomas.	NM_000152.3
GSTT1	Glutación S-transferasa theta 1	Conjugación del glutatión reducido con numerosos compuestos electrófilos exógenos y endógenos.	NM_000853.2
GUSB	glucuronidasa, beta	Papel importante en la degradación de los sulfatos de dermatano y de los sulfatos de queratano.	NM_000181
H2AFY	Familia de histonas H2A, miembro Y	Variante de la histona H2A que sustituye a la H2A convencional en un subgrupo de nucleosomas allí donde reprime la transcripción.	NM_138610.2
HAS1	hialuronano sintasa 1	Desempeña un papel en la síntesis de hialuronano y de ácido hialurónico.	NM_001523
HSP90AA 1	Proteína de choque térmico 90 kDa alfa (citósólica), miembro 1 de la clase A	Chaperona molecular que promueve la maduración, el mantenimiento, la estructura y la regulación de proteínas diana específicas implicadas en el control del ciclo celular y la señal de transducción	NM_005348
HSPA1A	Proteína 1A de choque térmico de 70 kDa	Hsp70s estabiliza las proteínas contra a la agregación, y ayuda al repliegue de los nuevos péptidos traducidos en el citosol y en los orgánulos.	NM_005345
ICAM2	Molécula de adhesión intercelular 2	Las ICAM son los ligandos para la adhesión de las proteínas LFA-1 a los leucocitos.	NM_001099789.1
IER3	Respuesta temprana inmediata 3	Puede desempeñar un papel en la señal ERK inhibiendo la desfosforilación de ERK mediante la holoenzima fosfatasa PP2A-PPP2R5C	NM_003897.3
IGFBP2	Proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar insulina, 36 kDa	Inhibe el desarrollo y crecimiento mediados por el IGF.	NM_000597.2
IL-17C	Interleucina 17C	Estimula la liberación del factor de necrosis tumoral alfa e IL-1beta de la línea celular monocítica THO-1.	NM_013278
IL-1 R2	Receptor de interleucina 1, tipo II	Receptor de interleucina-1 alfa (IL-1A), beta (IL-1B) y de la proteína antagonista del receptor interleucina-a (IL-1ra).	NM_173343.1

ES 2 906 329 T3

SÍMBOLO	DESCRIPCIÓN	Función	REFSEQ
IL-23R	Receptor de interleucina 23	Se asocia a IL12RB1 para formar el receptor interleucina-23.	NM_144701.2
IL-24	Interleucina 24	Papel en la cicatrización	NM_181339.1
IRF1	Factor 1 regulador de interferón	Se une específicamente a la región aguas arriba reguladora de los genes de tipo I IFN e IFN del CMH, y activa estos genes.	NM_002198
ITGA6	integrina, alfa 6	La integrina alfa-6/beta-4 es un receptor de laminina en las células epiteliales, y desempeña un papel crítico estructural en el hemidesmosoma.	NM_000210.2
ITGA7	integrina, alfa 7	La integrina alfa-7/beta-1 es el receptor primario de laminina a nivel de los mioblastos esqueléticos y de las miofibras adultas.	NM_002206
JUN	proto-oncogen jun	Factor de transcripción que reconoce y se une al motivo heptamérico 5'-TGA[CG]TCA-3'	NM_002228
KL	Kloto	Implicado en los procesos de envejecimiento	NM_004795
KRT1	queratina 1	miembro de la familia de las queratinas	NM_006121.3
KRT14	queratina 14	miembro de la familia de las queratinas	NM_000526.4
KRT15	queratina 15	miembro de la familia de las queratinas	NM_002275.3
KRT17	queratina 17	miembro de la familia de las queratinas	NM_000422.2
KRT19	queratina 19	miembro de la familia de las queratinas	NM_002276.4
KRT3	queratina 3	miembro de la familia de las queratinas	NM_057088.2
KRT5	queratina 5	miembro de la familia de las queratinas	NM_000424
KRT9	queratina 9	miembro de la familia de las queratinas	NM_000226.2
MMP10	Metalopeptidasa 10 de la matriz (stromelisin 2)	Puede degradar la fibronectina, las gelatinas de tipo I, III, IV y V.	NM_002425.1
MMP13	Metalopeptidasa 13 de la matriz (colagenasa)	Degrada el colágeno de tipo I. Ninguna acción sobre gelatina o caseína.	NM_002127.2
MMP3	Metalopeptidasa 3 de la matriz (stromelisin 1, progelatinasa)	Degrada fibronectina, laminina, gelatinas de tipo I, III, IV, y V; colágenos III, IV, X, y IX, y proteoglicanos del cartílago.	NM_002422.3
MMP8	Metalopeptidasa 8 de la matriz (colagenasa de neutrófilos)	Degrada los colágenos fibrilares de tipo I, II y III.	NM_002424.2
MSN	Moesina	Implicada en las conexiones de las estructuras citoesqueleticas principales de la membrana plasmática.	NM_002444.2
MSRA	Metionina sulfóxido reductasa A	Funciona como una enzima de reparación de las proteínas inactivadas por la oxidación.	NM_012331
MUC1	Mucina 1, asociada a la superficie celular	Expresado por células apicales y desempeña un papel en la película lagrimal	NM_001204285.1
MUC13	Mucina 13, asociada a la superficie celular	Expresado por células apicales y desempeña un papel en la película lagrimal	NM_033049

ES 2 906 329 T3

SÍMBOLO	DESCRIPCIÓN	Función	REFSEQ
MUC16	Mucina 16, asociada a la superficie celular	Expresado por células apicales y desempeña un papel en la película lagrimal	NM_024690
MUC4	Mucina 4, asociada a la superficie celular	Expresado por células apicales y desempeña un papel en la película lagrimal	NM_018406
MYD88	Gen de respuesta primaria de diferenciación mielóide (88)	Proteína implicada en las vías de señalización del receptor de tipo Toll e IL-1	NM_001172569.1
NONO	Proteína de unión a octámero que no contiene el dominio POU	Proteínas de unión al ADN y ARN; implicadas en numerosos procesos nucleares.	NM_007363
NOS3	Óxido nítrico sintasa 3 (célula endotelial)	Producto de NO implicado en la relajación vascular del músculo liso.	NM_000603
OCLN	occludina	Papel en la formación y la regulación de las uniones fuertes, barrera paracelular de permeabilidad.	NM_002538.3
PER1	Homólogo 1 del periodo ( <i>Drosophila</i> )	Componente del mecanismo circadiano esencial para la generación de los ritmos circadianos	NM_002616
RAD23A	Homólogo A de RAD23 ( <i>S. cerevisiae</i> )	Receptor de multiubiquitina implicado en la modulación de la degradación por proteasoma	NM_005053
S100A4	Proteína A4 de unión a calcio S100	-	NM_002961.2
SIRT6	Sirtuina 6	Desacetilasa dependiente de NAD. Modula la acetilación de las histonas H3 a nivel de la cromatina telomérica durante la fase S del ciclo celular.	NM_016539
SIRT7	Sirtuina 7	Desacetilasa dependiente de NAD. Requerida para restaurar la transcripción del ARNr al final de la mitosis.	NM_016538
SLC4A11	Familia 4 de portadores de solutos, transportador de borroto de sodio, miembro 11	Transportador que desempeña un papel importante en el transporte de fluido mediado por el sodio en diferentes órganos. Previene las modificaciones morfológicas graves provocadas por un aumento de las concentraciones de NaCl en el estroma.	NM_001174090.1
SLIT2	Homólogo 2 de ranura ( <i>Drosophila</i> )	Actúa como guía molecular en la migración celular y parece modulado por la interacción con receptores homólogos.	NM_004787
SNN	Estanina	Desempeña un papel en los efectos tóxicos de los organotinos.	NM_003498
STK25	Serina/treonina cinasa 25	Serina/treonina cinasa oxidativa activada por el estrés susceptible de desempeñar un papel en la respuesta al estrés medioambiental.	NM_006374.3
THBS1	Trombospondina 1	Glicoproteína adhesiva que media las interacciones células-células y células-matrices. Se une a la heparina.	NM_003246

ES 2 906 329 T3

SÍMBOLO	DESCRIPCIÓN	Función	REFSEQ
TNFAIP3	Proteína 3 inducida por el factor alfa de necrosis tumoral	Enzima de edición dependiente de la ubiquitina que contiene unas actividades de ubiquitina-ligasa y desubiquitinasa.	NM_006290.2
TPSAB1	Triptasa alfa/beta 1	La triptasa es una proteasa principal presente en las células mastocitos, y segregada en la respuesta por la desgranulación/activación de este tipo de células.	NM_003294.3

Tabla 3: Resultados del análisis de los 39 productos líquidos ensayados por la prueba de irritación ocular (TIO) y comparación con los resultados obtenidos por la prueba de Draize

N°	Sustancia química	CAS RN	ÍNDICE de Irritación		100% 30%	Predicción TIO	UN-GHS
1	Triton X100 10%	9002-93-1	13	15	-	Cat 1	Cat 1
			12	13	-		
2	Triton X100 5%	9002-93-1	12	13	-	Cat 2	Cat 2A
			6	8	-		
3	Triton X100 1%	9002-93-1	8	7	-	Sin Cat	Sin Cat
			5	4	-		
4	Laurilsulfato sódico 3%	151-21-3	9	7	-	Sin Cat	Sin Cat
			9	7	-		
5	Metil etil cetona	78-93-3	12	11	-	Cat 2	Cat 2A
			8	7	-		
6	Acetona 100%	67-64-1	12	13	-	Cat 2	Cat 2A
			8	9	-		
7	Ácido láctico	50-21-5	13	14	-	Cat 1	Cat 1
			11	11	-		
8	Clorhexidina	55-56-1	13	14	-	Cat 1	Cat 1
			12	11	-		
9	Cloruro de benzalconio 5%	8001-54-5	14	17	-	Cat 1	Cat 1
			12	11	-		
10	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio 6%	57-09-0	13	15	-	Cat 1	Cat 1
			12	13	-		
11	Triton X-100 10%	9002-93-1	16	17	-	Cat 1	Cat 1
			11	12	-		
12	Cloruro de benzetonio 10%	121-54-0	12	14	-	Cat 1	Cat 1
			12	12	-		
13	Tioglicolato de metilo	2365-48-2	16	17	-	Cat 1	Cat 1
			15	14	-		
14	Dietilaminopropionitrilo	5351-04-2	15	14	-	Cat 1	Cat 1
			15	12	-		
15	Diacrilato de tetraetilenglicol	17831-71-9	11	11	-	Cat 2	Cat 1
			7	4	-		
16	1-Clorooctan-8-ol	23144-52-7	17	15	-	Cat 1	Cat 1
			13	11	-		
17	[3-(2-Aminoetilamino)propil]trimetoxisilano	1760-24-3	12	16	-	Cat 1	cat 1
			15	14	-		
18	Hidróxido sódico 0,3%	1310-73-2	12	17	-	Cat 2	Cat 2A
			5	3	-		
19	Cloruro de 2,6-diclorobenzoilo	4659-45-4	17	15	-	Cat 2	Cat 2A
			8	8	-		
20	Gammabutirolactona	96-48-0	17	16	-	Cat 2	Cat 2A
			8	8	-		
21	Alcohol alílico	107-18-6	17	15	-	Cat 2	Cat 2A
			8	7	-		
22	Gluconato de clorhexidino (20%)	18472-51-0	12	13	-	Cat 2	Cat 2A
			5	5	-		
23	Disolvente Propasol P	1569-01-3	15	17	-	Cat 1	Cat 2A
			16	17	-		

ES 2 906 329 T3

N°	Sustancia química	CAS RN	ÍNDICE de Irritación		100%	Predicción TIO	UN-GHS
					30%		
24	2-metil-1-pentanol	105-30-6	15	15	-	Cat 2	Cat 2B
			8	6	-		
25	iso-Butanal	78-84-2	15	20	-	Cat 2	Cat 2B
			6	8	-		
26	3-Cloropropionitrilo	542-76-7	16	11	-	Cat 2	Cat 2B
			8	7	-		
27	2-metilacetoacetato de etilo	609-14-3	12	9	13	Cat 2*	Cat 2B
			6	8	7		
28	Ácido glicólico (10%)	79-14-1	17	13	-	Cat 2	Cat 2B
			8	9	-		
29	dietiltoluamida	134-62-3	17	17	-	Cat 2	Cat 2B
			9	8	-		
30	Glicerol	56-81-5	0	0	-	Sin Cat	Sin Cat
			0	0	-		
31	Tween 20	9005-64-5	2	0	-	Sin Cat	Sin Cat
			0	0	-		
32	octiltrimetoxisilano (SILAN 108)	3069-40-7	6	10	8	Sin Cat*	Sin Cat
			0	3	2		
33	1,9-decadieno	1647-16-1	7	4	-	Sin Cat	Sin Cat
			0	0	-		
34	2,4-Pentanodiol	625-69-4	9	7	-	Sin Cat	Sin Cat
			6	2	-		
35	Metacrilato de 2-etoxietilo	2370-63-0	9	7	-	Sin Cat	Sin Cat
			4	3	-		
36	Disulfuro de dipropilo	629-19-6	7	0	-	Sin Cat	Sin Cat
			6	4	-		
37	Bromuro de n-hexilo	111-25-1	8	10	6	Sin Cat*	Sin Cat
			6	4	3		
38	Aceite de recino polioxietilenado hidrogenado (Kolliphor)	61788-85-0	7	4	-	Sin Cat	Sin Cat
			4	0	-		
39	etilsulfato 1-etil-3-metilimidazolio	342573-75-5	9	10	5	Sin Cat*	Sin Cat
			5	5	3		

Tabla 4: Medición de la capacidad de predicción de la prueba de irritación ocular para diferenciar los irritantes oculares (clasificados como Cat 1 o Cat 2) de los no irritantes (Sin Cat) en un lote de 39 productos químicos

DRAIZE	Clasificados	Sin Categoría
Clasificados (n)	27	0
Sin Categoría (n)	0	12
Total (n)	27	12
Sensibilidad (%)	100	
Especificidad (%)	100	
Precisión (%)	100	

Tabla 5: análisis por matriz de confusión de la capacidad de predicción de la prueba de irritación ocular para separar entre 3 clases de irritación (Cat 1, Cat 2 y Sin Cat) según las recomendaciones UN-GHS

		Ensayo de irritación ocular			Clasificación global	Exactitud productora (Precisión)
		Cat 1	Cat 2	Sin Cat		
UNGHS	Cat 1	11	1		12	91,66%
	Cat 2	1	14		15	93,33%
	Sin Cat			12	12	100%
	Verdad general	12	15	12	39	
	Exactitud del usuario (recuerdo)	91,66%	93,33%	100%		
Exactitud global	95%					
Kappa	0,923					

Tabla 6: Lista de los productos químicos sólidos estudiados

Número CAS	Nombre químico	Clase GHS
594-61-6	Ácido alfa-hidroxiisobutírico [ácido 2-hidroxiisobutírico]	Cat 1
58-33-3	Hidrocloreuro de prometazina	Cat 1
79-92-5	Canfeno	Cat 2B
62-76-0	Oxalato de sodio	Cat 1
110-03-2	2,5-Dimetilhexanodiol	Cat 1
86-87-3	Ácido 1-naftalenoacético	Cat 1
83-56-7	1,5-natalenodiol Nombre INCI: 1,5-NAFTALENODIOL	Cat 2A
101-20-2	1-(4-clorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)urea Nombre INCI: TRICLOCARBAN	Sin Cat
103597-45-1	2,2'-metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol) Nombre INCI: METILEN BIS-BENZOTRIAZOLIL TETRAMETILBUTILFENOL	Sin Cat
53112-28-0	2-anilino-4,6-dimetilpirimidina Nombre común: Pirimetanilo	Sin Cat
3234-85-3	Tetradecanoato de tetradecilo Nombre INCI: miristato de miristilo	Sin Cat
118-82-1	4,4'-Metilen bis-(2,6-di-terc-butilfenol)	Sin Cat
589-10-6	4-Bromofenetol	Sin Cat
14075-53-7	Tetrafluoroborato de potasio	Sin Cat
21645-51-2	Hidróxido de aluminio	Sin Cat

Tabla 7: Resultados del análisis de los 15 productos sólidos ensayados por la prueba de irritación ocular (TIO) y comparación con los resultados obtenidos por la prueba de Draize

nº	Nombre químico	CAS RN	ÍNDICE de irritación			Predicción TIO	UN-GHS
			34	28	32		
1	Ácido 2-hidroxiisobutírico	594-61-6	34	28	32	Cat 1	Cat 1
2	Hidrocloreuro de prometazina	58-33-3	34	32	30	Cat 1	Cat 1
3	Canfeno	79-92-5	10	12	13	Cat 2	Cat 2B
4	Oxalato de sodio	62-76-0	22	24	32	Cat 1	Cat 1
5	2,5-Dimetilhexanodiol	110-03-2	22	23	21	Cat 1	Cat 1
6	Ácido 1-naftalenoacético	86-87-3	26	28	25	Cat 1	Cat 1
7	1,5-Naftalenodiol	83-56-7	12	18	15	Cat 2	Cat 2A
8	Triclocarban	101-20-2	0	0	1	Sin Cat	Sin Cat
9	Metilene bis-benzotriazolil tetrametilbutil fenol	103597-45-1	2	4	3	Sin Cat	Sin Cat
10	Pirimetanilo	53112-28-0	0	0	0	Sin Cat	Sin Cat
11	Miristato de miristilo	3234-85-3	2	3	1	Sin Cat	Sin Cat
12	4,4'-Metilen bis-(2,6-di-terc-butilfenol)	118-82-1	3	0	0	Sin Cat	Sin Cat
13	4-Bromofenetol	589-10-6	2	2	3	Sin Cat	Sin Cat
14	Tetrafluoroborato de potasio	14075-53-7	4	6	2	Sin Cat	Sin Cat
15	Hidróxido de aluminio	21645-51-2	0	0	0	Sin Cat	Sin Cat

Tabla 8: Medición de la capacidad de predicción de la prueba de irritación ocular para diferenciar los irritantes oculares (clasificados como Cat 1 o Cat 2) de los no irritantes (Sin Cat) en un lote de 15 productos químicos sólidos

DRAIZE	Clasificados	Sin Categoría
Clasificados (n)	7	0
Sin Categoría (n)	0	8
Total (n)	7	8
Sensibilidad (%)	100	
Especificidad (%)	100	
Precisión (%)	100	

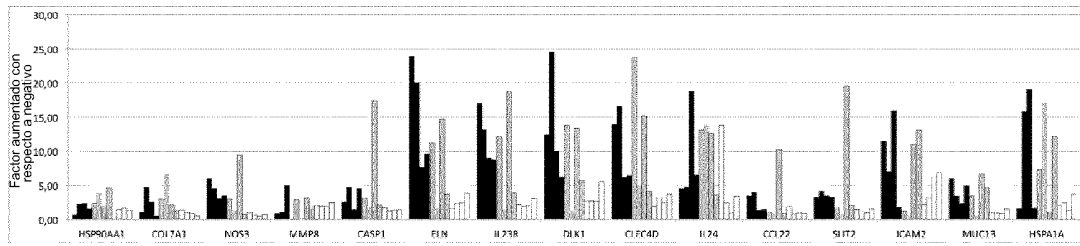
Tabla 9: Análisis por matriz de confusión de la capacidad de predicción de la prueba de irritación ocular para separar entre 3 clases de irritación (Cat 1, Cat 2 y Sin Cat) según las recomendaciones UN-GHS de los 15 productos sólidos

		Ensayo de irritación ocular			Clasificación	"Exactitud productora" (Precisión)
		Cat 1	Cat 2	Sin Cat		
UNGHS	Cat 1	5			5	100%
	Cat 2		2		2	100%
	Sin Cat			8	8	100%
	"Verdad general"	5	2	8	15	
	"Exactitud del usuario" (recuerdo)	100%	100%	100%		
"Exactitud global"	100%					
Kappa	1					

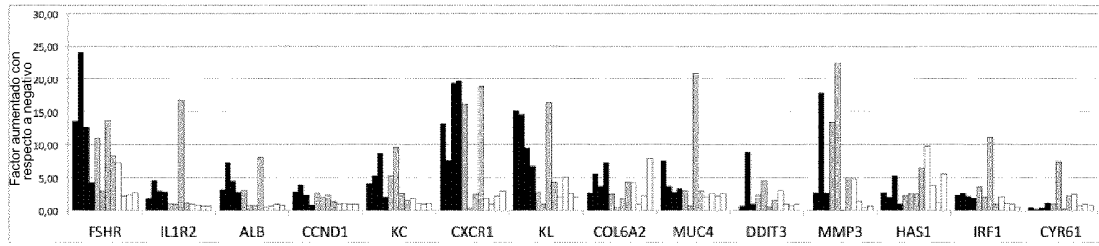
**REIVINDICACIONES**

1. Método de evaluación del potencial de irritación ocular de un compuesto de ensayo, que comprende las etapas siguientes:
- 5 a) poner en contacto un compuesto de ensayo con una muestra corneal reconstruida *in vitro*;
- b) medir la expresión de por lo menos dos genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, COL7A1, NOS3, MMP8, CASP1, ELN, IL-23R, DLK1, CLEC4D, IL-24, CCL22, SLIT2, ICAM2, MUC13, HSPA1A, FSHR, IL-1R2, ALB, CCND1, CXCL1, CXCR1, KL, COL6A2, MUC4, DDIT3, MMP3, HAS1, IRF1, CYR61,
- 10 caracterizado por que:
- 15 - la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma sólida, y la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos dos genes seleccionados de entre el grupo constituido por: IL-24, IL-23R, DDIT3, MMP8, DLK1, HAS1, CYR61, IL-1R2, CLEC4D, ICAM2, CASP1, MUC13 y MUC4, o
- 20 - la puesta en contacto del compuesto de ensayo en la etapa a) se realiza con el compuesto de ensayo en forma líquida, y la etapa b) comprende la medición de la expresión de por lo menos dos genes seleccionados de entre el grupo constituido por: HSP90AA1, CASP1, DLK1, CLEC4D, IL-24, SLIT2, HSPA1A, FSHR, IL-1R2 y CCND1.
- 25 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende una etapa suplementaria c) de determinación de un índice de irritación ocular del compuesto de ensayo.
3. Método según la reivindicación 2, caracterizado por que comprende una etapa d) de categorización de dicho compuesto como presentando un potencial de irritación ocular según el valor del índice de irritación ocular obtenido.
- 30 4. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la muestra corneal reconstruida *in vitro* es una muestra que comprende unas células epiteliales de córnea inmortalizadas, cultivadas en medio de cultivo definido, y dispuestas en capa fina sobre una membrana sintética en la interfaz agua-aire.
- 35 5. Método según una de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado por que la determinación del índice de irritación ocular del compuesto comprende la atribución de un valor umbral de sobreexpresión a cada gen cuya expresión se mide.
- 40 6. Método según la reivindicación 5, caracterizado por que el valor umbral que indica una sobreexpresión significativa del gen cuya expresión se mide puede estar comprendido entre 1,1 y 10.
7. Método según una de las reivindicaciones 5 o 6, caracterizado por que la determinación del índice de irritación ocular comprende la atribución de un valor de peso a cada gen si se alcanza el valor umbral de sobreexpresión de dicho gen.
- 45 8. Método según la reivindicación 7, caracterizado por que el valor de peso se selecciona de entre el grupo de valores discretos escalonados entre 1 y 10, es decir seleccionados de entre el grupo que consiste en los valores 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.
- 50 9. Método según la reivindicación 7 u 8, caracterizado por que el índice de irritación ocular se determina mediante la adición de los valores de peso de los genes cuya expresión supera el valor umbral de sobreexpresión.
10. Método según una de las reivindicaciones 3 a 9, caracterizado por que la etapa de categorización comprende la atribución de una categoría de irritación al compuesto de ensayo en función del valor del índice de irritación ocular obtenido.
- 55

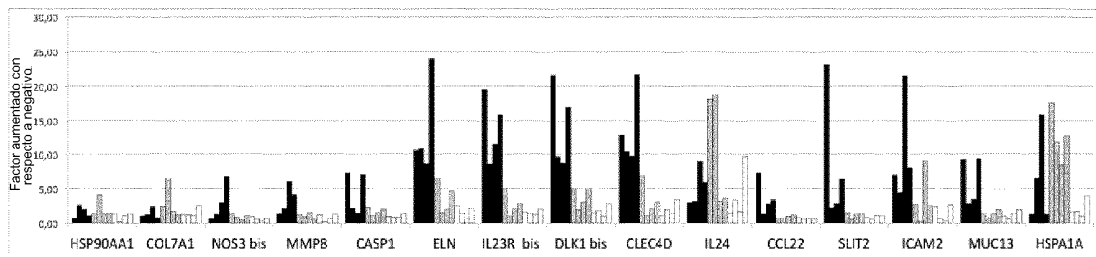
**A**



**B**



**C**



**D**

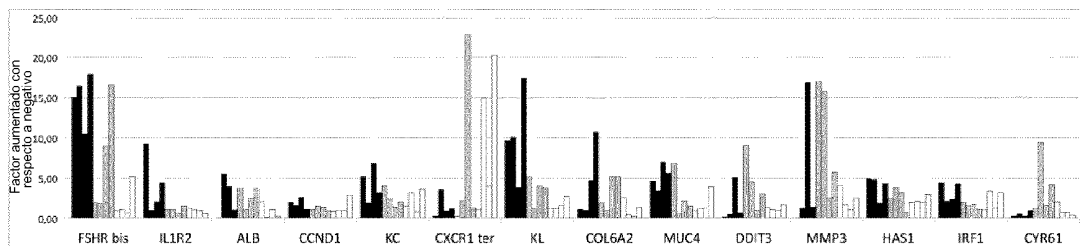


FIGURA 1

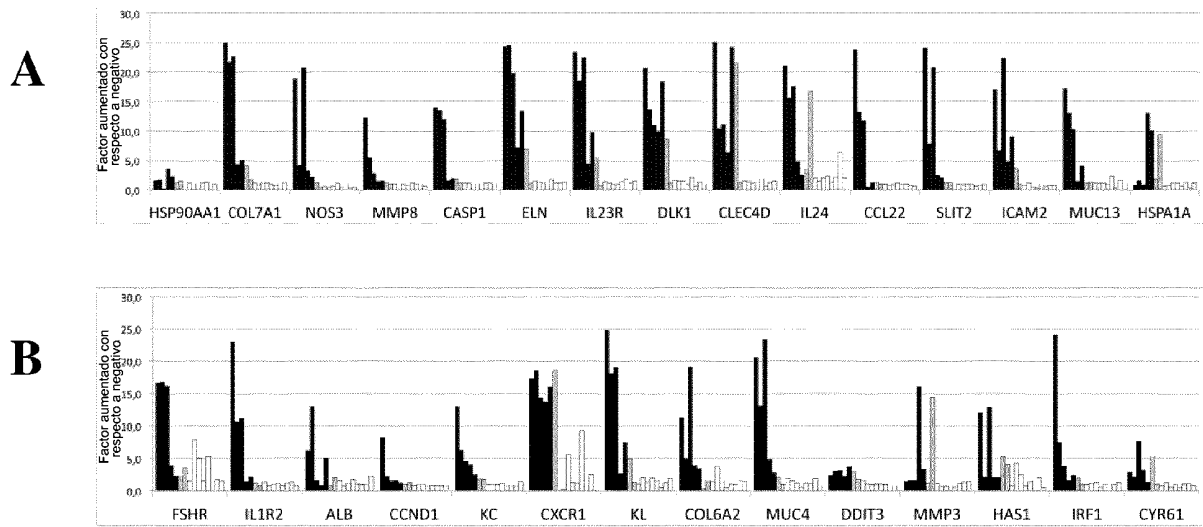


FIGURA 2