



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 292 412**

51 Int. Cl.:
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/60 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00401073 .2**
86 Fecha de presentación : **18.04.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1046402**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.10.2000**

54 Título: **Nuevo equivalente de piel de edad, su procedimiento de obtención y sus utilizaciones.**

30 Prioridad: **20.04.1999 FR 99 04970**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

73 Titular/es: **L'ORÉAL**
14, rue Royale
75008 Paris, FR

72 Inventor/es: **Pageon, Hervé;**
Asselineau, Daniel y
Tachon, Pierre

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 292 412 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

Nuevo equivalente de piel de edad, su procedimiento de obtención y sus utilizaciones.

5 La presente invención se refiere a un nuevo equivalente de piel de edad, a su procedimiento de obtención así como al equivalente de epidermis y al equivalente de dermis de edad, comprendidas en este equivalente de piel de edad y a sus utilizaciones *in vitro*.

10 Se investiga para poner a punto, desde hace varios años, modelos de piel reconstituida que permitan efectuar los estudios necesarios para la mejor comprensión del papel de la piel tanto en el campo mecánico como en el campo fisiológico.

15 Así, se han podido poner a punto modelos más o menos próximos a la piel humana. Se pueden citar, por ejemplo, los modelos descritos en las solicitudes de patentes EP-A-285471, EP-A-285474, EP-A-789074, EP-A-502172, EP-A-418035, WO-A-9116010, EP-A-197090, EP-A-20753, FR-A-2665175, FR-A-2689904. Algunos estudios se han basado igualmente en la evaluación del poder alérgico de los constituyentes de un equivalente de piel humana (Nemecek G y col., Toxicology Pathology, vol. 27, n° 1, Enero de 1999, páginas 101-103), sobre la recolonización por células de Langerhans de un equivalente de piel injertada sobre un ratón (Demarchez M y col., Journal of Investigative Dermatology, vol. 100, n° 5, 1993, páginas 648-652) y sobre la expresión diferencial de marcadores de diferenciación 20 como las integrinas en las capas suprabasales de la epidermis a partir de un equivalente de epidermis (Font y col., Cell Biology and toxicology, vol. 10, n° 5-6, 1994, páginas 353-359) o de un equivalente de piel humana sometido a una radiación UV (Hendéis S. W y col., Archives of Dermatological Research, vol. 290, n° 8, 1998, páginas 420-424). De manera muy general, los modelos de piel reconstituida descritos en estos documentos comprenden queratinocitos humanos asociados o no a otras células de la piel como los melanocitos y/o las células de Langerhans, depositados 25 sobre un soporte, a menudo un equivalente de dermis, y cultivados en condiciones tales que entran en un programa de diferenciación que desemboca en la formación de un equivalente de epidermis.

30 Los equivalentes de dermis descritos actualmente o bien son membranas artificiales como por ejemplo los filtros de la marca Millipore, sustitutos subcutáneos a base de colágeno, de plástico o de cualquier otro soporte compatible con la viabilidad celular, o bien soportes más elaborados para hacerlos más próximos a la dermis natural, como la dermis previamente desepidermizada o látex mixtos de colágeno/fibroblastos.

35 En los látex mixtos de colágeno/fibroblastos, la asociación de colágeno nativo y de fibroblastos humanos aislados conduce a la obtención de un equivalente de dermis que imita una dermis que no ha sido sometida a la acción del tiempo.

40 Los protocolos utilizados para la preparación de dichos látex utilizan colágeno que procede, en general, de tejidos jóvenes, colágeno que ha experimentado, sin embargo, las importantes modificaciones post-traducción que intervienen en los procesos complejos, pero a pesar de todo normales de su biosíntesis, pero que no ha experimentado todas las modificaciones que pueden intervenir particularmente en el curso del envejecimiento.

45 Se conoce, en particular, que en el curso del envejecimiento, así como en el curso de ciertas enfermedades, tales como la diabetes, se producen procesos no enzimáticos que hacen intervenir a una osa (glucosa o ribosa) que reacciona según la reacción de Maillard con un grupo aminado (por ejemplo, un resto de lisina) del colágeno para formar una base de Schiff. Ésta, después de la re-disposición molecular llamada de Amadori, puede conducir, por una sucesión de reacciones, a una construcción de un puente intermolecular como por ejemplo del tipo pentosidina. Este fenómeno, denominado glicación del colágeno, aumenta de forma regular con la edad lo que implica un aumento regular del contenido de la piel en productos de glicación. Estos productos de glicación son, por ejemplo, la pirralina, la carboximetil-lisina, la pentosidina, la crosslines, la N^ε(2-carboxietil)-lisina (CEL), la glioxal-lisina dímero (GOLD), la metilglioxal-lisina dímero (MOLD), la 3DG-ARG imidazolona, las versperlisinas A, B, C, la treosidina o incluso los productos 50 finales de glicosilación avanzada (Productos finales de glicosilación avanzada o AGEs). Reiser M y col. (Journal of Biochemistry, vol. 267, n° 4, 1992, páginas 24207-24216) ha puesto principalmente en evidencia la presencia de sitios preferenciales de glicación sobre las cadenas de colágeno, conservadas en el curso del envejecimiento.

55 Este fenómeno es amplificado en ciertas enfermedades como, por ejemplo, la diabetes.

60 Sin querer introducir ninguna teoría del envejecimiento de la piel, hay que indicar que otras características, que podrían ser igualmente una consecuencia de estos fenómenos de glicación como una disminución de la desnaturalización por calor, un aumento de la resistencia a la digestión enzimática y un aumento de las construcciones de puentes intermoleculares, han podido ser puestas en evidencia en el curso del envejecimiento de la piel (Tanaka S. y col. 1988, J. Mol. Biol. 203, 495-505; Takahashi M. y col. 1995, Analytical Biochemistry, 232, 158-162). Además, modificaciones debidas a la glicación de ciertos constituyentes de la membrana basal como el colágeno IV, la laminina y la fibronectina han podido ser puestas en evidencia (Tarsio JF. y col., 1985, Diabetes, 34, 477-484; Tarsio JF. y col., Diabetes, 37, 532-539; Stemberg M. y col., 1995, C. R. Soc. Biol., 1989, 967-985).

65 Así se comprende que en el curso del envejecimiento de la piel, las propiedades físico-químicas del colágeno se modifican y éste llega a ser más difícilmente soluble y más difícilmente degradable. Así, uno de los componentes de la piel de edad parece ser el colágeno glicado.

Se conoce bien que la piel resulta de una estrecha asociación entre al menos dos compartimientos que la constituyen, a saber, la epidermis y la dermis. Las interacciones entre la dermis y la epidermis son tales que es razonable pensar que una modificación de una puede tener consecuencias sobre la otra. Se puede sospechar que el envejecimiento de la dermis en particular con sus fenómenos de glicación no puede tener más que consecuencias sobre la epidermis que la está asociada. Así en el curso del envejecimiento cutáneo, la glicación del colágeno debe implicar modificaciones de la epidermis que participan necesariamente en el envejecimiento de la epidermis.

A este respecto, la Firma Solicitante ha podido mostrar ahora que una proteína constitutiva de la epidermis normal, a saber, la integrina del tipo $\beta 1$, receptor de la matriz extracelular (ver Rouslahti E., 1991, Cell biology of extracellular Matrix, Plenum press Nueva York, 343363), presenta en la epidermis de edad una distribución de su expresión muy diferente de la que existe en una epidermis joven. En efecto, si en una epidermis joven, es decir, en el sentido de la Firma Solicitante, una epidermis de sujeto joven, esta proteína se expresa en las capas muy inferiores de la epidermis, a saber, como máximo hasta la segunda capa suprabasal, todo lo contrario sucede en una epidermis de edad, es decir, en el sentido de la Firma Solicitante, en una epidermis de sujeto viejo, donde esta proteína se expresa en la mayor parte de las capas de la epidermis, hasta las últimas capas suprabasales, debajo de la capa córnea.

Actualmente, ningún modelo de piel reconstituida *in vitro* es capaz, ya sea a causa de los protocolos de preparación utilizados, ya sea debido al simple hecho de que una vez reconstituida no experimenta ninguna modificación, de producir un equivalente de piel, al menos uno de cuyos constituyentes presenta uno de los componentes del envejecimiento cutáneo. Así, ningún modelo de piel reconstituida *in vitro* presenta las características de una piel de edad y no permite el estudio de los procesos que conducen a ello, ni el estudio de los compuestos y/o composiciones que permitan al menos ralentizar este/estos procesos. Las únicas evaluaciones de estos fenómenos pasan por estudios *in vitro*, ya sea en el animal o en el hombre. Muy particularmente, por razones de ética, se comprende el interés en disponer de un modelo de este tipo.

Se conocen estudios sobre la glicación en la técnica anterior. Por ejemplo, se describe un procedimiento para obtener un equivalente de tejido conjuntivo en forma de un látex de colágeno glicado y de fibroblastos (ver a este respecto Frey y col., (1992, C. R. Soc. Biol. 187, 223-231). Sin embargo, además de que Frey y col. no han investigado jamás ni sugerido que sea posible preparar a partir de su látex un equivalente de piel, no la han comparado jamás con ningún equivalente de la dermis. Además, aunque reconociendo la validez del modelo de tejido conjuntivo de Frey y col., es necesario admitir que el protocolo utilizado por estos autores no puede conducir a los objetivos que se ha fijado la Firma Solicitante, a saber, reproducir *in vitro* un a piel y, por lo tanto, como consecuencia una epidermis y una dermis, que presenta todas o parte de las características de una piel de edad. Incubando el colágeno y el azúcar durante 9 días a una temperatura de 4°C, Frey y col. inician la reacción de glicación del colágeno, reacción que continúa en el látex, en el que el colágeno está así preglicado. Si se quiere alcanzar una tasa de glicación suficiente, para imitar una piel de edad, es necesario entonces dejar seguir la reacción de glicación en el látex así formado, es decir, en curso de contracción, todavía durante un tiempo suficiente para alcanzar la tasa buscada. Ahora bien, el técnico en la materia sabe que para establecer un equivalente de epidermis que contiene al menos queratinocitos sobre un equivalente de dermis de tipo látex de colágeno/fibroblasto, la siembra de los queratinocitos debe intervenir sobre un látex que no puede haber excedido un estadio de contracción determinada. Por lo tanto, de esto se deduce que no es posible obtener por el protocolo de Frey un equivalente de dermis que imita una dermis de edad, incluso muy de edad, es decir, fuertemente o incluso muy fuertemente glicada.

Así, pues, de acuerdo con el conocimiento de la Firma solicitante, no se ha descrito nunca la obtención de un equivalente de piel que comprenda un equivalente de epidermis obtenido sobre un equivalente de dermis de edad, particularmente sobre un látex que comprende al menos colágeno glicado y fibroblastos.

Se comprende entonces el gran interés que existe en disponer de un modelo de piel reconstituida, al menos uno de cuyos componentes presentaría uno de los aspectos de una piel de edad.

La Firma solicitante, que se ha interesado desde hace mucho tiempo en la realización de un modelo de piel reconstituida *in vitro*, ha puesto a punto un nuevo modelo de piel reconstituida que comprende un equivalente de epidermis y un equivalente de dermis, caracterizado por el hecho de que dicho equivalente de dermis comprende un equivalente de dermis de edad, particularmente un látex que comprende al menos colágeno glicado y fibroblastos.

Así, un primer objeto de la invención es un nuevo equivalente de dermis de edad, que comprende al menos colágeno glicado y fibroblastos y tal como se define en la reivindicación 1.

Se han descrito en la técnica anterior diferentes métodos para seguir la formación de los productos de glicación. A este respecto, se pueden citar, por ejemplo, los métodos descritos por Cefalu W. T. y col. (Journal of gerontology, Biological sciences, 1995, vol. 50, n° 6, 13337-13341), por Sell D. T. (Diabetes/Metabolism, 1991, vol. 7, n° 4, 239-251), por Miyata T. y col. (Journal of the american society of nephrology, 1996, vol. 7, n° 8, 1198-1206, o incluso por Furth A. J./Analytical biochemistry, 1991, 192, 109-111. Así, es posible medir la tasa de compuesto de glicación ligado al colágeno y/o la tasa de compuesto de glicación que permanece después de la reacción. Como se ha descrito anteriormente, la glicación del colágeno conduce a la formación de productos de glicación como por ejemplo la pirralina, la carboximetil-lisina, la pentosidina, las crosslinas, la (N^ε(2-carboxietil)-lisina (CEL), la glioxal-lisina dímero (GOLD), la metilglioxal-lisina dímero (MOLD), la 3DG-ARG imidazolona, las versperlisinas A, B, C, la treosidina o incluso los productos finales de glicosilación avanzada (Productos finales de glicosilación avanzada o AGÉs). Algunos de

ES 2 292 412 T3

5 estos productos de glicación presentan la particularidad de emitir después de la excitación una fluorescencia medible. Por ejemplo, la pentosidina, cuando se excita a una longitud de onda (λ_{exc}) de 328 nm, emite una fluorescencia a una longitud de onda (λ_{em}) de 378 nm. De la misma manera, los AGEs cuando se excitan a una longitud de onda (λ_{exc}) de 370 nm, emiten una fluorescencia a una longitud de onda (λ_{em}) de 440 nm. La relación de la fluorescencia emitida por un producto de glicación dado en el equivalente de dermis que comprende al menos colágeno glicado y fibroblastos con respecto a la fluorescencia emitida por el mismo producto de glicación en un equivalente de dermis testigo que comprende al menos colágeno no glicado y fibroblastos, medido en las mismas condiciones experimentales, permite caracterizar la tasa de glicación del equivalente de dermis de edad.

10 Particularmente, según la invención, se mide la fluorescencia de la pentosidina y/o de los AGEs tanto en el equivalente de dermis de edad que comprende colágeno glicado como en un testigo que comprende colágeno no glicado.

15 Así, según la invención, el equivalente de dermis de edad presenta una tasa de glicación comprendida entre 2 y 30, y particularmente comprendida entre 8 y 18.

20 Según la invención, el colágeno puede ser cualquier tipo de colágeno de cualquier origen. A este respecto, se hará referencia a los diferentes tipos de colágeno citados en las revisiones de Van der Rest et Garonne, 1990, Biochem., vol. 72, 473-484 o incluso en 1991, Faseb journal, vol. 5, 2814-2823. Así, según la invención, el colágeno es elegido con preferencia entre los colágenos fibrilares de tipo I, III o V.

25 Con preferencia, según la invención, se utiliza colágeno de origen animal, particularmente colágeno de origen bovino.

El colágeno utilizado con preferencia según la invención es colágeno de tipo I. Muy preferentemente según la invención se utiliza colágeno bovino de tipo I.

30 Bien entendido, según la invención, se puede utilizar una mezcla de colágeno de diferentes tipos en cualquier proporción y/o de diferentes orígenes.

35 Según la invención, los fibroblastos pueden provenir de todos los orígenes, pero con particularmente fibroblastos de origen humano. Se pueden preparar según cualquier método conocido de la técnica anterior, por ejemplo por disociación mecánica y/o enzimática de las macromoléculas de la matriz extracelular de la dermis o por crecimiento de los fibroblastos a partir de explantes.

40 Bien entendido, el equivalente de dermis de la invención comprende al menos colágeno glicado y fibroblastos, pero puede contener igualmente cualquier otro componente que podría ser interesante introducir allí como por ejemplo células endoteliales, macrófagos o incluso células nerviosas.

45 Un segundo objeto de la invención es un equivalente de epidermis, tal como se define en la reivindicación 8, y que comprende al menos queratinocitos, caracterizado por el hecho de que es susceptible de ser obtenido por semilla de al menos queratinocitos sobre un equivalente de dermis que comprende al menos colágeno glicado y fibroblastos.

50 Se ha visto anteriormente en el texto que, en función de la edad, ciertos marcadores de la epidermis podrían experimentar modificaciones ya sea en su cantidad ya sea en la localización de su expresión. Particularmente, la Firma solicitante ha mostrado que la expresión de la integrina $\beta 1$ en la epidermis se modifica en su localización con la edad de la epidermis. En efecto, si en una epidermis joven esta proteína se expresa estrictamente como máximo en las dos primeras capas suprabasales, con la edad esta expresión, conservando su localización en las dos primeras capas suprabasales, aparece en las capas cada vez más superiores hasta que aparece en el conjunto de las capas suprabasales, comprendidas las últimas capas próximas al stratum corneum.

55 Así, según la invención, el equivalente de epidermis se caracteriza por el hecho de que presenta una expresión de la integrina $\beta 1$ modificada, particularmente una expresión de la integrina $\beta 1$ en las células de al menos las tres primeras capas suprabasales.

60 Muy preferentemente según la invención, el equivalente de epidermis que comprende al menos queratinocitos se caracteriza por el hecho de que presenta una expresión de la integrina $\beta 1$ modificada, particularmente una expresión de la integrina $\beta 1$ en las células de al menos las tres primeras capas suprabasales y por el hecho de que se obtiene por siembra de al menos queratinocitos sobre un equivalente de dermis que comprende al menos colágeno glicado y fibroblastos.

65 Bien evidentemente, se puede utilizar cualquier método que permita poner en evidencia la expresión de la integrina $\beta 1$ para caracterizar la epidermis de la invención. A título de ejemplo, se puede citar la marcación con la ayuda de anticuerpos anti-integrina $\beta 1$.

Los queratinocitos utilizados según la invención pueden provenir de todos los orígenes, pero son con preferencia queratinocitos de origen humano. Se pueden preparar según cualquier método conocido de la técnica anterior. Se citará a título de ejemplo el cultivo a partir de la epidermis disociada que proviene de toma de piel normal o el cultivo de queratinocitos resultantes de la funda del folículo piloso.

ES 2 292 412 T3

Con preferencia según la invención, se utilizan queratinocitos de piel humana normal.

Con preferencia, según la invención los queratinocitos utilizados son preparados a partir de epidermis humana disociada que procede de toma de piel humana normal según el método descrito en Régnier y colaboradores, *Frontier of Matrix Biology*, Vol. 9 4-35 (Karger, Basilea 1981).

El equivalente de epidermis de la invención comprende al menos queratinocitos, pero puede comprender cualquier otro tipo celular que podría ser incorporado como por ejemplo células de Langerhans y/o precursores de células de Langerhans y/o melanocitos.

Bien entendido, el equivalente de piel que presenta la mejor similitud con la piel normal es el equivalente de piel que contiene los tres tipos celulares esenciales presentes en la piel normal.

Así, ventajosamente, el modelo de piel reconstituida según la invención comprende, además, melanocitos y/o células de Langerhans y/o precursores de células de Langerhans.

Los melanocitos utilizados según la invención puede ser aislados a partir de cualquier órgano que los contiene como por ejemplo la piel normal o el folículo de cabello.

Con preferencia, se utilizan melanocitos aislados a partir de piel normal.

Cualquier método de preparación de los melanocitos conocido de la técnica anterior se puede utilizar según la invención. Se puede citar, por ejemplo, el método descrito en Oisson y colaboradores, *Acta Derm. Venerol.*, 1994, 226-268.

Las células de Langerhans y/o los precursores de células de Langerhans utilizables según la invención pueden ser los descritos por la Firma solicitante en su solicitud de patente europea publicada con el número EP-A-789074.

Un tercer objeto de la invención es un equivalente de piel de edad, tal como se define en la reivindicación 11, caracterizado por el hecho de que comprende al menos un equivalente de epidermis y un equivalente de dermis de edad.

Un equivalente de piel de edad muy preferido según la invención comprende un equivalente de piel que comprende al menos queratinocitos que presentan una expresión de la integrina $\beta 1$ modificada, particularmente una presión de la integrina $\beta 1$ en las células de al menos las tres primeras capas suprabasales y que se caracteriza por el hecho de que es susceptible de ser obtenida por semilla de al menos queratinocitos sobre un equivalente de dermis de edad que comprende al menos colágeno glicado y fibroblastos, presentando dicho equivalente de dermis de edad una tasa de glicación comprendida entre 2 y 30, y particularmente comprendida entre 8 y 18.

Un cuarto objeto de la invención es un procedimiento de preparación de un equivalente de piel de edad, tal como se define en la reivindicación 13, que comprende un equivalente de epidermis y un equivalente de dermis de edad, que comprende ella misma un látex que comprende al menos colágeno glicado y fibroblastos, caracterizado por el hecho de que en una primera etapa se prepara un látex que comprende al menos colágeno glicado y fibroblastos, y por el hecho de que en una segunda etapa se reconstituye sobre el látex obtenido en la primera etapa un equivalente de epidermis que comprende al menos queratinocitos.

La primera etapa puede ser realizada por cualquier procedimiento conocido de la técnica anterior, con tal que el colágeno utilizado pueda ser glicado ya sea previamente, ya sea durante, ya sea después de la formación del látex. Con preferencia según la invención, se prepara un látex en el que o bien se utiliza colágeno glicado previamente a la formación del látex, o bien se añade a la mezcla de colágeno y de fibroblastos utilizada un agente de glicación con el fin de provocar la glicación ya sea durante la preparación del látex ya sea después de la formación del látex.

Con preferencia según la invención, se prepara el látex según el método descrito por Asselineae y col., 1987, (*Models in dermatol.* Vol. III, Ed. Lowe & Maibach, 1-7) utilizando colágeno preglicado.

Cualquier método conocido de glicación puede ser utilizado para obtener colágeno glicado. Se citarán, por ejemplo, los métodos descritos por Tanaka y col. (*J. Mol. Biol.*, 1988, 203, 495-505), por Tarsio JF. y col. (1985, *Diabetes*, 34, 477-484), por tarsio JF. y col. (1988, *Diabetes*, 37, 532.539) o incluso por Frey J. y col. (1992, *C. R. Soc. Biol.* 187, 223-231).

Con preferencia según la invención, la glicación puede ser obtenida por la puesta en presencia de una solución de al menos un colágeno y de una solución de al menos un agente de glicación, con el fin de inducir la reacción de glicación del colágeno *in-vitro* en ausencia de células.

Como se ha indicado anteriormente, el colágeno utilizado puede ser de cualquier tipo de colágeno, de cualquier origen, solo o en mezcla. Con preferencia según la invención se utiliza colágeno de origen animal, particularmente colágeno de origen bovino. El colágeno utilizado con preferencia según la invención es colágeno de tipo I. Muy preferentemente según la invención se utiliza colágeno bovino de tipo I.

ES 2 292 412 T3

La solución de colágeno puede estar en una concentración comprendida entre 2 mg/ml y 6 mg/ml y con preferencia entre 3 mg/ml y 5 mg/ml.

5 El agente de glicación puede ser cualquier agente que permita la glicación, es decir, capaz de reaccionar según la reacción de Maillard con un grupo aminado de colágeno para formar una base de Schiff. A este respecto, se pueden citar, por ejemplo, ciertos intermediarios de la reacción de Maillard, como por ejemplo la glucosona, la 3-deoxiglucosona, el glioxal, el metil-glioxal o incluso los azúcares.

10 Cualquier tipo de azúcar es utilizable según la invención, ya sea en forma monomérica o polimérica. Según la invención, se utiliza con preferencia un azúcar monomérico.

Por azúcar se entiende según la invención los productos que poseen varias veces una función alcohol con al menos una función aldehído. Se citarán particularmente las osas.

15 Entre los azúcares utilizables según la invención se pueden citar, entre otros, la ribosa, la fructosa, o la glucosa. Particularmente según la invención se utiliza ribosa o glucosa.

20 El azúcar puede estar en una cualquiera de las conformaciones dextrogiro o levógiro. Con preferencia según la invención, se utiliza un azúcar en conformación dextrogiro.

Particularmente según la invención se utiliza D-fructosa, D-ribosa o D-glucosa. Con preferencia se utiliza D-ribosa o D-glucosa.

25 Bien entendido, se puede utilizar el agente de glicación solo o en mezcla.

30 La cantidad de agente de glicación utilizable según la invención debe ser suficiente para permitir el inicio de las reacciones no enzimáticas que conducen a la formación de base de Schiff. Se comprende la variación de esta cantidad permite obtener un producto final, el colágeno glicado, cuya tasa de glicación varía muy poco de glicado a muy fuertemente glicado. Así, la cantidad de agente de glicación puede estar comprendida entre 0,5% y 20%, con preferencia entre 1% y 10% en peso del peso total de la solución de colágeno.

La reacción de glicación se efectúa a una temperatura próxima a la temperatura ambiente. Así, la reacción se efectúa a una temperatura comprendida entre 15°C y 30°C, con preferencia entre 20°C y 25°C.

35 La duración de la reacción de glicación es función de la tasa de glicación buscada. Se comprende que cuanto más largo es el tiempo, más elevada es la tasa de glicación. Así, la duración de la reacción de glicación está comprendida entre 15 días y 2 meses, con preferencia entre 25 y 35 días.

40 Cuando se ha elegido realizar la glicación previamente a la preparación del látex, es posible hacer experimentar el colágeno glicado todas las etapas posteriores necesarias para la obtención de un producto lo más puro posible. Así es posible tratar de eliminar cualquier traza de agente de glicación que no hubiera reaccionado en el transcurso de la reacción. Para ello se puede utilizar cualquier técnica conocida. Por ejemplo, se hace someter a la solución de colágeno preglicado a una serie de diálisis contra el agua y/o el ácido acético.

45 Según una variante de la invención, la solución de colágeno "preglicado" obtenida puede ser mezclada con colágeno nativo que tiene utilidad para la preparación del equivalente de dermis. En este caso, la relación entre el colágeno glicado y el colágeno no glicado puede estar comprendida entre 25 y 75 y con preferencia entre 45 y 55. La variación de esta relación permite modular la tasa de glicación del látex. Con preferencia, según la invención, se utiliza una mezcla de colágeno glicado y de colágeno no glicado, e incluso más preferentemente una mezcla de colágeno glicado y de colágeno no glicado en una relación 50/50.

50 La segunda etapa del procedimiento de la invención puede ser realizada por cualquier procedimiento conocido de la técnica anterior. A este respecto, se citarán, por ejemplo, los métodos descritos en las solicitudes de patentes EP-A-285471, EP-A-285474, EP-A-789074, EP-A-502172, EP-A-41035, WO-A-9116010, EP-A-197090, EP-A-20753, FR-A-2665175, FR-A-2689904 o incluso el descrito por Asselineau y col., 1985, (Exp. Cel. Res., 536-539) y 1987, (Models in dermato., vol. III, Ed. Lowe & Maibach, 1-7). Paralelamente según la invención, se utiliza el método descrito pro Asselineau y colaboradores.

60 Los queratinocitos utilizados según la invención pueden provenir de todos los orígenes, pero son con preferencia queratinocitos de origen humano. Pueden ser preparados según cualquier método conocido de la técnica anterior. Se citará a título de ejemplo el cultivo a partir de epidermis disociada que proviene de toma de piel normal o el cultivo de queratinocitos que resultan de la funda del folículo piloso.

65 Preferentemente según la invención, los queratinocitos utilizados son preparados a partir de epidermis humana disociada que procede de toma de piel humana normal según el método descrito en Régnier y colaboradores, Frontier of Matrix Biology, Vol. 9, 4.35 (Karger, Basilea 1981).

ES 2 292 412 T3

Ventajosamente, después de la siembra de los queratinocitos sobre el soporte, el cultivo se puede mantener sumergido en un medio nutritivo, que puede ser, por ejemplo, el medio descrito por Rheinwald y Green, 1975, (Cell, 6 (3), 317-330), medio que permite la proliferación de queratinocitos (designado, por otra parte, en el mismo texto como medio 3F).

5

Después de un tiempo de incubación de 3 a 15 días, con preferencia de 7 a 9 días, el equivalente de piel se mantiene en la interfaz aire/líquido por ejemplo por deposición sobre una rejilla metálica. El líquido está constituido entonces preferentemente del mismo medio nutritivo que el precedente.

10

La incubación se prosigue a continuación hasta la obtención de un equivalente de piel que presenta las características de una piel, a saber, el soporte sobre el que se encuentra un equivalente de epidermis que presenta los cuatro tipos de capas celulares clásicas, a saber, las capas basa, suprabasal, granulosa y córnea.

15

Así. La incubación se prosigue durante un periodo de tiempo comprendido entre 5 y 30 días, preferentemente entre 7 y 10 días.

20

El modelo de piel reconstituida realizado de esta manera comprende dos entidades, el soporte y el equivalente de epidermis, que es posible separar físicamente el uno del otro. El equivalente de epidermis puede ser utilizado entonces separadamente del soporte.

25

Se ha visto anteriormente en el texto que actualmente no existe ningún modelo de piel reconstituida *in vitro* que presente las características de una piel de edad y que permita el estudio de procesos que conduzcan a ello, ni el estudio de compuestos y/o composiciones que permitan al menos modificar el proceso. El equivalente de piel obtenido según la invención resuelve sus problemas, puesto que presenta al menos una de las características de la piel de edad, a saber, un colágeno glicado. Esta característica importante, que el modelo y su procedimiento permiten hacer variar en cualquier proporción, permite el estudio del fenómeno de glicación en sí mismo así como de los moduladores (inhibidores o activadores) de este fenómeno, el estudio de los fenómenos ligados a la epidermis de edad como por ejemplo de las arrugas, el estudio de los moduladores (compuestos aislados y/o composiciones) de la aparición de las arrugas (inhibidores particularmente), el estudio del fotoenvejecimiento y del efecto de las radiaciones ultravioletas sobre la piel así como de los moduladores de estos efectos (compuestos y/o composiciones de protecciones, filtros, etc.), el estudio de la influencia de la glicación sobre los componentes de la piel (pelos y/o cabellos, vasos sanguíneos, fibras nerviosas, etc.) y en el campo terapéutico el estudio de las complicaciones causadas por la diabetes a través de la glicación.

35

Así la invención tiene igualmente por objeto la utilización *in vitro* de un equivalente de piel de edad y/o de dermis de edad y/o de un equivalente de epidermis de edad, tal como se han descrito anteriormente, para el estudio del fenómeno de glicación en sí mismo así como de los moduladores (inhibidores o activadores) de este fenómeno, el estudio de los fenómenos ligados a la piel de edad y/o la epidermis de edad como por ejemplo de las arrugas, el estudio de los moduladores (compuestos aislados y/o composiciones) de la aparición de las arrugas (inhibidores particularmente), el estudio del fotoenvejecimiento y del efecto de las radiaciones ultravioletas sobre la piel y/o la dermis y/o la epidermis así como de los moduladores de estos efectos (compuestos y/o composiciones de protecciones, filtros, etc.), el estudio de la influencia de la glicación sobre los componentes de la piel y/o de la dermis y/o de la epidermis (pelos y/o cabellos, vasos sanguíneos, fibras nerviosas, etc.) y en el campo terapéutico el estudio de las complicaciones causadas por la diabetes a través de la glicación.

45

Se ha visto igualmente que según la invención, el equivalente de epidermis reconstituido sobre el equivalente de dermis, que comprende al menos colágeno glicado y fibroblastos, puede presentar una distribución de la expresión de la integrina $\beta 1$ modificada. En este caso, si la variación de la distribución de este marcador está ligada a la edad de la epidermis, es aconsejable utilizar el equivalente de piel de edad de la invención para evaluar cualquier producto apto para tratar la piel de edad midiendo su efecto por el efecto que produce sobre la modificación de la distribución de la expresión de la integrina $\beta 1$ en el equivalente de dermis.

50

La figura 1 permite ilustrar mejor la invención, sin limitar, sin embargo, su alcance. En esta figura, las fotos muestran cortes de equivalentes de piel después del inmuno marcado con la ayuda de un anticuerpo anti-integrina $\beta 1$. La foto 1 representa el inmuno marcado de un equivalente de piel que comprende un equivalente de epidermis reconstituido sobre un equivalente de dermis preparado con colágeno glicado según la invención.

55

A continuación se darán ejemplos que ilustran la invención sin limitarla de ninguna manera.

60 Ejemplos

Medios y tampones, salvo indicación contraria, el conjunto de los medios y tampones utilizados en los ejemplos se describen en Bell y col., 1979, (P.N.A.S., USA, 76, 1274-1278), Asselineau y Prunieras, 1984, (British J. of Derm., 111, 219-222) o Asselineau y col., 1987, (Models in dermat., vol. III, Ed. Lowe & Maibach, 1-7).

65

ES 2 292 412 T3

Ejemplo 1

Preparación de colágeno I bovino glicado

5 En un tubo Falcon de 50 ml se introdujeron 10 ml de solución de colágeno I bovino en la concentración de 3mg/ml, 0,8 ml de sosa 0,5N para neutralizar la solución ácida de colágeno y 100 μ l de una solución de D-ribosa a 1M en agua. El tubo opaco a la luz se colocó en la horizontal y se agitó suavemente a temperatura ambiente (25°C) durante un mes.

10 Al término de la “preglicación”, se colocó la solución en una mecha de análisis (Spectra/Poly labo 32 mm nº 132655/85716) y se sometió a una serie de diálisis sucesivas:

15 24 h contra agua desmineralizada a 4°C con el fin de eliminar el azúcar no fijado o los productos de degradación del colágeno;

7 días contra ácido acético 0,5 N con el fin de colocar en solución el colágeno en 2 baños de 3 días y medio;

3 x 24 h contra ácido acético 0,017 N con cambio de baño cada día.

20 Después del último diálisis, el contenido de la mecha de diálisis se recuperó en un Bécher estéril y la solución fue transferida a un tubo Falcon de 50 ml estéril, hecho opaco a la luz. La solución de colágeno “preglicado” estaba entonces preparada para el empleo. Se puede conservar a 4°C.

Ejemplo 2

Preparación de un equivalente de dermis de edad

25 En un tubo Falcon estéril se introdujeron 3,22 ml de medio MEM 1,76 X, 0,63 ml de suero de ternera fetal, 0,35 ml de sosa 0,1 N, y 0,20 ml de una mezcla de medio MEM/Hépes que contiene 10% de suero de ternera fetal (MEM/Hepes/SVF10). Se añadieron entonces 0,50 ml de medio MEM/HEPES/SVF10 que contenía fibroblastos procedentes de plástias mamarias humanas previamente preparadas según el método descrito por Bell y col. 1979, (P.N.A.S., USA, 76, 1274-1278), Asselineau y Prunieras, 1984, (British J. of Derm., 111, 219-222) o Asselineau y col., 1987, (Models in dermatol., vol. III, Ed. Lowe & Maibach, 1-7), en la concentración de 1 x 10⁶ células para 0,5 ml de medio de cultivo.

35 Se añadieron entonces lentamente, contra la pared del tubo con el fin de observar la aparición de una nube blanquecina, 2 ml de una mezcla volumen/volumen de colágeno preglicado del ejemplo 1 y de colágeno no-glicado que había servido para la preparación del colágeno preglicado del ejemplo 1 en la concentración de 3 mg/ml en ácido acético a 1/1000. El conjunto fue mezclado entonces con precaución y depositado en una bandeja de Petri de diámetro 60 mm (tipo Falcon 60 mm, ref. 1016). La bandeja de Petri fue colocada entonces en una estufa a 37°C y se dejó estar durante 40 2 h 30 aproximadamente. Cuando se observó la aparición de 2 fases, (gel + medio), se separó con precaución el látex de su soporte y se dejó el látex así separado de su soporte durante 4 días en la estufa.

Ejemplo 3

Medición de la tasa de glicación del equivalente de dermis de edad del ejemplo 2

45 Paralelamente a la realización del equivalente de dermis de edad del ejemplo 2, se realizó un equivalente de dermis sin colágeno glicado (pero con colágeno no glicado). Este equivalente servirá de testigo en la determinación de la tasa de glicación del equivalente de dermis glicado del ejemplo 2.

50 2 látex (uno de edad, un testigo) preparados según el ejemplo 3 fueron aclarados tres veces en tampón de fosfato salino (PBS), luego fueron secados. Los látex fueron colocados entonces en un tubo Eppendorf y sometidos a una digestión a la pepsina (Sigma P-6887) a 37°C al baño María durante una noche (12 horas) a razón de 500 μ g de pepsina por látex en 0,5 ml de ácido acético 0,5 N.

55 Se añadieron entonces en cada tubo 515 μ l de sosa 0,5 N y se filtró el contenido de cada tubo sobre filtro spin x 0,22 μ m (Sigma). La fluorescencia se midió entonces con la ayuda de un espectrofluorímetro de marcha Hitachi, modelo FS2000. De esta manera se midió después de la excitación a $\lambda_{ex} = 328$ la fluorescencia emitida a $\lambda_{em} = 378$ m, por la pentosidina y después de la excitación a $\lambda_{ex} = 370$ nm, la fluorescencia emitida a $\lambda_{em} = 440$ nm por los AGEs.

65

ES 2 292 412 T3

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla siguiente:

	Pentosidina	AGES
Testigo	650	430
Látex glicado	6100	1820

En este ejemplo, la tasa de glicación del equivalente de dermis de edad se establece, por lo tanto, en 9,4 para la pentosidina y en 4 para los AGES.

Ejemplo 4

Preparación de un equivalente de piel de edad

Un equivalente de dermis de edad, tal como se preparó en el ejemplo 2, fue montado bien extendido en una bandeja de cultivo de tipo Corning Ø 60 mm sobre una gota de "cola" de colágeno (0,6 ml), luego se mantuvo a 37°C en una estufa durante 20 - 30 minutos.

Un anillo de acero estéril se colocó sobre el látex y 0,5 ml de una suspensión celular de queratinocitos humanos procedentes de plastias mamarias preparadas según Régnier y colaboradores (Frontier of Matrix Biology, Vol. 9, 4-35, Karger, Basilea 1981), a razón de 100 000 células/ml en medio MEM 10% FCS + 3F, se colocaron en el interior del anillo.

Aproximadamente 6 ml de medio (MEM 10% FCS + 3F) se colocaron alrededor del anillo y la bandeja se colocó en una estufa a 37°C durante 2 horas. El anillo se retiró entonces y la bandeja se colocó de nuevo en la estufa.

Después de 8 días, se colocó el cultivo entonces en la interfaz aire/líquido, estando constituido dicho líquido entonces del mismo medio que anteriormente.

El cultivo de prosiguió entonces durante 1 semana hasta la obtención de un equivalente de epidermis histológicamente satisfactorio, es decir, un equivalente de epidermis que presenta las cuatro capas celulares clásicas, a saber, las capas basa, suprabasal, granulosa y córnea.

Ejemplo 5

Caracterización de la expresión de la integrina $\beta 1$ en el equivalente de epidermis obtenido en el ejemplo 4

La expresión de la integrina $\beta 1$ en el equivalente de epidermis obtenido en el ejemplo 4 se observó después de la inmuno marcación con la ayuda de un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la integrina $\beta 1$ (Immunotech, Marsella, Francia, Cat. 1151):

Después de la congelación, los equivalentes de piel obtenida en el ejemplo 4 fueron cortados en láminas de 5 μm de espesor con la ayuda de un criostato (marca/modelo). Los cortes fueron aclarados entonces dos veces con PBS y 25 μl de anticuerpo antiintegrina $\beta 1$ diluido a 1/50 (Immunotech, Marsella, Francia, Cat. 1151) fueron depositados sobre cada una de las capas y dejados durante 30 minutos a la temperatura ambiente (25°C). Las capas fueron aclaradas entonces dos veces con PBS y se depositaron 25 μl de anticuerpos conjugados FITC (Rabbit anti mouse FITC, Dako F232) sobre cada una de las capas y se dejaron durante 30 minutos a la temperatura ambiente (25°C). Las capas fueron aclaradas dos veces con PBS y observadas después del montaje al microscopio de fluorescencia de marca LEICA, modelo LEITZ DMRB.

La observación mostró que el testigo de integrina $\beta 1$ se expresa en la capa basal de la epidermis reconstituida sobre el equivalente de dermis no glicada, así como en la primera capa suprabasal (figura 1, foto 1), mientras que se expresa en la totalidad de las capas suprabasales, hasta debajo del stratum corneum en la epidermis reconstituida sobre el equivalente de dermis de edad (figura 1, foto 2).

Estos resultados están correlacionados con la observación de una distribución *in vivo* de la expresión de la integrina $\beta 1$ en una piel de sujeto joven en la capa basal y en la primera capa suprabasal y en la capa basal y en al menos las 3 primeras capas suprabasales en la piel de un sujeto de edad.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Equivalente de dermis de edad, que comprende al menos colágeno glicado y fibroblastos, **caracterizado** por el hecho de que presenta una tasa de glicación comprendida entre 2 y 30.
2. Equivalente de dermis de edad según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que presenta una tasa de glicación comprendida entre 8 y 18.
- 10 3. Equivalente de dermis de edad según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** por el hecho de que el colágeno glicado es de origen animal o humano.
4. Equivalente de dermis de edad según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** por el hecho de que el colágeno glicado es de origen animal.
- 15 5. Equivalente de dermis de edad según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** por el hecho de que el colágeno glicado es de origen bovino.
- 20 6. Equivalente de dermis de edad según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** por el hecho de que el colágeno glicado es colágeno del tipo I.
7. Equivalente de dermis de edad según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** por el hecho de que los fibroblastos son de origen humano.
- 25 8. Equivalente de epidermis que comprende al menos queratinocitos, **caracterizado** por el hecho de que es susceptible de ser obtenido por simiente de al menos queratinocitos sobre un equivalente de dermis, tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y por el hecho de que presenta una expresión de interina $\beta 1$ en las células de al menos las tres primeras capas suprabasales.
- 30 9. Equivalente de dermis de edad según la reivindicación 8, **caracterizado** por el hecho de que los queratinocitos son de origen humano.
10. Equivalente de dermis de edad según una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, **caracterizado** por el hecho de que comprende, además, melanocitos y/o células de Langerhans y/o precursores de células de Langerhans.
- 35 11. Equivalente de piel de edad, **caracterizado** por el hecho de que comprende al menos un equivalente de epidermis y un equivalente de dermis de edad, tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 40 12. Equivalente de piel de edad, según la reivindicación 12, **caracterizado** por el hecho de que comprende un equivalente de epidermis, tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.
- 45 13. Procedimiento de preparación de un equivalente de piel de edad, que comprende un equivalente de epidermis y un equivalente de dermis de edad, que comprende un látex que comprende al menos colágeno glicado y fibroblastos, **caracterizado** por el hecho de que en una primera etapa se prepara un látex que comprende al menos colágeno glicado y fibroblastos, siendo glicado dicho colágeno previamente a la formación del látex, y por el hecho de que en una segunda etapa se reconstituye sobre el látex obtenido en la primera etapa un equivalente de epidermis que comprende al menos queratinocitos.
- 50 14. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado** por el hecho de que la glicación se obtiene por la puesta en presencia de una solución de al menos un colágeno y de una solución de al menos un agente de glicación con el fin de inducir la reacción de glicación *in vitro* en ausencia de células.
- 55 15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, **caracterizado** por el hecho de que el colágeno es colágeno de origen humano o animal.
16. Procedimiento según la reivindicación 15, **caracterizado** por el hecho de que el colágeno es colágeno de origen animal.
- 60 17. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, **caracterizado** por el hecho de que el colágeno es colágeno de origen bovino.
18. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, **caracterizado** por el hecho de que el colágeno está elegido entre los colágenos de tipo I, III o V.
- 65 19. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, **caracterizado** por el hecho de que el colágeno es colágeno de tipo I.

ES 2 292 412 T3

20. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, **caracterizado** por el hecho de que el colágeno es colágeno bovino de tipo I.

5 21. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, **caracterizado** por el hecho de que el colágeno está en una concentración comprendida entre 2 mg/ml y 6 mg/ml y con preferencia entre 3 mg/ml y 5 mg/ml.

10 22. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 21, **caracterizado** por el hecho de que el agente de glicación es un agente que permite la glicación, es decir, que es capaz de reaccionar según la reacción de Maillard con un grupo aminado del colágeno para formar una base de Schiff.

23. Procedimiento según la reivindicación 22, **caracterizado** por el hecho de que el agente de glicación está elegido entre la glucosona, la 3-deoxiglucosona, el glioxal, el metil-glioxal o incluso los azúcares.

15 24. Procedimiento según la reivindicación 23, **caracterizado** por el hecho de que el agente de glicación es un azúcar.

20 25. Procedimiento según la reivindicación 24, **caracterizado** por el hecho de que el azúcar está elegido entre las osas.

26. Procedimiento según la reivindicación 25, **caracterizado** por el hecho de que la osa esté elegida entre la ribosa, la fructosa o la glucosa.

25 27. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 26, **caracterizado** por el hecho de que el agente de glicación está elegido entre la ribosa o la glucosa.

28. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 27, **caracterizado** por el hecho de que la cantidad de agente de glicación está comprendida entre 0,5% y 20%, de una manera preferida entre 1% y 10% en peso del peso total de la solución de colágeno.

30 29. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 28, **caracterizado** por el hecho de que la reacción de glicación se realiza a una temperatura comprendida entre 15°C y 30°C, con preferencia entre 20°C y 25°C.

35 30. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 29, **caracterizado** por el hecho de que la duración de la reacción de glicación está comprendida entre 15 días y 2 meses, con preferencia entre 25 y 35 días.

40 31. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 30, **caracterizado** por el hecho de que el colágeno es una mezcla de colágeno preglicado y de colágeno no glicado.

32. Procedimiento según la reivindicación 31, **caracterizado** por el hecho de que la relación entre el colágeno glicado y el colágeno no glicado está comprendida entre 25 y 75 y con preferencia entre 45 y 55.

45 33. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 32, **caracterizado** por el hecho de que los queratinocitos utilizados según la invención son de origen humano.

34. Utilización *in vitro* de un equivalente de dermis de edad tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la preparación de equivalente de epidermis y/o de piel de edad.

50 35. Utilización *in vitro* de un equivalente de dermis de edad, tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para el estudio del fenómeno de glicación en sí mismo así como de los moduladores (inhibidores o activadores) de este fenómeno, el estudio del foto-envejecimiento y del efecto de las radiaciones ultravioletas sobre la dermis así como de los moduladores de estos efectos (compuestos y/o composiciones de protecciones, filtros, etc.) o el estudio de la influencia de la glicación sobre los componentes de la dermis.

55 36. Utilización *in vitro* de un equivalente de dermis de edad, tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para el estudio del fenómeno de glicación en sí mismo así como de los moduladores (inhibidores o activadores) de este fenómeno, el estudio de los fenómenos ligados a la epidermis de edad como por ejemplo de las arrugas, el estudio de los moduladores (compuestos aislados y/o composiciones) de la aparición de las arrugas (inhibidores particularmente), el estudio del fotoenvejecimiento y del efecto de las radiaciones ultravioletas sobre la epidermis así como de los moduladores de estos efectos (compuestos y/o composiciones de protecciones, filtros, etc.), el estudio de la influencia de la glicación sobre los componentes de la epidermis y los anexos de la piel.

65 37. Utilización *in vitro* de un equivalente de piel de edad, tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, para el estudio del fenómeno de glicación en sí mismo así como de los moduladores (inhibidores o activadores) de este fenómeno, el estudio de los fenómenos ligados a la piel de edad y/o la epidermis de edad como por ejemplo de las arrugas, el estudio de los moduladores (compuestos aislados y/o composiciones) de la aparición

ES 2 292 412 T3

de las arrugas (inhibidores particularmente), el estudio del fotoenvejecimiento y del efecto de las radiaciones ultravioletas sobre la piel y/o la epidermis así como de los moduladores de estos efectos (compuestos y/o composiciones de protecciones, filtros, etc.), el estudio de la influencia de la glicación sobre los componentes de la epidermis y los anexos de la piel y/o de la dermis y/o de la epidermis (pelos y/o cabellos, vasos sanguíneos, fibras nerviosas, etc.) y en el campo terapéutico el estudio de las complicaciones causadas por la diabetes a través de la glicación.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 292 412 T3

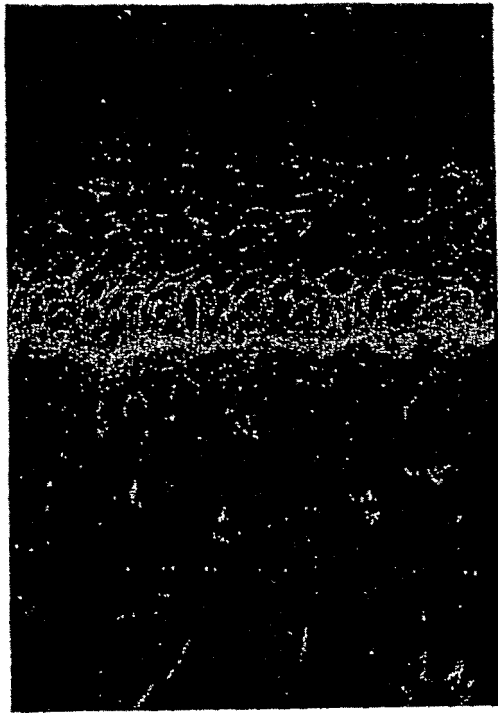


FOTO 1

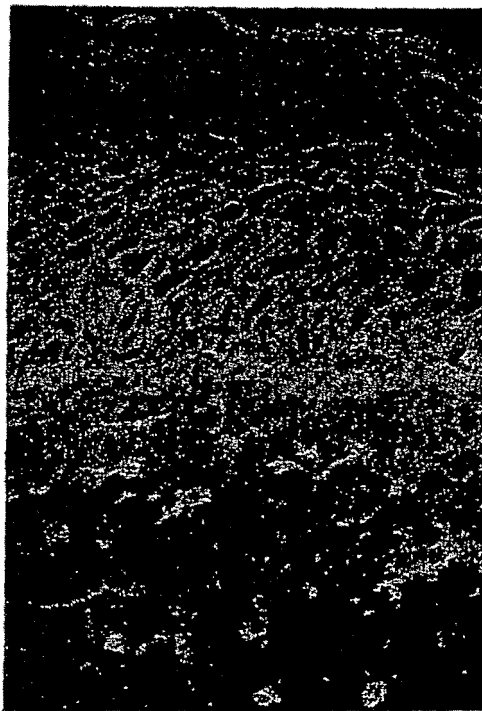


FOTO 2