(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 549 055**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)
A61L 27/60 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2009 E 12150985 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2447357**

(54) Título: **Métodos para producir microfolículos pilosos y papilas de novo y su uso para ensayos in vitro e implantaciones in vivo**

(30) Prioridad:

28.03.2008 EP 08153596

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.10.2015

(73) Titular/es:

TECHNISCHE UNIVERSITÄT BERLIN (100.0%)
Strasse des 17. Juni 135
10623 Berlin, DE

(72) Inventor/es:

LINDNER, GERD y
LAUSTER, ROLAND

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 549 055 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

Métodos para producir microfolículos pilosos y papilas *de novo* y su uso para ensayos *in vitro* e implantaciones *in vivo*

La presente invención se refiere a un método para producir microfolículos pilosos por co-cultivo de las papilas *de novo* con otra población celular del folículo piloso en los recipientes para cultivo de adhesión ultra-baja. La invención también se refiere a un método para producir papilas *de novo* utilizables en un método para producir microfolículo piloso. Son objeto de la invención también los microfolículos pilosos y las papilas *de novo* producidas por los métodos mencionados. Los microfolículos pilosos y/o las papilas *de novo* se pueden usar como implantes para tratar condiciones de cabello reducidas y para el ensayo *in vitro* de los efectos moduladores del cabello o los efectos tóxicos de sustancias.

Debido a la función crítica que desempeña el cabello en la comunicación humana no verbal, un individuo afectado demanda invariablemente ayuda cuando disminuye el crecimiento del cabello. El último tratamiento es, por supuesto, restablecer o regenerar folículos pilosos cíclicos, sanos, nuevos. Hasta muy recientemente, la medicina no podía ofrecer tratamientos válidos a estos pacientes. A finales del siglo veinte, se comercializaron diversos fármacos que, sin embargo modestamente e inconsecuentemente, estimulaban el crecimiento del cabello. Son ejemplos minoxidil, finasteride y latanoprost. La compleja sincronización y los cambios de expresión de los genes de myriad requeridos para la orquestación del desarrollo y la ciclación de folículo piloso es probable que impidan una solución farmacéutica simple al tratamiento de la alopecia avanzada. Por consiguiente, sus efectos quedan muy lejos del objetivo último de generar nuevos folículos pilosos en el cuero cabelludo calvo. Aprovechando los tipos de células que se conoce cómo forman un folículo piloso, los tratamientos con base celular llegarán a la clínica más pronto que la solución puramente molecular.

Una solución al tratamiento con base celular de folículo piloso implicaría eliminar un pequeño número de folículos pilosos, aislar células competentes y/o inductivas de los mismos y extender después esas células ex *vivo* al tiempo que mantener su especial capacidad para generar nuevos folículos pilosos. Claramente, las condiciones del cultivo celular que mantienen la capacidad inductiva de las células dérmicas del folículo y la competencia de las células epiteliales del folículo piloso son necesarias antes de que se pueda desarrollar cualquier tipo de tratamiento con base celular para la alopecia. Como estudios recientes demostraron que la propiedad inductiva de las células dérmicas disminuye con el tiempo *in vitro,* la investigación se ha centrado en mantener las propiedades tricogénicas de las células de folículo piloso en el cultivo. La mayor parte del progreso reciente ha resultado de avances en la metodología de cultivo para folículos pilosos intactos y sus componentes celulares. Las células de folículo piloso humanas desarrolladas en cultivo incluyen fibroblastos de papila folicular, queratinocitos de envoltura externa de la raíz (ORS, por sus siglas en inglés) y células epidérmicas germinativas de la matriz del cabello (Tobin et al., J. Invest. Dermatology 104 (1), 86-88, 1.995).

El objetivo de los esfuerzos de la bioingeniería actual es generar o reconstituir sistemas de órganos completamente organizados y funcionales partiendo de células disociadas que se han propagado en condiciones de cultivo de tejido definidas. Desde hace tiempo se ha reconocido que el folículo piloso presenta una profunda capacidad regenerativa, porque se cicla por la duración de la vida del individuo y reproduce su medio ciclo inferior después del ciclo. Los fibroblastos de las papilas pilosas dérmicas y la envoltura de tejido conjuntivo son de tipo hemocitoblasto en naturaleza y presentan propiedades de inducción del crecimiento del cabello específicas. El folículo piloso se vuelve a formar mediante interacciones entre hemocitoblastos epiteliales competentes y células dérmicas poderosamente inductivas durante su ciclo de crecimiento. Es posible reconstituir un folículo piloso completo de hemocitoblastos epiteliales y mesenquimales de folículos pilosos.

Las principales estimulaciones que se requiere estudiar con cualquier tipo de tratamiento basado en células para la alopecia incluyen la eficacia de la formación de folículo piloso y la elección del tipo de célula, que se resume por Stenn & Cotsarelis, Curr. Opinion Biotech. 16, 493-497, 2.005. Para la bioingeniería del folículo piloso, se podía empezar con elementos dérmicos de folículos disociados con o sin células competentes del folículo u otras fuentes epiteliales. El número de células disociadas se extendería en el cultivo y después las células dérmicas solas, o junto con células epiteliales competentes, se volverían a introducir en el cuero cabelludo alopécico. Los estudios previos han demostrado que partir de células dérmicas inductoras colocadas correctamente dará como resultado la formación de nuevo folículo. Por otra parte, partir de una combinación de células epiteliales y dérmicas tricogénicas, disociadas o agregadas, también ha demostrado ser una manera eficaz de producir nuevos folículos pilosos.

Los primeros intentos en las soluciones basadas en células para tratar la alopecia son probablemente usar tejido autólogo para bioingeniería de folículos pilosos para evitar el rechazo inmunológico de las células donadoras. Sin embargo, existe la interesante posibilidad de que se pueda desarrollar tejido de folículo piloso heterólogo (alogénico) para trasplante de tejido, basado en el concepto de que el folículo piloso es un sitio inmuno-privilegiado que no expresa antígenos de clase I MHC (complejo principal de histocompatibilidad, por sus siglas en inglés). Sin embargo, el ensayo de seguridad y los obstáculos reguladores para este tipo de solución requerirían enormes recursos financieros.

Otra posible solución para los folículos pilosos de bioingeniería implica formar en realidad folículos pilosos como miniórganos *in vitro* y trasplantar después los folículos recién generados de nuevo en el cuero cabelludo alopécico. Se conoce a partir de la patente alemana DE 101 62 814 B4 que se puede producir un equivalente de piel y cabello proporcionando una pseudodermis o una preparación de pseudodermis, así como pseudopapilas que comprenden células de papilas dérmicas cultivadas sobre un portador adecuado o en una matriz adecuada o precursores de pseudopapilas que comprenden células de papilas dérmicas cultivadas en un medio formador de matriz adecuado, capaz de formar una matriz *in situ* e introducir las pseudopapilas o el precursor de las pseudopapilas en la pseudodermis o preparación de pseudodermis. Esta clase de solución requeriría un sistema de cultivo de células mucho más complicado implicando matrices tridimensionales, quizá embebidas con factores de crecimiento apropiados, para permitir que células tanto dérmicas como epidérmicas se diferencien hacia la estructura tridimensional de un folículo piloso normal. En particular, la estructura de la papila sólo se obtiene formando cavidades, tal como por punzonado o pinchazo, en dicha pseudodermis y poniendo dichas pseudopapilas en las mismas, que están conformadas para que sus dimensiones correspondan a las cavidades formadas en los PD. La solución carece de disposición voluntaria de las células en la estructura de papila fisiológica aproximada, así como contactos directos con las células.

Se ha mostrado recientemente otro método para producir una población de hemocitoblastos multipotentes o progenie de los mismos, que proceden de un folículo piloso o una porción que contiene papilas dérmicas del mismo. El método de la patente internacional WO 2005/071063 A1 comprende el cultivo de dicho folículo piloso o porción que contiene papilas dérmicas en condiciones bajo las cuales crecen hemocitoblastos multipotentes y proliferan sin adherirse. No se obtienen papilas dérmicas por este procedimiento, sino los hemocitoblastos multipotentes aislados usados directamente para inducir el crecimiento del cabello o la regeneración de piel en un mamífero. Sin embargo, también se reconoce en este documento que se forma una cierta cantidad de células adherentes como se confirma en la patente internacional WO 2005/113747 A2, que describe un método para producir agregados multicelulares a partir de al menos dos tipos de hemocitoblastos adultos multipotentes o pluripotentes por cultivo en condiciones estéricas. En el momento presente, los cuerpos organoides están restringidos a los hemocitoblastos mencionados reunidos de tejido glandular exocrino.

Se describen otros métodos y modelos para el crecimiento del cabello en la patente internacional WO 2004/113514 y la patente de EE. UU. 2005/0233450.

Por lo tanto, el problema técnico que forma la base de la presente invención es evitar las desventajas mencionadas de la técnica anterior y proporcionar un método para generar folículo piloso reconstruido y papilas que se disponen libremente y fácilmente en el tamaño y la forma de una DP fisiológica. Otro problema estudiado por la presente invención es encontrar un equivalente de cabello o sustituto de la piel, que fuera adecuado como modelo *in vitro*, más en particular para ensayar y/o evaluar sustancias activas, lo más en particular en el folículo piloso.

La presente invención resuelve el problema proporcionando una papila *de novo* y un microfolículo piloso como se definen en las reivindicaciones.

Se describe un método para producir microfolículo piloso de mamífero que comprende las etapas de:

(a) proporcionar al menos una papila *de novo*,

(b) proporcionar al menos otra población celular seleccionada del grupo de fibroblastos, queratinocitos y melanocitos y

(c) co-cultivar la papila *de novo* con al menos otra población celular en condiciones de cultivo no adherente.

Los términos "papilas *de novo*" o "neopapilas" se usan indistintamente en la presente memoria e indican agregados celulares de fibroblastos de papilas pilosas dérmicas de mamífero (DPF), que presentan al menos la mitad del tamaño y aproximadamente la forma de una papila dérmica fisiológica (DP) de un folículo piloso después de aislamiento. Las papilas de novo de la invención comprenden un recubrimiento que comprende una o múltiples proteínas de matriz extracelular diferentes, preferiblemente colágeno IV, fibronectina y/o laminina.

Los términos "microfolículo" y "neofolículo" se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a una estructura de folículo piloso de mamífero incompleta que consta del andamiaje celular dérmico, pero que carece de otros tipos de células, tales como células musculares, nervios, vasos sanguíneos, etc., dando como resultado un tamaño reducido si se compara con el folículo natural. Un microfolículo de la presente invención consta de una papila de novo de la presente invención que se recubre de manera estable o se forman colonias mediante células de al menos otra población celular seleccionada del grupo de fibroblastos, queratinocitos y/o melanocitos. Los fibroblastos, queratinocitos y/o melanocitos no tienen que proceder de un folículo piloso de mamífero, sino que pueden proceder de otros tejidos de mamífero. Preferiblemente un microfolículo de la presente invención consta de una papila de novo que se recubre de manera estable o se forman colonias mediante células de al menos otra población celular, que deriva y/o procede de un folículo piloso de mamífero, por ejemplo seleccionada del grupo de

fibroblastos de la envoltura del tejido conjuntivo, queratinocitos y/o melanocitos. La forma tridimensional de dicho microfolículo imita el aspecto tridimensional de un folículo piloso de mamífero fisiológico. Los microfolículos se pueden conformar en particular de manera tridimensional, delimitar espacialmente opcionalmente, reconstruir papilas de novo con estructuras de tipo folículo en la superficie de las papilas de novo, incluyendo las reminiscentes de la fase más temprana de morfogénesis del cabello y que comprende células de la papila dérmica.

Se describe un método para producir microfolículos pilosos, que comprende múltiples etapas.

Estas etapas comprenden la provisión de papilas de novo. Según la invención, las papilas de novo que se proporcionan se han producido según uno de los métodos para producción de papilas de novo según la invención descrita más adelante.

Las etapas comprenden además la proporción de otras poblaciones celulares. La otra población celular puede derivar de un folículo piloso de mamífero, preferiblemente del mismo folículo piloso que se usa para la preparación de DP y co-cultivar las papilas *de novo* con al menos otra población celular en recipientes para cultivo no adherente. Al menos 4 poblaciones celulares diferentes, es decir, las DPF, fibroblastos de envoltura del tejido conjuntivo (CTSF), queratinocitos (KC) y melanocitos (MC), se pueden aislar de un folículo piloso de mamífero de una manera definida, cultivar por separado en condiciones estándar y multiplicar con posterioridad. También es posible formar cultivos celulares con viabilidad a largo plazo a partir de estos aislados y ponerlos para uso, por ejemplo para métodos de identificación sistemática.

Las otras poblaciones celulares se seleccionan del grupo de fibroblastos, queratinocitos y melanocitos. Los fibroblastos, queratinocitos y/o melanocitos no tienen que proceder de un folículo piloso de mamífero, pero pueden derivar de otros tejidos de mamífero. Los fibroblastos proceden preferiblemente de envoltura de tejido conjuntivo.

Preferiblemente, al menos otra población celular es derivable y/o deriva de un folículo piloso de mamífero, que se selecciona del grupo de fibroblastos de la envoltura de tejido conjuntivo, queratinocitos y/o melanocitos.

Es otra realización preferida de la presente invención que las papilas *de novo* sean co-cultivadas con queratinocitos al menos. Los queratinocitos se enriquecen para neogénesis de microfolículo básica. Es aún otra realización preferida de la invención que los queratinocitos y melanocitos se proporcionen simultáneamente al cultivo de la papila. La adición de melanocitos es especialmente útil para investigaciones de pigmentación capilar, o para el fin de futuro implante con un color de cabello deseado. Los otros componentes celulares extendidos por separado se pueden añadir a un recipiente de cultivo celular no adherente descrito más adelante para el método de producción de papilas de novo, tal como los recipientes para cultivo de adhesión ultra-baja, en que las neopapilas ya se han producido. Los queratinocitos o mezclas de queratinocitos y melanocitos se añaden a las neopapilas recubiertas en una relación de mezcla específica y se incuban con un medio adecuado en los recipientes para cultivo no adherente durante varios días. Son relaciones preferibles KC a MC 2:1, 5:1, 10:1 ó 20:1. El co-cultivo dura al menos 12 horas, preferiblemente entre 1 día y 5 semanas, más preferiblemente 2 días y 3 semanas, lo más preferiblemente 1 semana o sustancialmente 2 días. Para elaborar un neofolículo multicapa, que imite incluso mejor la estructura y la función del folículo piloso, se puede obtener por recubrimiento el neofolículo generado con CTSF durante un periodo de tiempo definido seleccionado de 12 horas a 10 días, preferiblemente 1 a 5 días, lo más preferiblemente sustancialmente 2 días. En estas condiciones, la mezcla celular se desarrolla en una estructura folicular, que forma características típicas de folículo piloso, tal como el desarrollo de un tallo del cabello. La estructura de tipo órgano se refiere como microfolículo de la formación de un tallo del cabello aproximado encima.

En una realización preferida del método para producir microfolículo piloso de la invención:

(a) se proporcionan papilas de novo;

(b) se ponen en contacto papilas de novo con KC, MC o una mezcla de KC y MC con una relación predeterminada y co-cultivada en un recipiente para cultivo no adherente durante una cantidad de tiempo predeterminada;

(b') opcionalmente, se repite la etapa (b), preferiblemente en la que se usan las células de un tipo de células diferente para poner en contacto y co-cultivar las usadas en la primera serie;

(c) opcionalmente las papilas de novo recubiertas de la etapa (b) o (b') pueden ser recubiertas con una proteína de matriz extracelular, preferiblemente colágeno IV, previamente a y/o simultáneamente con la etapa (d);

(d) las papilas de novo recubiertas de la etapa (b), (b') o (c) se co-cultivan con CTSF durante una cantidad de tiempo predeterminada en un recipiente para cultivo no adherente.

Se describe un método para producir papilas de *novo* que comprende las etapas de:
(a) proporcionar al menos una papila dérmica (DP) de al menos un folículo piloso de mamífero,

(b) aislar fibroblastos de papilas pilosas dérmicas (las DPF) de la DP fijando de manera mecánica dicha DP a la superficie de un recipiente de cultivo celular, en el que la lámina basal se perfora para permitir que migren dichas DPF,

(c) extender las DPF aisladas en cultivo en monocapa sin recubrimiento de colágeno, en el que dichas DPF se hacen pasar al menos una vez,

(d) condensar las DPF extendidas en agregados celulares que presentan el tamaño y la forma del la DP fisiológica, en los que dichas DPF se diferencian en recipientes para cultivo no adherente en una concentración de células por superficie del recipiente de 1.000 a 100.000 DPF/cm^2, opcionalmente las DPF extendidas se condensan durante al menos 48 h y

(e) recubrir las papilas *de novo* con proteínas de matriz extracelular, preferiblemente colágeno IV, fibronectina y/o laminina.

Se describe un método para producir papilas *de novo* que comprende las etapas de:

(a) proporcionar al menos una papila dérmica (DP) de al menos un folículo piloso de mamífero,

(b) aislar fibroblastos de papilas pilosas dérmicas (las DPF) a partir de la DP por fijación de manera mecánica de dicha DP en la superficie de un recipiente de cultivo celular, en el que la lámina basal se perfora para permitir que migren dichas DPF,

(c) extender las DPF aisladas en cultivo monocapa sin recubrimiento de colágeno, en el que dichas DPF se hacen pasar al menos una vez,

(d) condensar las DPF extendidas en agregados celulares que presentan el tamaño y la forma de la DP fisiológica, en los que dichas DPF se diferencian en recipientes de cultivo no adhesivo en una concentración de células por superficie del recipiente de 1.000 a 100.000 DPF/cm^2 y en los que las DPF extendidas se condensan durante al menos 48 h;

(e) opcionalmente, recubrir las papilas *de novo* con proteínas de matriz extracelular, preferiblemente colágeno IV, fibronectina y/o laminina.

Es en particular la extensión de las DPF aisladas y la forma de administración fisiológica lo que representa factores limitantes al uso de estas células en la inducción de crecimiento capilar de la técnica anterior. Requiere varios ciclos de multiplicación conseguir la cantidad de células requeridas, proceso durante el cual las células cultivadas en cultivos monocapa, especialmente los de los fibroblastos de papila dérmica, pierden sus capacidades inductivas, es decir, después de 5-8 ciclos de multiplicación como se demuestra por experiencia. Las células así tratadas se desdiferencian y expresan marcadores de hemocitoblastos, pero ya no se pueden usar para generar folículos pilosos.

Se ha demostrado sorprendentemente por los autores que las células alcanzan el nivel de diferenciación y estabilización o vuelven a ganar su capacidad para inducir el crecimiento del cabello después de varios días a varias semanas en las condiciones de cultivo específicas de la invención, en las que las DPF extendidas después de cultivo celular se transfieren en concentración bien definida a recipientes para cultivo de células no adhesivo especiales. Además de volver a ganar las propiedades inductivas, se ha encontrado sorprendentemente que como resultado de los contactos célula-célula activos y el intercambio de moléculas de señalización, las células forman con posterioridad agregados celulares y se diferencian. En estas condiciones específicas, las células así tratadas se condensan en aproximadamente el tamaño y la forma correspondiente a la forma fisiológica de una papila dérmica en un folículo piloso después de aislamiento. Con este propósito, la relación de células usadas/superficie del recipiente de cultivo es de crucial importancia.

Etapa (a) previa, se toma un folículo piloso de un mamífero que es un paciente o donante. La muestra se reúne especialmente de un ser humano, roedor, cerdo, animal canino, mono, oveja, gato o perro, preferiblemente un ser humano. Se prefiere esencialmente reunir una muestra de tejido por biopsia de piel, tomada especialmente cerca de la posición de la dolencia. En la presente invención, la muestra del folículo piloso se retira preferiblemente de cabello de la cabeza, barba, cejas, vello genital u otro vello corporal. La retirada del folículo capilar sigue la buena práctica médica. La muestra se puede purificar para retirar sustancias que puedan perturbar.

La proporción de las DP de los folículos pilosos y el aislamiento de las DPF según la etapa (a) avanza en una forma recién desarrollada a partir de los protocolos estándar previos. Usando los trozos pequeños de biopsias de piel, la epidermis se escinde de la dermis subyacente y del tejido graso, por ejemplo usando un bisturí. El tejido graso se comprime ligeramente, por ejemplo usando pinzas, a fin de que los bulbos capilares situados en el mismo se preparen fácilmente bajo un microscopio de disección. Dichos folículos pilosos aislados se fijan sobre el tallo del

cabello, por ejemplo por medio de pinzas de nuevo, y la envoltura de tejido conjuntivo se separa cuidadosamente de una manera diametral, por ejemplo por medio de otro par de pinzas, a fin de que el bulbo se vuelque para exponer las DPF y el tallo del cabello con la matriz del cabello. De esta manera, la parte proximal del bulbo, junto con los fibroblastos de la envoltura de tejido conjuntivo y las papilas dérmicas se separan fácilmente de la parte restante del folículo piloso, tal como usando una aguja o cánula. También, el tallo del cabello, que incluye los queratinocitos y melanocitos de la matriz del cabello requerida asimismo, se prepara de manera óptima para cultivo adicional.

Después de eso en la etapa (b), las papilas dérmicas aisladas se transfieren a un recipiente para cultivo celular y se fija de manera mecánica a la superficie del recipiente. Preferiblemente, las DPF se obtienen por limitación de manera mecánica de la papila dérmica aislada en el fondo del recipiente para cultivo usando una punta de alfiler o bisturí más bien que someterlas a una separación enzimática. Se prefiere incubar 1 a 8 DP por recipiente para cultivo. En particular, se transfieren 2 a 4 DP a cada pozo de placas de cultivo de 6 pozos o de 12 pozos, por ejemplo, y se fijan en el fondo de la placa. Como resultado, la lámina basal se perfora ligeramente, pero la morfología de la papila se mantiene aproximadamente y las DPF pueden migrar de la papila dérmica y proliferar.

El cultivo de las DPF en la etapa (c) se efectúa sin recubrimiento de colágeno en medio estándar, preferiblemente incluyendo una cantidad reducida de suero fetal de ternera (FCS), por ejemplo 10 % a diferencia de FCS al 20% convencional y enriquecido adicionalmente con antibióticos, tal como penicilina/estreptomicina 1x. Después de aislamiento, el primer cambio de medio se efectúa preferiblemente después de 1 semana como lo más pronto, pero después de 2 semanas como lo más tarde. Tan pronto como las células crecen en la DP, el medio se puede cambiar una vez a dos a la semana, dependiendo de la densidad celular. Cuando las células alcanzan la confluencia del 70-80%, se desprenden del fondo de la placa, por ejemplo usando tripsina/AEDT a temperatura ambiente y se pasan a otros recipientes de cultivo, tales como matraces para cultivo de células T25. En el transcurso del cultivo, se pueden extender además las células para uso directo en los experimentos o congelar en nitrógeno líquido para uso futuro. Aunque el número de pases no está limitado, a fin de que las células se puedan extender a cualquier densidad alta si se da viabilidad, se prefiere que dichas DPF se pasen al menos dos veces, más preferiblemente al menos cinco veces, lo más preferiblemente menos de nueve veces. Para un procedimiento de rendimiento alto se prefieren ocho pases. Por consiguiente, en otra realización preferida de la presente invención, el método se realiza por condensación de las DPF no inductivas. Es un hallazgo inesperado que tales DPF carentes de propiedades inductivas aún se puedan usar para ingeniería de tejidos.

Después sigue la fase de condensación de la etapa (d), en la que las DPF multiplicadas, separadas, se cultivan en recipientes para cultivo no adherente con medio incluyendo componentes definidos, es decir medio de cultivo estándar. En este sistema, una superficie del recipiente especial o un recubrimiento especial de la superficie del recipiente, especialmente la superficie del fondo, reduce la adhesión de las células o incluso evita que se adhieran las células a la superficie. Preferiblemente, los recipientes de cultivo no adhesivo se fabrican de vidrio, poliestirol y/o una superficie tratada con una capa anti-adhesión. Más preferiblemente, una superficie recubierta con PTFE o poli-HEMA se aplica en los recipientes. El uso de recipientes para cultivo de adhesión ultra-baja se prefiere en particular en el alcance de la invención, que se distribuyen por ejemplo por Corning, Inc., USA. Dichos recipientes y recubrimientos no adherentes son conocidos para el experto y se pueden adquirir fácilmente o fabricar.

Como resultado del contacto libre, los agregados celulares en un tamaño definido, formando agregados después de varios días que se parece a la papila original en tamaño y forma. Las DPF extendidas se condensan preferiblemente durante al menos 48 horas, 2 a 5 días, más preferiblemente durante 2 a 3 días, lo más preferiblemente sustancialmente 2 días y opcionalmente además se cultivan durante 3 a 15 días, preferiblemente durante 5 a 10 días o 2 a 21 días. El tamaño y la forma de los condensados que se forman depende asimismo de la región en que se han retirado las biopsias de piel. Las DPF, que se retiran de barba, vello corporal, cejas, vello genital o cabello de la cabeza y se someten a extensión forman agregados celulares de diferente tamaño, que a su vez determinan la forma, el tamaño y la longitud del cabello, respectivos. Incluso es más crucial el número de células inicial cuando se inocula en el recipiente, que tiene que estar en la proporción debida a la superficie del recipiente. En otra realización del método, la concentración de células por superficie del recipiente asciende a 2.000 a 50.000 DPF/cm^2 en la etapa (d), preferiblemente 3.000 a 20.000 DPF/cm^2, más preferiblemente 5.000 a 10.000 DPF/cm^2, lo más preferiblemente sustancialmente 6.666 DPF/cm^2.

En esta fase, ya se ha formado una matriz autoproducida alrededor del condensado. Para acelerar este procedimiento y ejercer influencia en el mismo de una manera fijada como objetivo, se añaden componentes de la matriz fisiológica al medio en este momento para formar una cápsula que imite las propiedades de una papila dérmica. En la etapa (e) del procedimiento posterior, las papilas *de novo* así obtenidas se recubren con una composición de proteínas de matriz extracelular. Esta composición se hace de manera que se imiten las fisiológicas. Puede constar preferiblemente de colágeno IV, fibronectina y/o laminina. Se prefiere en particular que las proteínas de matriz extracelular sean una mezcla de colágeno IV, fibronectina y laminina en partes de 2-6 : 0,5-2 : 0,5-2 partes en peso, lo más preferiblemente con una relación de sustancialmente 4 : 1 : 1,15 partes en peso. No se excluye, sin embargo, que las proteínas de matriz extracelular mencionadas también se puedan usar individualmente o con porcentajes en volumen variables o combinadas con otras matrices. En otra realización de la invención, las proteínas de matriz extracelular comprenden adicionalmente otros colágenos (por ejemplo 1, 10 A1, 18 A1),

glucosaminoglucanos y/o proteoglucanos, preferiblemente heparán sulfato, decorina, queratán sulfato, biglucano, agrecano, versicano, perlecano, CD44v3 y/o sindecano. De nuevo, dicho recubrimiento de las neopapilas se realiza en un recipiente de cultivo celular mínimamente adhesivo, por ejemplo recipientes de cultivo celular de adhesión ultra-baja. El recubrimiento se realiza durante 1 a 5 días, preferiblemente durante 1 a 2 días.

La presente invención se refiere a las papilas *de novo* y los microfolículos pilosos obtenibles por los procedimientos según la invención. La explicación previa de la presente memoria descriptiva acerca de los métodos para producir neopapilas y microfolículos, respectivamente, se considera válida y aplicable sin restricciones a los productos de los métodos de producción si es oportuno.

Tanto las papilas *de novo* como/o los microfolículos pilosos de la invención se pueden usar para la producción de equivalentes de piel. Preferiblemente, se construyen los equivalentes de piel, tal como usando Matriderm (Dr. Suwelack Skin & Health Care AG), según métodos estándar y los sitios de inserción para los microfolículos se cortan a intervalos regulares por medio de un láser de 2 fotones o se perfora previamente con un sacabocados. Por consiguiente, equivalentes de piel que comprenden las papilas *de novo* y/o los microfolículos pilosos de la invención son otro objeto de la invención. Además de las papilas dérmicas reconstruidas, comprenden una o más capas de queratinocitos, que pueden formarse en una estructura epidérmica o estructura peridérmica y opcionalmente una o más capas de melanocitos, que se puede aplicar sobre la estructura de las papilas dérmicas.

Las papilas *de novo* y/o los microfolículos pilosos según la invención también se pueden usar como implantes. Por lo tanto, otro objeto más de la invención es un implante que comprende como ingrediente activo una cantidad eficaz de las papilas *de novo* de la invención y/o los microfolículos pilosos de la invención, opcionalmente junto con adyuvantes farmacéuticamente tolerables.

De manera similar, el equivalente de piel de la invención se puede usar como trasplante. Otro objeto más de la invención es proporcionar un trasplante que comprende como ingrediente activo una cantidad eficaz del equivalente de piel de acuerdo con la invención, opcionalmente junto con adyuvantes farmacéuticamente tolerables.

La expresión “cantidad eficaz” denota una cantidad del implante o trasplante, respectivamente, que ejerce un efecto profiláctica o terapéuticamente relevante sobre una enfermedad o afecciones patológicas. Un efecto profiláctico evita la aparición de una enfermedad o incluso la infección por un patógeno tras la infiltración de ejemplares individuales de modo que la subsecuente propagación del patógeno disminuye considerablemente o incluso se inactiva por completo. Un efecto terapéuticamente relevante alivia en cierta medida uno o más síntomas de una enfermedad o reinstaura la normalidad, ya sea parcial o completamente, de uno o más parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados con la enfermedad o afecciones patológicas o causantes de estas. La cantidad respectiva para la administración del implante o trasplante, respectivamente, es suficientemente elevada para conseguir el efecto profiláctico o terapéutico deseado de reducir los síntomas de una cantidad reducida de cabello. Se sobreentenderá que el nivel de dosis, la frecuencia y el periodo de administración específicos para un mamífero particular dependerán de varios factores que incluyen la actividad de los componentes específicos empleados, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el periodo de administración, la vía de administración, la combinación de fármacos y la rigurosidad de la terapia específica. Utilizando medios y métodos muy conocidos, un experto en la técnica puede determinar la cantidad exacta como una cuestión de experimentación rutinaria.

Los implantes o trasplantes de la invención se producen de un modo conocido utilizando portadores sólidos o líquidos comunes, diluyentes y/o aditivos y adyuvantes habituales para la ingeniería farmacéutica y con una cantidad adecuada dependiendo del modo de aplicación deseado. Estos excipientes farmacéuticamente aceptables comprenden sales, tampones, rellenos, agentes quelantes, antioxidantes, disolventes, agentes adhesivos, lubricantes, recubrimientos, aditivos, conservantes y agentes de suspensión. En el contexto de la invención, un “adyuvante” denota cada sustancia que estimula, intensifica o modifica una respuesta específica del cuerpo como resultado de la implantación o el trasplante si se administran de forma simultánea, contemporánea o secuencial. La cantidad de material excipiente que se combina con el ingrediente activo para producir una forma farmacéutica unitaria varía dependiendo del huésped tratado y el modo de administración particular.

Dependiendo de la forma de introducción, el implante o trasplante, respectivamente, se puede formular de varias formas. La concentración de ingredientes terapéuticamente activos en la formulación puede variar entre aproximadamente un 0.1 y un 100% en peso. Se pueden administrar solos o combinados con otros tratamientos.

La invención también se refiere a papilas *de novo*, microfolículos pilosos y/o equivalentes de piel de acuerdo con la invención para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una afección de cantidad reducida de cabello. Los productos mencionados anteriormente de los métodos de la invención se utilizan preferiblemente para el tratamiento terapéutico. Un efecto terapéuticamente relevante alivia en cierta medida uno o más síntomas de una cantidad reducida de cabello o reinstaura la normalidad, ya sea parcial o completamente, de uno o más parámetros fisiológicos asociados con las afecciones patológicas o causantes de estas. La monitorización se considera un tipo de tratamiento siempre que los productos de los métodos de la invención se administren en intervalos diferentes, p. ej., para fomentar la respuesta de proliferación y erradicar los síntomas de la afección por completo. Se pueden

aplicar productos idénticos o productos diferentes. En el contexto de la invención, se recomienda el tratamiento profiláctico si el sujeto tiene predisposición a comenzar a perder cabello, tal como una predisposición familiar, un defecto genético o una enfermedad sufrida previamente.

Las afecciones patológicas de una cantidad reducida de cabello, en lo que concierne a la invención, pueden ser el resultado de la alopecia (p. ej., alopecia androgenética, alopecia areata, etc.), calvicie hereditaria, cicatrización, quemaduras, radioterapia, quimioterapia, pérdida de cabello relacionada con una enfermedad, lesión accidental, daño al folículo piloso, traumatismo quirúrgico, una herida incisional o una herida en una zona donante para un trasplante de piel.

La invención también se refiere al uso de las papilas *de novo*, microfolículos pilosos y/o equivalentes de piel de acuerdo con la invención para la producción de un implante o trasplante, respectivamente, para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una afección de una cantidad reducida de cabello. El implante y el trasplante se pueden administrar para prevenir el inicio de la pérdida de cabello de un mamífero, preferiblemente un individuo humano, y el problema resultante con antelación o para tratar los síntomas resultantes y continuos.

Es otro objeto de la invención proporcionar un método para tratar una afección de una cantidad reducida de cabello, donde las papilas *de novo*, microfolículos pilosos y/o equivalentes de piel de acuerdo con la invención se incorporan en la piel de un mamífero que necesita dicho tratamiento. Los folículos microorganoides, especialmente los precursores de folículos pilosos humanos autólogos/alogénicos, se utilizan para la implantación con la intención de inducir el crecimiento del cabello, mientras que los sustitutos de piel regeneran la piel, preferentemente el cuero cabelludo. Los folículos microorganoides se incorporan en los orificios de los folículos pilosos miniaturizados previamente depilados (istmos) de zonas de piel afectadas. Preferiblemente, las papilas *de novo* y los microfolículos pilosos se inyectan, más preferiblemente por medio de un dispositivo diseñado especialmente con un tamaño de aproximadamente 150 µm. También se prefiere que todos los componentes se utilicen de un modo autólogo y se traten en condiciones de GLP/GMP. Las neopapilas, microfolículos pilosos o compartimentos de los folículos pilosos estimulan un nuevo desarrollo del crecimiento del cabello, tal como en casos de calvicie hereditaria, cicatrización (quemaduras), pérdida de cabello relacionada con una enfermedad, pérdida de cabello inducida por quimioterapia/radiación y similares tal como ya se ha descrito previamente en el curso de la presente memoria descriptiva. La maduración de los microfolículos a folículos pilosos que tienen viabilidad a largo plazo es favorecida por el micromedio, es decir, el folículo piloso distal permanente.

La invención también se refiere al uso de los productos mencionados anteriormente para la evaluación farmacológica y cosmética *in vitro* directa de sustancias, que ejercen un efecto modulador del cabello. Los efectos moduladores del cabello se seleccionan especialmente del grupo del crecimiento del cabello, la forma del cabello, la estructura del cabello, el color del cabello y la pigmentación del cabello. Se prefiere analizar el efecto de la modificación del crecimiento del cabello - con la intención de fomentar el crecimiento del cabello en casos de pérdida de cabello, tales como los provocados por la alopecia, así como inhibir el crecimiento del cabello en casos de un crecimiento del cabello no deseado excesivo, tales como los provocados por la hipertricosis y/o hirsutismo, o el crecimiento del vello de la cara en mujeres o de cabello corporal no deseado. En particular, el uso de un método de alto rendimiento permite a las industrias farmacéutica y cosmética evaluar de forma efectiva sustancias nuevas o existentes para determinar un efecto modulador del crecimiento del cabello potencial. Las sustancias comprenden agentes farmacéuticos, agentes cosméticos, compuestos químicos, compuestos poliméricos, factores de crecimiento, productos celulares, biomoléculas y/o células vivas. Además, cuando se añaden melanocitos, es decir, las células formadoras de pigmentos, a los microfolículos, es posible investigar los efectos de las sustancias sobre la pigmentación y/o la coloración del tallo del cabello que se esté formando. Asimismo, se puede evaluar el efecto de las sustancias sobre la forma del cabello y la estructura del cabello, p. ej., la formación de rizos, etc.

Se puede evaluar o medir las siguientes variables de valoración para obtener información sobre la efectividad de sustancias en lo que respecta a una mejora en la estructura del cabello y su influencia sobre el crecimiento del cabello: análisis de la formación del tallo del cabello, crecimiento en longitud y características del tallo del cabello, análisis de la matriz del cabello, el volumen y la estructura de la papila dérmica, medición de la proliferación (p. ej., expresión de Ki67, incorporación de BrdU, etc.), medición del apoptosis (p. ej., TUNEL, ensayos enzimáticos, medición de anexinas, etc.), análisis de marcadores diferenciales (p. ej., inmunohistología, hibridación *in situ*, RT-PCR, etc.), determinación de la fosfatasa alcalina como marcador de DPF, análisis de ciertas proteínas específicas para el cabello (p. ej., queratinas específicas para el cabello, etc.), análisis de citocinas, factores de crecimiento, quimiocina y todos los tipos de sustancias mensajeras formadas, entre otras, por la papila dérmica (p.ej., mediante BioPlex, ELISA, etc.) y/o proteomas, o análisis de la expresión de proteínas matriciales, factores de crecimiento (p. ej., MSP, HGF, CTGF, etc.), factores de transcripción, moléculas de la vía de wnt (p. ej., DKK1, BMP2-4, etc.), interleucinas (p. ej., IL-6, etc.) y/o quimiocinas/receptores de quimiocinas (p. ej., CXCR, etc.), que exhiben una apariencia mejorada, así como moléculas inductoras del apoptosis y/o moléculas estimuladoras de la proliferación, que exhiben una apariencia reducida. La influencia sobre la pigmentación del cabello se puede medir por medio de la ordenación/migración de melanocitos, formación/distribución de gránulos de melanina, y la actividad de tirosinasa y/o análisis matricial de la expresión de genes que intervienen en la síntesis de melanina. Otras realizaciones, modificaciones y variaciones de la presente invención serán evidentes para un experto al leer la memoria descriptiva

y se puede poner en práctica sin alejarse del alcance de la invención.

Además, las papilas *de novo* o microfolículos de la invención se pueden utilizar por separado o en conexión con la generación de equivalentes de piel con folículos pilosos, para la evaluación farmacológica y toxicológica *in vitro* de sustancias en el campo de la medicina, farmacia y el culto a la belleza. Dicho uso, p. ej., llevado a cabo como un método de alto rendimiento, es de especial interés para las industrias farmacéutica, química y cosmética al estar obligadas a analizar sus sustancias y productos para determinar sus efectos tóxicos. Las nuevas exigencias legales requieren el reemplazo de las pruebas previas en animales por métodos de evaluación *in vitro* adecuados. Por tanto, los propios folículos, pero también los sistemas de reemplazo de piel artificial con microfolículos integrados, se pueden emplear como sistemas de identificación sistemática ideales para investigaciones toxicológicas que incluyen irritaciones, efectos genotóxicos, etc. Las estructuras del modelo de la invención pueden reemplazar por completo las pruebas en animales, así como sustituir a modelos *in vitro* menos adecuados disponibles en la actualidad, ya que los modelos de la presente permiten analizar procesos fisiológicos complejos. Tales pruebas se pueden llevar acabo exponiendo la estructura del modelo a una sustancia de interés en un biorreactor. Después de un periodo de incubación específico para la sustancia, que está comprendido en particular entre 3 minutos y 4 horas, el modelo se lava con un medio y después se analiza mediante ensayos adecuados descritos como ejemplos en el curso anterior de la memoria descriptiva.

La presente invención trata además sobre un método para la identificación sistemática de sustancias, que modulan propiedades del cabello, que comprende las etapas de proporcionar una muestra de las papilas *de novo*, microfolículos pilosos y/o un equivalente de piel de acuerdo con la invención, dividir la muestra respectiva en porciones, incubar al menos una porción con sustancias que se han de someter a identificación sistemática y comparar parámetros de propiedades del cabello en la porción con otra porción que no incuba con las sustancias. Resumiendo, el método de la invención permite identificar y analizar sustancias, se que ejercen una influencia sobre el cabello a través de las estructuras del modelo de la invención. La muestra, que se ha de comprender que comprende un cierto número de sujetos de producto de acuerdo con la invención, se divide en múltiples porciones. Se proporcionan al menos dos subgrupos; uno se utiliza para la identificación sistemática mientras el otro sirve de control negativo. Preferiblemente, el número de partes sometidas a identificación sistemática supera el número de partes de control. Normalmente se someten numerosas porciones a una identificación sistemática de alto rendimiento. Las sustancias que se han de someter a identificación sistemática en el método de la invención no están restringidas de ningún modo. En una realización de la invención, las sustancias se seleccionan del grupo de ácidos nucleicos que incluyen ARNi, ribozimas, aptámeros, anticuerpos, péptidos, carbohidratos, polímeros, moléculas de bajo peso molecular con un peso molecular comprendido entre 50 y 1000 Da, y proteínas, preferiblemente anticuerpos, citocinas y lipocalinas. Estas sustancias suelen estar disponibles en colecciones. Se prefiere incubar un único compuesto con una porción diferente de la muestra. Sin embargo, también es posible investigar el efecto cooperativo de sustancias incubando al menos dos sustancias con una porción. Otro subgrupo de sujetos se incuba simultáneamente en ausencia de las sustancias. El proceso de incubación depende de varios parámetros, p. ej., los tipos de células y la sensibilidad de la detección, cuya optimización sigue procedimientos rutinarios con los que estarán familiarizados los expertos en la técnica. La identificación de sustancias efectivas en el contexto de la invención se realiza indirectamente, preferiblemente determinando los patrones de expresión y/o la viabilidad celular, que se alteran. La determinación se lleva a cabo en un momento específico y se correlaciona con la intensidad de la señal al principio del experimento y el control negativo. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con las pruebas adecuadas o estas se pueden diseñar fácilmente como una cuestión rutinaria.

Además, la invención se puede llevar a la práctica como un kit que comprende las papilas *de novo*, microfolículos pilosos, un equivalente de piel, un implante y/o trasplante de acuerdo con la invención, en particular para llevar a cabo los métodos de la invención para el tratamiento de una afección de una cantidad reducida de cabello o la identificación sistemática de sustancias, respectivamente. El kit de la invención puede incluir un artículo que comprende instrucciones por escrito o remite al usuario a instrucciones por escrito sobre cómo poner en práctica los métodos de la invención. Para consultar información más detallada, se puede hacer referencia a las observaciones anteriores sobre el método de tratamiento así como el método de identificación sistemática de acuerdo con la invención, que también se aplican de acuerdo con el kit de la invención.

En el alcance de la presente invención, métodos para producir papilas de novo y microfolículo piloso, que aplica la condensación de DPF extendidas en agregados celulares fisiológicos por medio de cultivo tridimensional y una cierta relación de concentración de células a superficie del recipiente, se proporciona por primera vez. Como se ve de la formación de microfolículos que producen tallo del cabello y por medio de análisis de expresión de genes y proteínas, las DPF reasumen sus propiedades inductivas originales después de condensación específica. Como las propiedades inductivas de las células se pueden restablecer durante el transcurso del método presente, el número de pases para extender las células no importa. Así, es ventajosamente posible usar números constantes y altos de células de partida y llevar a cabo un suministro controlado de medios de una manera reproducible cuando se usa cultivo tridimensional en recipientes para cultivo no adherente. Comparado con otros métodos de cultivo en 3D para experimentos de diferenciación general, tales como micromasa, cultivo de gránulos o el método de la gota colgante, las células en el sistema de cultivo de la invención no se fuerzan a entrar en contacto célula-célula, sino que se permite que se asocien individualmente para formar agregados celulares y, en el caso de las DPF, condensados de

tipo papila.

La proporción de las papilas *de novo*, microfolículos pilosos y equivalentes de piel como se define por el procedimiento de producción da como resultado implantes o trasplantes, respectivamente, para el tratamiento profiláctico o terapéutico de condiciones de cantidad reducida de cabello. Los presentes productos de la invención proporcionan una serie de ventajas. Tanto el equivalente de folículo piloso como el sustituto de piel se pueden estandarizar más que el folículo piloso aislado. Reducen la demanda de folículos pilosos y están más próximos a la situación *in vivo* que cualquier modelo de la técnica anterior. Los complejos modelos tridimensionales de la invención simulan el folículo piloso *in vivo* en su estructura y composición histológica, dando como resultado un alto nivel de relevancia de la información proporcionada sobre la eficacia y la compatibilidad de sustancias activas. Todos los productos de la invención se caracterizan además por una alta estabilidad, bajos costes de fabricación, manipulación conveniente y están disponibles en cualquier momento. Estas características forman la base de una acción reproducible en protocolos estandarizados y para una interacción fiable y segura con sus moléculas efectoras de compatibilización. Su uso es una nueva solución, prometedora, para un amplio espectro de tratamientos causando una reducción directa e inmediata de los síntomas.

Los productos según la invención son adecuados para diversas aplicaciones en los campos médico, farmacéutico y cosmético, tal como para el desarrollo de productos cosméticos o para el descubrimiento de sustancias activas con un efecto biológico sobre el folículo piloso influenciando la pigmentación capilar, el crecimiento del cabello, la estructura del cabello y similares, que se pueden realizar en sistemas de ensayo *in vitro* o procedimientos de identificación sistemática, proporcionando de ese modo información sobre el efecto de las sustancias en las células de folículo piloso con relevancia *in vivo*. La proporción de los productos así formados es beneficiosa en particular para ensayos de identificación sistemática a gran escala. Todos ellos se pueden emplear en procedimientos de identificación sistemática adecuados para alto rendimiento para identificar sustancias activas o composiciones de sustancias activas para fomentar el crecimiento o la inhibición del crecimiento del cabello y en ensayo toxicológico de sustancias y productos químicos. Los métodos de producción así como los métodos de identificación sistemática resultantes de la invención se pueden realizar de una manera simple y rápida. Además, el estuche apropiado se produce con coste eficaz.

Se ha de sobreentender que esta invención no se limita a los métodos, productos, kit o usos particulares descritos en la presente, ya que obviamente dichos elementos pueden variar. También se ha de sobreentender que la terminología empleada en la presente es únicamente a efectos de describir realizaciones particulares y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención, que es definida únicamente por las reivindicaciones adjuntas. Como se usa en la presente memoria, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, formas singulares de palabras tales como "un," "una," y "el" incluyen sus correspondientes referentes plurales a menos que el contexto lo dicte claramente de otro modo. Así, por ejemplo, la referencia a "un recipiente" incluye un solo recipiente o más, que pueden ser de tamaño, forma o composición idéntica o diferente, y la referencia a "un método" incluye referencia a etapas equivalentes y métodos conocidos para un experto en la materia, etc. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la materia a que pertenece esta invención.

Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación ejemplos adecuados. Se proporcionan los siguientes ejemplos como ilustración y no como limitación. Dentro de los ejemplos, se usan reactivos y tampones clásicos que están libres de actividades contaminantes (siempre que sea práctico).

FIGURAS:

La Fig. 1 muestra:

A) Biopsia de sacabocados de una piel de donante tomada de una clínica de lifting. Las líneas discontinuas indican la línea de corte del límite dermosubcutáneo para aislamiento de folículo piloso adicional.

B) El folículo piloso "amputado" y diseccionado (recuadro marcado) se disocia mediante una nueva técnica: la envoltura de tejido conjuntivo se acerca diametralmente al tallo del cabello dando como resultado una separación neta del tallo del cabello con queratinocitos y melanocitos de la envoltura de la raíz externa e interna al alcance de la mano y en la papila Dérmica y envoltura de tejido conjuntivo por otra parte.

C) La envoltura de tejido conjuntivo diseccionado con sus fibroblastos más papila dérmica adyacente, que se puede cortar con precisión (recuadro marcado).

D) Una papila dérmica diseccionada tomada por microscopía electrónica.

E) Fruto de fibroblasto de papila dérmica de la papila dérmica ligeramente arañada y anclada, dejando su estructura de cápsula casi intacta.

F) Fibroblasto de papila dérmica cultivado del 3er pase en matraces de 75 cm^2 de cultivo no recubierto.

G) Fibroblasto de papila dérmica formando condensados de tipo papila dérmica en matraces de 75 cm^2 de adhesión ultra-baja.

H) Aumento de una condensación de fibroblastos de papila dérmica listos para ser tratados a una Neopapila con componentes de matriz extracelular en placas de adhesión baja de 6 pozos.

La Fig. 2 muestra:

A) Neopapila (flecha blanca) con matriz extracelular y queratinocitos circundantes, que se han añadido a la placa de adhesión ultra baja que forma un condensado multicelular.

B) Primeros signos de la formación de estructuras foliculares después de 24 h en cultivo de adhesión ultra baja.

C) Formación de neofolículo después de 1 semana. Es claramente visible la formación de un tallo del cabello primitivo.

D) Formación de neofolículo tomada por microscopía de luz DIC que ilustra la estructura de papila dérmica intacta después de 1 semana de cultivo.

E) Neofolículos insertados en un equivalente de piel que muestran estructuras de tipo folículo piloso definido. El recuadro marcado muestra un folículo piloso que se hace crecer. Con el microscopio invertido se ve la porción proximal del folículo/equivalente de piel.

F) Cultivo adicional de los Neofolículos dentro del equivalente de piel que demuestra un anclaje claro del folículo piloso y crecimiento continuado.

La Fig. 3 muestra:

Neofolículo producido usando KC y MC procedentes de fuentes diferentes que el folículo piloso mamario durante diferentes fases de desarrollo y formación:

A) Fase 1: Neopapila (sin la adición de proteínas de matriz extracelular exógenas) rodeada por Melanocitos y queratinocitos, que se han añadido a la placa de adhesión ultra baja que forma un condensado multicelular temprano.

B) Fase 2: Primeros signos de la formación de estructuras foliculares después de 24 h en cultivo de adhesión ultra baja (Obsérvese la protuberancia en la parte superior). Las Células adheridas se adhieren a la Neopapilla y adoptan una forma plana.

C) Fase 3: Comienzo de la formación de Neofolículo después de 1 semana con desarrollo de envoltura de tipo folículo piloso.

D) Fase 4: Dentro del Neofolículo llega a ser visible una formación claramente visible de un tallo del cabello primitivo.

La Fig. 4 muestra:

Formación de neopapilas funcionales en dos instantes de tiempo diferentes

A) después de 48 horas de condensación y

B) después de 7 días de condensación; el día 7, la agregación de las células es mucho más densa y la formación de matriz extracelular auto-derivada llegan a ser visibles.

Ejemplos:

EJEMPLO 1: Aislamiento y cultivo de Fibroblastos de Papila Dérmica (DPF) folicular humanos, Fibroblastos de Envoltura de Tejido Conjuntivo (CTSF), Queratinocitos (KC) y Melanocitos (MC).

Se obtuvieron folículos pilosos solos después de microdisección de muestras de cuero cabelludo humano de exceso de clínicas de lifting, recibidas bajo las regulaciones requeridas. Para aislar KC y MC de la matriz, CTSF y fibroblastos de la papila dérmica (DPF), se cortó la piel en la interfase dermosubcutánea con un bisturí y se extrajeron folículos pilosos en fase anágena (fase de crecimiento) con forceps bajo un microscopio de disección.

A diferencia de las técnicas de aislamiento descritas previamente (por ejemplo, Magerl et al., Methods Exp. Dermat. 11, 381-385, 2.002), se obtuvieron fracciones puras de las poblaciones celulares deseadas, cortando de manera longitudinal el tejido conjuntivo de la parte superior del folículo piloso diseccionado. Fijando el tallo del cabello en el sitio, se puede tirar diametralmente de CTS sobre la matriz del cabello con forceps hacia la porción proximal inferior. Con esta técnica las células de DP se descubrieron automáticamente evitando el daño y la mezcla de tipos de células. Así, la CTS y la papila dérmica así como la matriz pilosa que contiene células KC y MC se separaron claramente y se pueden cortar fácilmente mediante un bisturí.

Se cultivaron por separado aislados de DP y CTS en placas de cultivo de células de 6 pozos (2-4 en un pozo) fijándolos a la placa de cultivo con una aguja. Para permitir un crecimiento rápido pero manteniendo la morfología de la cápsula y el nicho del fibroblasto al mismo tiempo, la membrana delgada se arañó ligeramente para eliminar componentes de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés). Las células se sumergieron en DMEM+ (Gibco/Invitrogen) más suero fetal de ternera (FCS) al 10% hasta que se observó crecimiento de fibroblasto después de 1-2 semanas basándose en variaciones de donante. Se trasladaron después las células a un matraz de cultivo de 25 cm2 durante otra semana y se hicieron pasar después a un matraz de cultivo de 75 cm^2. Después de alcanzar el pase 3 de sub-confluencia se dividieron en tres matraces de 75 cm^2 que obtuvieron 1 , 5 - 2 millones de DPF o CTSF, respectivamente.

Se retiraron el KC y el MC de folículo piloso amelanótico del tallo de cabello restante y la matriz del cabello adherida por tripsinización (tripsina al 0,05% y AEDT 0,53 mM) y se separaron por tripsinización diferencial y cultivo con métodos estándar como se describe en Tobin et al., J. Invest. Dermatology 104 (1), 86-88, 1.995.

EJEMPLO 2: Formación de Neopapilas

El recuento optimizado de 500.000 DPF se sembró en un matraz para cultivo de adhesión ultra-baja de 75 cm^2 (Corning) que contiene DMEM+ y se permitió que se formaran agregados celulares. Después de 48 horas manteniéndolos sin movimiento estos agregados conformaron el tamaño de una papila dérmica de folículo piloso humano natural. Se transfirieron después los condensados a una placa de adhesión ultra-baja de 6 pozos y se añadió una mezcla de Laminina (concentración final 11,5 µg/ml), Fibronectina (concentración final 10 µg/ml) y Colágeno IV (concentración final 40 µg/ml) a los pozos. Después de 24-48 horas en el cultivo, la secreción de ECM intrínseca y las proteínas añadidas construyeron una envoltura de matriz estable y se han formado Neopapilas. Para facilitar la acumulación y la diferenciación de ECM más rápida, se pueden añadir alternativamente al medio factores de crecimiento, es decir, Factor de Crecimiento de Hepatocitos (30 ng/ml) y/o Factor de Crecimiento de Tejido Conjuntivo (20 ng/ml). Estas Neopapilas están listas para ser implantadas en piel *in vivo* para desarrollar propiedades inductivas del cabello.

EJEMPLO 3: Formación de Neofolículos

Se añadieron 250.000 KC y MC (10:1) a las Neopapilas en un matraz para cultivo de adhesión ultra-baja (6 pozos, Corning) y se cambió el Medio DMEM+ a Medio Libre de Suero de Queratinocitos Definido (Gibco). Después de 1 semana las Neopapilas cubiertas forman estructuras de tipo folículo piloso. Estos Neofolículos ya se podían usar para ensayo. Para elaborar un Neofolículo multicapa, que incluso imite mejor la estructura y función del folículo piloso, se puede obtener por recubrimiento el Neofolículo generado con una mezcla de colágeno IV (60 µg/ml) con CTSF (200.000 células) en placas de adhesión ultra-baja con DMEM+ FCS al 10% durante 2 días más y cambio de medio cada 3 días adicionales.

EJEMPLO 4: Generación de equivalentes de piel con Neofolículos

Se aislaron Fibroblastos de Prepucio Humano Juvenil usando métodos descritos previamente (Toma et al., Stem Cells 23, 727-37, 2.005) y se cultivaron en DMEM+ FCS al 10%. Se mezclaron 250.000 fibroblastos dérmicos (también se usaron DPF o CTSF pero se prefirieron fibroblastos de prepucio por razones de manipulación) con una disolución de Fibrinógeno (Sigma, 3 mg/ml) y 2,0% (v/v) de Aprotinina (20 µg/ml) y se añadió Trombina al 2,5% (v/v) 1,25 U/ml. Se cargó esta disolución enfriada en cámaras de cultivo transwell evitando las burbujas de aire. Después de ajustar la temperatura durante 2-3 min a temperatura ambiente, se introdujeron poco a poco 30-40 Neofolículos a la disolución y se hizo polimerización a un gel durante 10 min a 37°C. Se remojó la matriz compuesta con medio DMEM+ durante 48 h.

Se aislaron Queratinocitos Dérmicos de biopsias de piel obtenidas de clínicas de lifting o de prepucio (Barrandon & Gren, Proc Natl. Acad. Sci. 82, 5390-4, 1.985). En resumen, el tejido graso subyacente y la dermis se cortaron y se digirió la epidermis restante durante la noche en una disolución de Tripsina/AEDT (PAA) a 4°C. Se recogieron KC usando un rascador de células y después de pasar por un colador de células de 70 µm (Becton Dickinson) se sembraron sobre matraces de cultivo recubiertos con colágeno I. Se cambió dos veces a la semana el Medio Sin Suero de Queratinocitos Definidos (Gibco) y se hizo pasar KC o se recogió a confluencia del 60-80%.

Se añadieron KC (250.000) en la parte superior de la matriz y se dejó después que se adhirieran durante 24 horas. Se tomaron las células en exceso cambiando el Medio Sin Suero de Queratinocitos Definido (Gibco) y después de presentar la confluencia alcanzada, se sacaron las cámaras transwell a la interfase aire-líquido para permitir la diferenciación de KC.

Se ensayaron también líneas celulares (es decir, KC en HaCat y fibroblastos en HS27) para generar un modelo de piel similar ya que son más fáciles de cultivar y reducir las variaciones de donante. Se cultivaron en DMEM+ (Gibco) enriquecido con suero fetal de ternera al 5% (FCS, Gibco).

EJEMPLO 5: Formación de Neofolículos que comprende células no procedentes de folículos pilosos mamíferos.

Se han preparado neofolículos como se describe en el Ejemplo 3 usando KC y MC obtenidos como se indica en líneas generales más adelante.

Queratinocitos y Fibroblastos de Prepucio Humano de Cultivo Celular:

Se aislaron Fibroblastos y Queratinocitos de Prepucio Humano de circuncisiones usando métodos descritos previamente (Toma et al., Stem Cells 23, 727-37, 2.005, Barrandon and Gren, Proc Natl Acad Sci. 1.985, 82: 5390-4.). En resumen, se cortaron el tejido graso subyacente y la dermis y se digirió la epidermis restante durante la noche en una disolución Dispase (4 mg/ml, Sigma) a 4°C durante la noche. Después se recogieron los queratinocitos usando un rascador de células y después de pase por un colador de células de 70 µm (Becton Dickinson) se siembran después en matraces de cultivo. Se cultivaron todos los Queratinocitos en matraces para cultivo de células recubiertos con Colágeno I y Medio Sin Suero de Queratinocitos Definido (Gibco). Se cambió el medio dos veces a la semana y se hicieron pasar o se recogieron los Queratinocitos a confluencia del 60-80%. Se cultivaron fibroblastos en DMEM+FCS al 10%.

Melanocitos Epidémicos Humanos de Cultivo Celular:

Partiendo de un criovial de Melanocitos Epidémicos Adultos Humanos (adquiridos en CellMade) se hicieron procedimientos de cultivo celular según el protocolo de los fabricantes. En resumen, se añadieron 15 ml de Medio de Crecimiento de Melanocitos a un matraz para cultivo T75. Se descongelaron las células rápidamente poniendo la mitad inferior del vial en un baño de agua a 37°C durante 1 minuto. Se volvieron a suspender las células en un matraz T-75 que contenía medio de Crecimiento de Melanocitos. Se puso el matraz T-75 en una incubadora humidificada de CO2 al 5% a 37°C. Se cambió el Medio de Crecimiento de Melanocitos cada 2-3 días. Se subcultivaron las células cuando el cultivo alcanzó la confluencia del 80%.

Los neofolículos resultantes se representan en la Fig. 3, donde se muestran las diferentes fases de desarrollo de los Neofolículos producidos usando KC y MC procedentes de fuentes diferentes de folículo piloso de mamífero. En la fase 1, Neopapila (sin la adición de proteínas de matriz extracelular exógena) está rodeada por Melanocitos y queratinocitos, que se han añadido a la placa de adhesión ultra-baja que forma un condensado multicelular temprano. Se ha creado un agregado suelto. En la fase 2, se pueden ver los primeros signos de la formación de estructuras foliculares en cultivo de adhesión ultra-baja. Las células adheridas se adhieren a la Neopapila y adoptan una forma plana mientras que se ha construido una protuberancia en la parte de arriba del condensado. Después de aproximadamente 1 semana, el Neofolículo empieza a formarse comprendiendo desarrollo de envolturas de tipo folículo piloso. Dentro del Neofolículo establecido, llega a ser visible un tallo del cabello primitivo claramente visible.

EJEMPLO 5: Análisis de expresión de genes de diferentes muestras de células procedentes de papilas dérmicas humanas usando Oligomicromatrices de Genoma Humano Completo Agilent (un color)

1. Multiplicación de ARN SuperAmp™

Se prepararon dos Papilas Dérmicas naturales aisladas, Fibroblastos de Papila Dérmica cultivados en monocapa 1x 10^3, Fibroblastos de Papila Dérmica recondensados después de 48 horas y Fibroblastos de Papila Dérmica recondensados después de 14 días, como se describió anteriormente. Las Cuatro muestras de células humanas se lisaron usando Tampón de Lisis SuperAmp™.

Muestra nº	**Muestra celular**	**ID**
1	DP	1
2	MONO	2
3	KOND 1	3
4	KOND 2	4

Tabla 2: Lista de muestras

Se realizaron multiplicaciones de ARN SuperAmp según el procedimiento de Miltenyi Biotec. En resumen, la multiplicación se basa en un protocolo PCR global usando ADNc procedente de ARNm. Se aisló ARNm por tecnología de perla magnética. Se cuantificaron muestras de ADNc multiplicado usando el Espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies).

Muestra de células	**Concentración (ng/µl)**	**Relación (260/280)**	**Volumen (µl)**	**Cantidad total de ADNc (µg)**
1	161,92	1,81	20	3,2
2	143,79	1,86	20	2,9
3	123,05	1,83	20	2,5
4	117,41	1,84	20	2,3

Tabla 3: Resumen de rendimientos de ADNc

Se comprobó la integridad del ADNc mediante la plataforma Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies). Los resultados del barrido del Bioanalizador se han analizado usando una imagen de tipo gel y un electroferograma usando el software experto del Bioanalizador Agilent 2100. La longitud promedio de los productos de ADNc altamente multiplicado osciló entre 200-1.000 bp.

2. Hibridación de Oligomicromatrices de Genoma Completo Agilent

Se usaron 250 ng de cada uno de los ADNc como iniciador para marcado con Cy3 que se realizó según el protocolo de Miltenyi Biotec. Los ADNc marcados con Cy3 se hibridaron durante la noche (17 horas, 65°C) a Oligomicromatrices de Genoma Humano Completo Agilent 4 x 44K (tabla 4) usando la cámara de hibridación recomendada de Agilent y la estufa.

Experimento nº	**Cy3**	**Micromatriz nº**
1	1	251485031842_1_1
2	2	251485031842_1_2
3	3	251485031842_1_3
4	4	251485031842_1_4

Tabla 4: Plan de hibridación

Finalmente, se lavaron las micromatrices una vez con tampón SSPE 6x que contenía N-lauroilsarcosina al 0,005% durante 1 min a temperatura ambiente seguido por un segundo lavado con tampón SSPE 0,06x precalentado (37 °C) que contenía N-lauroilsarcosina al 0,005% durante 1 min. La última etapa de lavado se realizó con acetonitrilo durante 30 s.

3. Resultados de la exploración

Se detectaron señales de fluorescencia de las Micromatrices Agilent hibridadas usando el Sistema de Escáner de Micromatrices Agilent (Agilent Technologies).

4. Análisis de la imagen y los datos

Se usó el Software de Extracción de Características de Agilent (FES, por sus siglas en inglés) para lectura de salida y tratar los archivos de imágenes de micromatrices. El software determina intensidades características (incluyendo la sustracción del fondo), rechaza los valores atípicos y calcula las confianzas estadísticas. Para la determinación de los archivos de datos de salida procedentes de FES de expresión genética diferencial se analizaron además usando el sistema de análisis de datos de expresión de genes Rosetta Resolver® (Rosetta Biosoftware). Este software ofrece – entre otras características – la posibilidad de comparar dos perfiles de intensidad única en un experimento de relaciones. Todas las muestras se marcaron con Cy3, en este momento, los experimentos de relaciones se designaron como experimentos de control frente a (vs.) muestra (salida de datos automática del sistema Resolver®). Obsérvese por favor, que las relaciones se calculan siempre dividiendo la intensidad de la señal de la muestra por la intensidad de la señal de control.

5. Listas de genes Lista de datos brutos del experimento único Lista de datos normalizados del experimento único Lista de la relación de Genes/Lista de genes candidatos preseleccionados

Los datos de salida del software de Extracción de Características de Agilent incluyen listas de genes con los ajustes de datos brutos completos, referidos como lista de datos brutos de un solo experimento. Además, las intensidades de la señal de las listas de datos brutos de un solo experimento se normalizan dividiendo los valores de las intensidades por su mediana. Estas intensidades de la señal normalizadas se unen a una tabla común la lista de datos normalizados de un solo experimento. Esta lista comprende además de los valores de la intensidad normalizados, la característica glsPosAndSignif que indica con un valor =1 que la intensidad de la señal es positiva y significativa por encima del fondo y un valor = 0 que la intensidad de la señal no es positiva y significativa por encima del fondo. El Software Resolver® permite exportar una lista de genes con todas las relaciones de muestra normalizada/log10 de control y el número de veces de los cambios, descripciones de secuencias, valores p, etc., referidos como una lista de relación de genes (de todos los genes). Por ejemplo: Un "cambio de -10 veces" en la listas de relación de genes indica, por lo tanto, una expresión de genes 10 veces mayor en el control comparado con la muestra. Los genes candidatos putativos con un cambio de veces >2 y valor p <0,01 se resumen en una lista de genes candidatos preseleccionados. Un extracto de tal lista que comprende algunos de los genes expresados diferencialmente se muestra en la tabla 5.

Nombre Gen	Función Celular	Relación Mono	Relación 48 h	Relación 14 d	Proceso Biológico
COMP	Matriz	-26,07	-100	-16	glicoproteína de matriz extracelular no colágena, integridad de la matriz, adhesión celular
MMP10	Matriz	-43,08	-12,25	8,47	La familia de las metaloproteinasas de matriz (MMP) está implicada en la remodelación de matriz extracelular (tejido)
MGP	Matriz	-100	-8,25	-3,87	Constituyente estructural de matriz extracelular, desarrollo organismos multicelulares, Diferenciación celular
CDK8	Ciclo Celular	23,89	16,07	4,47	Miembro de la familia de proteína cinasa dependiente de ciclina (CDK), Regulación de transcripción,
CDH3	Adhesión	-100	-52,61	-34,49	Unión de ión cinc, Regulación de transcripción,
PCDHB5	Adhesión	-100	-100	-10,12	Protocadherina beta 5, conexiones célula-célula diferencial especificadas

L1CAM	Adhesión	21,49	7,95	-1,66	Regulación de citoesqueleto de actina
PCDH20	Adhesión	-28,97	-27,7	1,76	Protocadherina 20, establecimiento y función de conexiones célula-célula específicas
PECAM1	Adhesión	-71,51	-100	-46,87	Señalización Adhesión Célula a Célula
Jag2	Citocina	-100	-100	-21	Impacto en: diferenciación celular, ruta de señalización de Notch, Regulación de muerte celular programada, proliferación celular, Comunicación celular, Desarrollo de organismos multicelulares, Ciclo celular, Determinación del destino celular, Morfogénesis de epitelio embriónico, adhesión celular, migración celular
TNFSF10	Citocina	-75	-100	-10,24	Muerte celular programada
LEF1	Factor de Transcripción	-100	-100	-8,5	LEF1 es una proteína nuclear, Regulación de ruta de señalización de receptor Wnt
SPRY1	Factores de Crecimiento	-100	-100	-9,25	Regulación de sprouty de señales de tirosina cinasa
CTGF	Factores de Crecimiento	2	-20	4	Factor de crecimiento de tejido conjuntivo, tejido conjuntivo principal mitoatrayente, Respuesta a enrollamiento, Matriz extracelular proteínica

Tabla 5: Nivel (Relación) de genes definidos medido por análisis de micromatriz dentro de fibroblastos (monocapa, condensados 48 horas, condensados 14 días) comparado con fibroblastos de papila dérmica naturales.

Lo que se puede deducir de la tabla 5 es que con un tiempo de cultivo prolongado, el nivel de expresión de los genes implicados en disposición tridimensional y la formación de tejido se aproximan al nivel de expresión observado en fibroblastos de papila dérmica naturales.

Tabla 1: DMEM +- Medio Eagle modificado de Dulbecco - Composición (Gibco)

COMPONENTES	Molecular	Concentración	Molaridad
Aminoácidos			
Glicina	75	37,5	0,500
L-Alanina		8,9	
Hidrocloruro de L-arginina		84	
L-Asparagina		13,2	
Ácido L-aspártico		13,3	
L-Cistina 2HCl		63	
Ácido L-Glutámico		14,71	

Hidrocloruro de L-histidina-H2O		42	
L-Isoleucina		105	
L-Leucina		105	
Hidrocloruro de L-lisina		146	
L-Metionina		30	
L-Fenilalanina		66	
L-Prolina		11,5	
L-Serina		2.51	
L-Treonina		95	
L-Triptófano		16	
Sal disódica dihidratada de L-Tirosina		104	
L-Valina		94	
Vitaminas			
Fosfato Ácido Ascórbico		2,5	
Cloruro de colina		4	
D-Pantotenato de calcio	477	4	0,00839
Ácido Fólico	441	4	0,00907
i-Inositol		7,2	
Niacinamida		4	
Hidrocloruro de piridoxina		4	
Riboflavina		0,4	
Hidrocloruro de tiamina		4	
Sales Inorgánicas			
Cloruro de Calcio (CaCI2) (anhid.)	111	200	1,80
Nitrato Férrico (Fe(NO3)3*9H2O)		0,1	
Sulfato de Magnesio (MgSO4) (anhid.)		97,67	
Cloruro de Potasio (KCI)		400	
Bicarbonato de Sodio (NaHCO3)		3.700	
Cloruro de Sodio (NaCI)		6.400	
Fosfato Sódico dibásico (Na2HPO4-H2O)		125	
Proteínas			

AlbuMAX® II		400	
Transferina Humana (Holo)		7,5	
Cadena Completa Recombinante de Insulina		10	
Elementos Traza			
Metavanadato Amónico		0,0003	
Sulfato Cúprico		0,00125	
Cloruro Manganoso		5	
Selenito de Sodio		0,005	
Otros Componentes			
D-Glucosa (Dextrosa)		4.500	
Etanolamina		1,9	
Glutatión (reducido)	307	1	0,00326
Rojo de Fenol		15	
Piruvato de Sodio		110	
Penicilina | Estreptomicina		100 u/ml / 100µ/ml	
GlutaMAX™			

REIVINDICACIONES

1. Papila *de novo* que comprende un agregado celular de fibroblastos de papila pilosa dérmica (DPF) de mamífero, exhibiendo el agregado celular la forma y el tamaño de una papila dérmica (DP) fisiológica de un folículo piloso tras su aislamiento y después de su recubrimiento con proteínas de matriz extracelular, preferiblemente colágeno IV, fibronectina y/o laminina, donde la papila *de novo* se produce mediante un método que comprende las etapas de:

(a) proporcionar al menos una papila dérmica (DP) de al menos un folículo piloso de mamífero,

(b) aislar fibroblastos de papila pilosa dérmica (las DPF) de la DP por fijación de manera mecánica de dicha DP en la superficie de un recipiente de cultivo celular, según lo cual la lámina basal se perfora para permitir que migren dichas DPF,

(c) extender las DPF aisladas en cultivo monocapa sin recubrimiento de colágeno, en el que dichas DPF se hacen pasar al menos una vez,

(d) condensar las DPF extendidas en un agregado celular que presentan el tamaño y la forma de la DP fisiológica, en los que dichas DPF se diferencian en recipientes de cultivo no adhesivo en una concentración de células por superficie del recipiente de 1.000 a 100.000 DPF/cm^2, y

(e) recubrir la papila *de novo* con proteínas de matriz extracelular, preferiblemente colágeno IV, fibronectina y/o laminina.

2. Papila *de novo* de la reivindicación 1, donde en la etapa (d) las DPF expandidas se condensan durante al menos 48h.

3. Papila *de novo* de la reivindicación 1 o 2, donde en la etapa (d) las DPF expandidas se condensan durante 2-21 días.

4. Papila *de novo* según una de las reivindicaciones 1-3, donde en la etapa (d) se condensan DPF no inductivas.

5. Microfolículo piloso compuesto por una papila *de novo* de una de las reivindicaciones 1-4 que está cubierta de forma estable por células de al menos otra población celular seleccionada del grupo de fibroblastos, queratinocitos y/o melanocitos, donde el microfolículo piloso se produce mediante un método que comprende las etapas de:

(a) proporcionar al menos una papila *de novo* de una de las reivindicaciones 1-4,

(b) proporcionar al menos otra población celular seleccionada del grupo de fibroblastos, queratinocitos y/o melanocitos, y

(c) co-cultivar la papila *de novo* de una de las reivindicaciones 1-4 con la otra u otras poblaciones celulares en condiciones de cultivo no adherente.

6. Microfolículos pilosos según la reivindicación 5, donde la otra u otras poblaciones celulares se pueden derivar y/o se derivan de un folículo piloso de un mamífero, que se seleccionan del grupo de fibroblastos de la envoltura del tejido conjuntivo, queratinocitos y/o melanocitos.

7. Equivalente de piel que comprende un microfolículo piloso según una de las reivindicaciones 5-6 o una papila *de novo* según una de las reivindicaciones 1-4.

8. Implante que comprende como ingrediente activo un microfolículo piloso según una de las reivindicaciones 5-6 y/o una papila *de novo* según una de las reivindicaciones 1-4, opcionalmente junto con adyuvantes farmacéuticamente tolerables.

9. Trasplante que comprende como ingrediente activo una cantidad eficaz de un equivalente de piel según la reivindicación 7, opcionalmente junto con adyuvantes farmacéuticamente tolerables.

10. Microfolículo piloso según una de las reivindicaciones 5-6, papila *de novo* según una de las reivindicaciones 1-4 y/o equivalente de piel según la reivindicación 7 para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una afección de una cantidad de cabello reducida.

11. Kit que comprende un microfolículo piloso según una de las reivindicaciones 5-6, una papila *de novo* según una de las reivindicaciones 1-4, el equivalente de piel según la reivindicación 7, el implante según la reivindicación 8 y/o el trasplante según la reivindicación 9.

12. Uso de un microfolículo piloso según una de las reivindicaciones 5-6, una papila *de novo* según una de las reivindicaciones 1-4 y/o el equivalente de piel según la reivindicación 7 para la evaluación *in vitro* de los efectos moduladores del cabello de sustancias.

13. Uso de un microfolículo piloso según una de las reivindicaciones 5-6, una papila *de novo* según una de las reivindicaciones 1-4 y/o el equivalente de piel según la reivindicación 7 para la evaluación *in vitro* de los efectos tóxicos de sustancias.

14. Método para la identificación sistemática de alto rendimiento de sustancias, que modulan propiedades del cabello, que comprende las etapas de:

- proporcionar una muestra de papilas *de novo* según una de las reivindicaciones 1-4, microfolículos pilosos según una de las reivindicaciones 5-6 y/o el equivalente de piel según la reivindicación 7,
- dividir la respectiva muestra en porciones,
- incubar al menos una porción con sustancias que se han de someter a identificación sistemática y
- comparar parámetros de propiedades del cabello en la porción con otra porción que no se ha incubado con las sustancias.

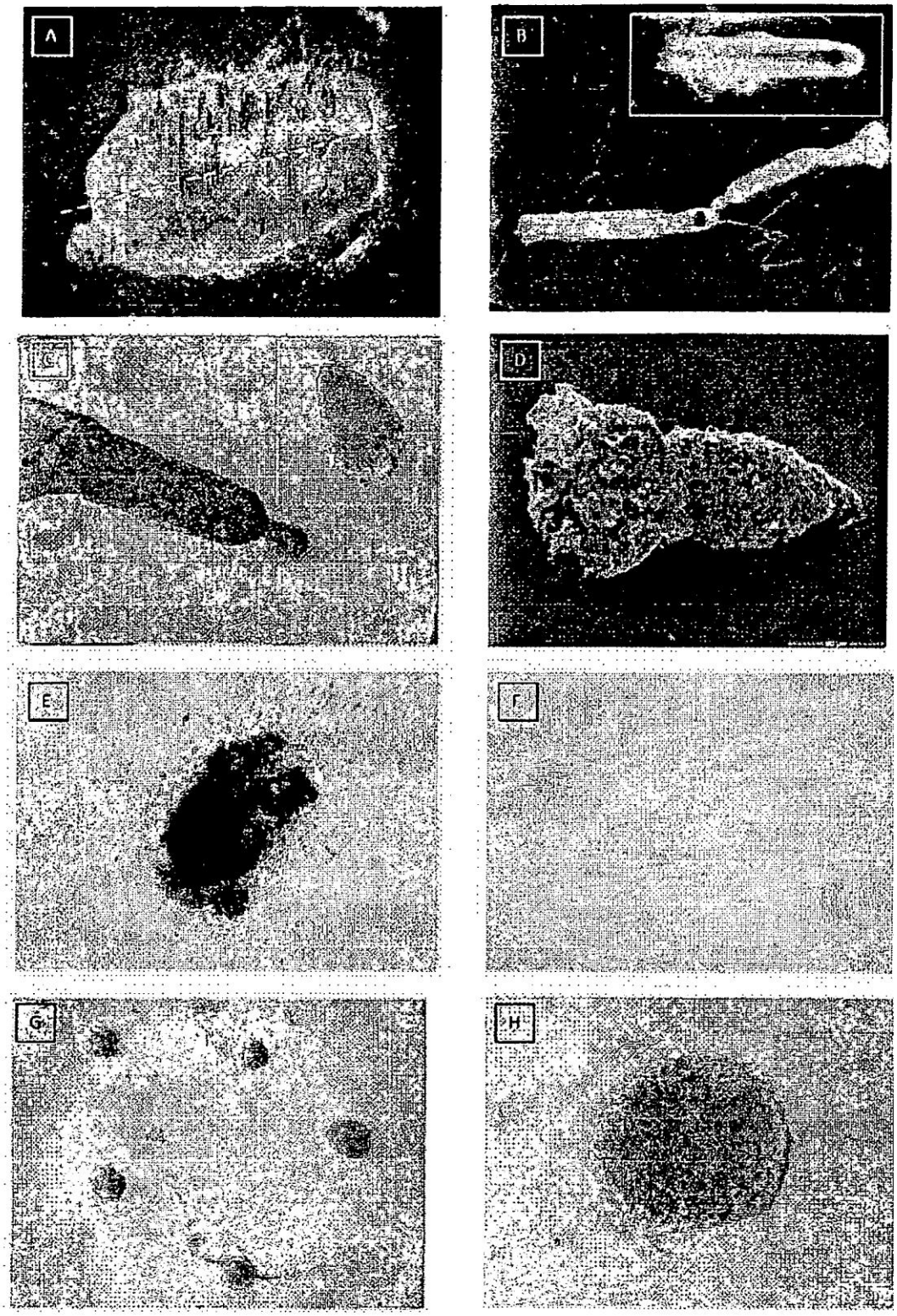

Fig. 1

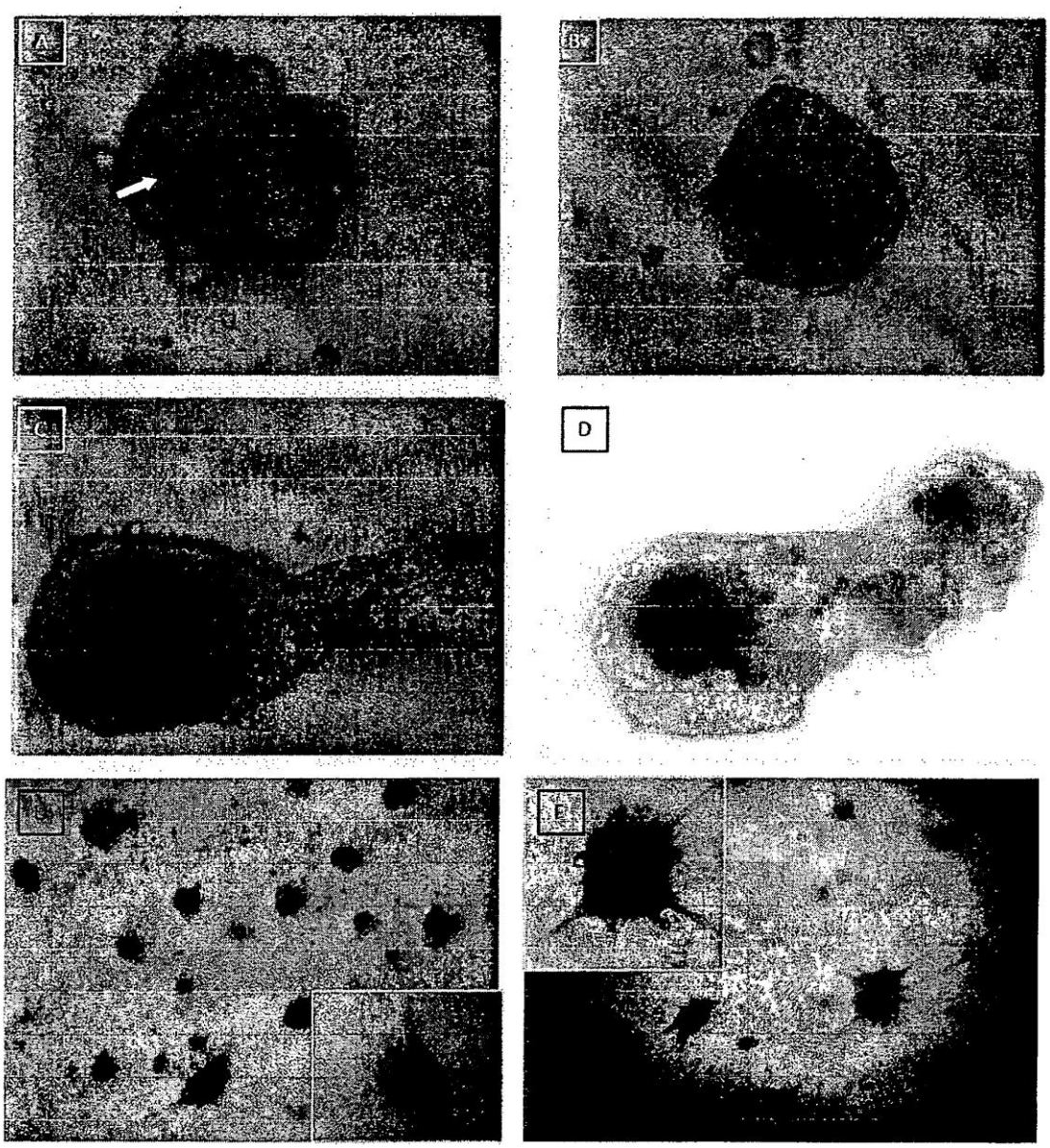

Fig. 2

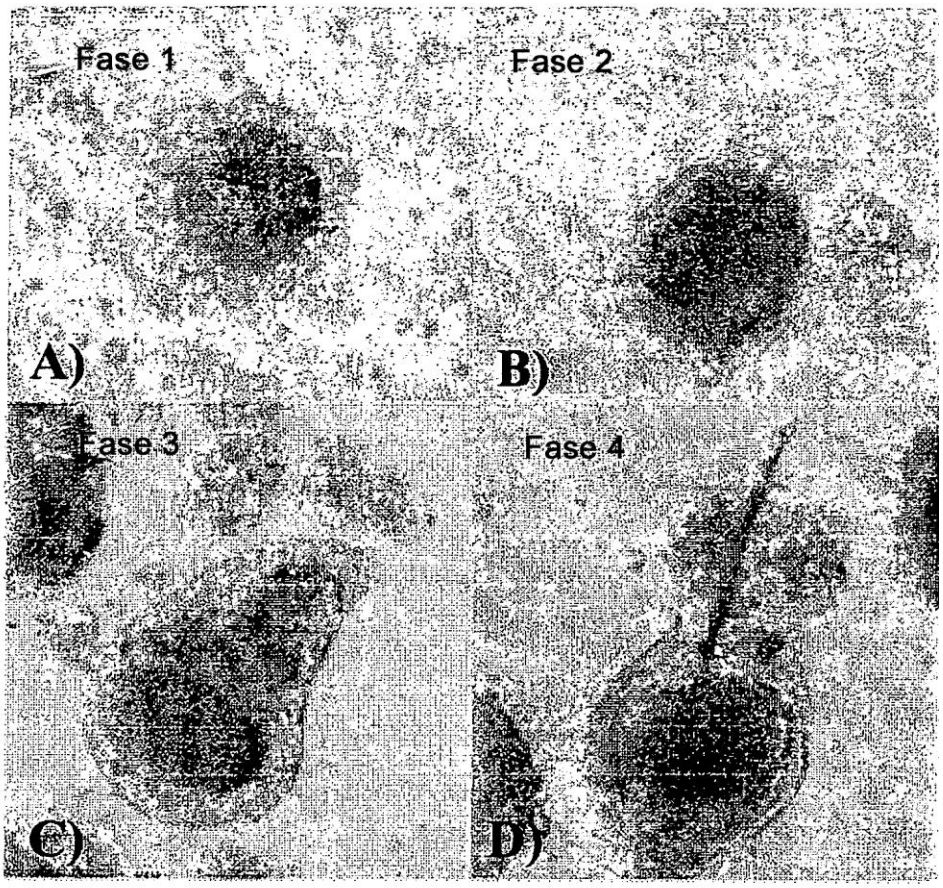

Fig. 3

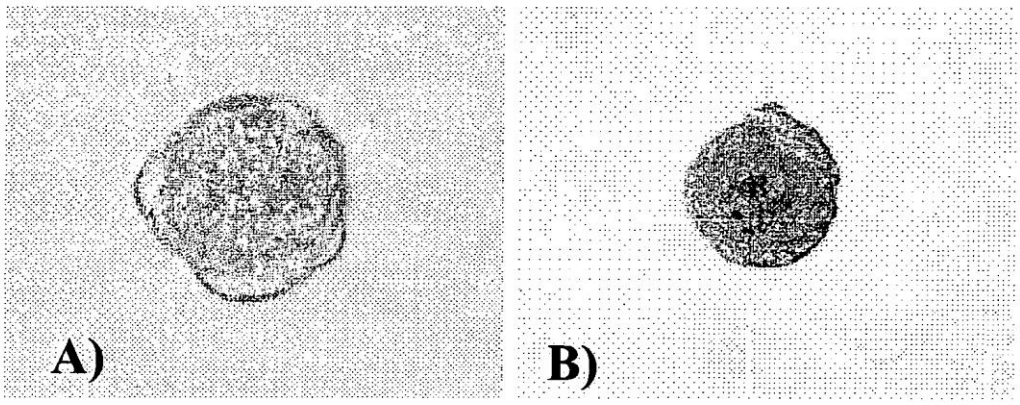

Fig. 4