

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 811**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2009 E 09155394 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2103687**

54 Título: **Equivalente de piel pigmentada funcional**

30 Prioridad:

29.04.2008 FR 0852886

17.03.2008 FR 0851705

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

12.01.2017

73 Titular/es:

L'ORÉAL (100.0%)

14, RUE ROYALE

75008 PARIS, FR

72 Inventor/es:

**DUVAL, CHRISTINE y
BERNERD, FRANÇOISE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 596 811 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

Equivalente de piel pigmentada funcional

- 5 La presente invención se refiere a pieles reconstruidas que presentan una pigmentación constitutiva, y su utilización en procedimientos de evaluación de los fenómenos de pigmentación cutánea; se refiere así a los procedimientos de evaluación de agentes susceptibles de modular esta pigmentación, ya sea constitutiva o inducida. Se refiere también a un procedimiento de preparación de tales modelos de piel.
- 10 El color de la piel se debe principalmente a la presencia de un pigmento, la melanina, en la epidermis. La melanina es sintetizada por unas células dendríticas específicas localizadas en la capa basal de la epidermis, los melanocitos. La melanogénesis tiene lugar en unas organelas, los melanosomas que, cargados de melanina, son transferidos a las células próximas epidérmicas, los queratinocitos, a través de los dendritas.
- 15 Esta pigmentación puede ser modulada por unos factores físicos, tales como las radiaciones UV, químicos, tales como unos productos despigmentantes o propigmentantes, y/o durante modificaciones fisiológicas o patológicas del funcionamiento de la piel.
- 20 Por lo tanto, es deseable disponer de modelos que permitan, por un lado, efectuar los estudios necesarios para la mejor comprensión de la función de la piel tanto en el campo mecánico como en el campo fisiológico y, por otro lado, que constituyan unos ensayos predictivos de la actividad de los activos cosméticos y/o farmacéuticos, o también unos efectos secundarios de ingredientes tópicos, o de agentes tomados por vía oral.
- 25 Para evaluar una modulación de la pigmentación, existen en la actualidad unos modelos *in vitro*. Se trata, en particular, de los modelos siguientes:
- Inhibición *in tubo* de la tirosina fúngica o humana recombinante (modelo no celular únicamente bioquímico) (Virador Analytical Biochem 1999).
 - 30 - Monocultivos de melanocitos normales o procedentes de melanoma en monocapa (Virador Analytical Biochem 1999, Ni-komatsu JID 2007).
 - Cocultivo de melanocitos-queratinocitos humanos normales o inmortalizados en monocapa (Régner Cell Mol Biol 1999, Yoon Pigment Cell Res 2003).
 - 35 - Epidermis reconstruida pigmentada sobre dermis desepidermizada muerta o sobre filtro inerte de policarbonato: modelo 3D constituido de melanocitos y de queratinocitos únicamente.
- 40 Se busca desarrollar, desde hace numerosos años, unos modelos de piel reconstruida que permitan, por un lado, efectuar los estudios necesarios para la mejor comprensión de la función de la piel tanto en el campo mecánico como en el campo fisiológico y, por otro lado, que constituyan unos ensayos predictivos de la actividad de activos cosméticos y/o farmacéuticos, o también unos efectos secundarios de ingredientes tópicos o tomados por vía oral.
- 45 El documento EP 285471 describe así un procedimiento de preparación de un equivalente de piel a partir de un cultivo de queratinocitos que provienen de la vaina del folículo piloso; se obtiene por inoculación en un equivalente de dermis, una epidermis diferenciada cuya estructura es parecida a la de la epidermis humana.
- 50 Después, se han propuesto diversos equivalentes de piel, y se ha sugerido introducir unos melanocitos en estos modelos.
- 55 Las patentes FR 2 689904 y WO 95/10600 describen la preparación de un equivalente de epidermis que contiene unos queratinocitos y unos melanocitos, y su utilización en ensayos de bronceado. Sin embargo, estos equivalentes de epidermis se obtienen sobre un soporte inerte que no reproduce las interacciones fisiológicas con la dermis, y que no contienen fibroblastos ni ambiente matricial. Además, las condiciones de cultivo no permiten conservar los melanocitos en un fenotipo normal debido al uso de un promotor de tumor (TPA o PMA).
- 60 Sin embargo, ninguno de estos modelos permite comprender la modulación de la pigmentación por los participantes de la dermis (fibroblastos, matriz extracelular, componentes de la unión dermo-epidérmica) ya que no comprenden dermis viva.
- 65 Incluso cuando se desarrollan unos modelos organotípicos humanos que comprenden unos fibroblastos vivos, estos no permiten evaluar una modulación de la pigmentación en un contexto fisiológico ya que presentan unos defectos de funcionalidad (ausencia de pigmentación constitutiva o inducible en particular por la exposición UV).
- Unos modelos de piel pigmentada se han desarrollado en la dermis muerta desepidermizada o sobre esponja (matriz de colágeno + GAG) recolonizada por los fibroblastos. Sin embargo, la localización de los melanocitos en el mismo

es a menudo imperfecta y estos modelos presentan unos defectos de funcionalidad. En efecto, muestran poca o ninguna pigmentación constitutiva y la estimulación de la pigmentación por los UV o por un agente propigmentante fisiológico no se observa en estos modelos.

5 Unos fibroblastos incrustados en una matriz de colágeno libre (no tenso) se han utilizado también para reconstruir una piel pigmentada. Sin embargo, estos modelos presentan unos inconvenientes que no les permite ser utilizados para evaluar la modulación de la pigmentación.

10 Bertaux *et al.* (Br J Dermatol 1988), han realizado un modelo de piel pigmentada insertando una biopsia de piel en el equivalente dérmico a fin de que las células epidérmicas salgan de la epidermis y proliferen en la superficie del retículo. Entre los inconvenientes de tal técnica, se puede citar la ausencia de control de las células epidérmicas y el hecho de que una sola reconstrucción de la piel es posible con una biopsia: no se puede comparar ningún experimento con otro (ninguna reproducibilidad). Además, como el modelo desarrollado por Haake y Scott (Scott y Haake, J Invest Dermatol 1991) este modelo no muestra funcionalidad real: no hay presencia de melanina ni constitutiva ni inducida.

15 En el modelo de Archambault *et al.* (J Invest Dermatol. 1995), se induce una estimulación de melanogénesis después de UVB, pero para unas dosis que inducen una alteración epidérmica (dosis citotóxica) que constituye unas condiciones inaceptables para poder estudiar la pigmentación y su modulación en un contexto *in vitro* similar al fisiológico.

20 Otros intentos más recientes de reconstrucción de la piel reconstruida pigmentada se han realizado en un soporte de retículo libre, sin embargo, los modelos obtenidos no corresponden a modelos de piel humana normal, ya que son creados o bien a partir de melanocitos de ratón (Yoshimura J Dermatol Sci 2001), o bien los melanocitos son cultivados en condiciones que inducen transformación tumoral, en presencia de TPA (Liu Cell Biol Int 2007). En cuanto al desarrollado por Martinhao Sauto *et al.* (Sao Paulo Med J 2006), no está presente ni se muestra en la epidermis ningún melanocito.

25 Por lo tanto, existe una necesidad de disponer de un modelo que permita comprender de manera relevante la piel y su desregulación, reproduciendo las interacciones fisiológicas de la piel humana.

30 Existe también una necesidad de disponer de procedimientos de evaluación de la modulación de la pigmentación de la piel, que permitan comprender de manera relevante el conjunto de los mecanismos que intervienen en la pigmentación de la piel y su desregulación, reproduciendo las interacciones fisiológicas de la piel humana.

35 En particular, existe una necesidad de un equivalente de piel que comprenda unos melanocitos vivos funcionales que presenten una localización similar a la existente en la piel humana y un compartimento dérmico con unos fibroblastos vivos.

40 Es por ello que la presente invención tiene como objeto un equivalente de piel *in vitro* caracterizado por que comprende al menos un equivalente de epidermis que comprende unos queratinocitos que forman al menos una capa basal y al menos una capa superficial y al menos un equivalente de dermis que comprende un retículo libre de colágeno, y por que comprende unos melanocitos que sintetizan la melanina de manera constitutiva y unos fibroblastos vivos, estando todos los melanocitos en la capa basal y el equivalente de epidermis, y distribuidos de manera homogénea en el equivalente de epidermis, siendo la densidad de distribución de dichos melanocitos sustancialmente constante en un plano paralelo a dicha superficie.

45 El equivalente de piel según la invención presenta por lo tanto una pigmentación constitutiva, es decir en ausencia de cualquier estimulación por las radiaciones UV o por unos activos pro-pigmentantes. Por pigmentación constitutiva, se entiende la capacidad de los melanocitos para producir melanina en estado basal no estimulado. Esta pigmentación corresponde a la existencia de melanocitos que, en unas condiciones fisiológicas, producen una melanina madura dentro de melanosomas; por medio de las dendritas del melanocito, la melanina se transfiere a los queratinocitos, que aseguran una distribución homogénea de la pigmentación en el equivalente de epidermis. La presencia de gránulos de melanina en los melanocitos y los queratinocitos próximos demuestra la pigmentación constitutiva.

50 La invención es más particularmente un equivalente de piel humana.

55 En particular, la invención se refiere a una unidad (o complejo) de pigmentación global y funcional que incluye melanocitos, queratinocitos, fibroblastos humanos normales y ambiente matricial; ésta comprende al menos un equivalente de epidermis y al menos un equivalente de dermis, y comprende un componente pigmentario constitutivo y funcional (pigmentación constitutiva e inducible en condiciones fisiológicas).

60 La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de evaluación de la capacidad de un agente para modular la pigmentación, caracterizado por que

65

(a) se aplica dicho agente a un equivalente de piel *in vitro*, comprendiendo dicho equivalente de piel al menos un equivalente de epidermis que comprende melanocitos que producen melanina de manera constitutiva y al menos un equivalente de dermis que comprende fibroblastos vivos, y

5 (b) se compara la pigmentación (i) del equivalente de piel *in vitro* al que se ha aplicado el agente a evaluar a la (ii) de un equivalente de piel control que no ha sido sometida al agente.

10 Por “un” agente, se debe de entender, a lo largo de toda la presente descripción, “al menos un”, salvo que se especifique de otra manera. La aplicación puede llevarse a cabo en la etapa a por vía tópica o cualquier otro modo de administración.

La modulación de la pigmentación en sentido amplio puede ser apreciada de manera cualitativa y cuantitativa, con comparativos. Se pueden utilizar todos los métodos que permite el análisis:

15 - de la pigmentación y/o del color del equivalente de la piel y de la cantidad, naturaleza de la melanina, de su transferencia y degradación en los queratinocitos; se pueden citar, a título de ejemplo, por espectrocolorimetría (medición de la luminancia e ITA) directa o indirecta, por espectroscopía selectiva (medición con mexámetro), por Siascopia, por medición en cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC (medición de las DHI-melanina, DHICA-melanina, feomelanina) por espectrofotometría visible después de la disolución de la piel por el soleno o la sosa, por análisis de imágenes después de la coloración de la melanina por Fontana-Masson, por tratamiento de imágenes focal o multifotónico, por resonancia paramagnética electrónica, por microscopía electrónica de transmisión.

20 - del número, forma y madurez de los melanosomas producidos en los melanocitos, transferidos y/o degradados en los queratinocitos,

- de la cantidad, madurez y/o actividad enzimática de las proteínas del melanosoma tales como por ejemplo pmel-17, Tirosinasa, TRP-1, TRP-2 (DCT), MATP, proteína P MART-1, SCL117A, SLC24A5 (nckx5), OA1,

25 - del número, distribución, morfología (dendricidad) de los melanocitos,

- de la cantidad, madurez y/o actividad enzimática de los receptores, moléculas, factores de transcripción, a nivel membranario, citosólico, nuclear, que participan en las vías de la melanogénesis, de transporte de dendritas y de transferencia de las melaninas y de los melanosomas en los queratinocitos. A título de ejemplos, se pueden citar, MC1-R, m-KIT, ETB-R, ETA-R, MITF, USF-1, SOX10, Miosina Va, Rho, Rac, Rab27A, melanofilina.

30 Los métodos empleados podrán ser unos métodos de evaluación de la cantidad y de la actividad de las proteínas y de la expresión de su gen codificante, tales como las técnicas de reacción a la Dopa, inmunohistoquímica, coloración histológica, análisis de imágenes, biología molecular (PCR), bioquímica (WB, determinación inmunoenzimática ELISA), etc.

35 El procedimiento utiliza más particularmente un equivalente de piel humana, y en particular un equivalente de piel que comprende al menos unos melanocitos y/o unos queratinocitos y/o unos fibroblastos procedentes de la piel humana, ventajosamente que comprenden al menos unos melanocitos de piel humana.

40 En particular, el procedimiento se aplica así sobre una unidad (o complejo) de pigmentación global y funcional que incluye melanocitos, queratinocitos, fibroblastos humanos normales y ambiente matricial; comprende al menos un equivalente de epidermis y al menos un equivalente de dermis, y comprende un componente pigmentario constitutivo y funcional (pigmentación constitutiva e inducible en condiciones fisiológicas).

45 En efecto, se ha encontrado en el ámbito de la invención que es posible obtener un modelo que responde a las necesidades recordadas anteriormente, y que presenta las características siguientes:

50 - contiene los participantes celulares principales implicados en la pigmentación, a saber el melanocito, pero también sus principales parejas celulares: los queratinocitos y los fibroblastos.

- reproduce la organización tridimensional de la piel a fin de respetar y permitir los contactos y las influencias que existen naturalmente entre parejas celulares, la unión dermo-epidérmica y la matriz extracelular.

55 - es funcional, es decir pigmentado en estado basal (pigmentación constitutiva) y capaz de ser estimulado por los UV y/o por unos agentes propigmentantes, en condiciones que reproducen los fenómenos fisiológicos.

60 El modelo según la invención contiene los 3 tipos celulares principales presentes en la piel e implicados en la pigmentación, en una estructura similar a la de la piel, y permite así reproducir la regulación del melanocito y de la pigmentación por sus parejas celulares y la matriz extracelular.

65

En efecto, en la piel, las células pigmentarias están estrechamente relacionadas con las células epidérmicas y dérmicas próximas. Por su localización en la capa basal, en el interfaz epidermis-dermis, existen unos enlaces físicos y químicos entre los melanocitos y queratinocitos, y también entre melanocitos y fibroblastos. Estas interacciones con sus dos tipos celulares tienen una función de regulación del melanocito y de la pigmentación.

Se reconoce que por medio de factores paracrinicos liberados por los queratinocitos y por las conexiones directas físicas establecidas por las E-caderinas, los queratinocitos regulan la adhesión, el crecimiento, la supervivencia de los melanocitos, la cantidad y la calidad de melanina producida. Entre estos factores, se pueden citar, por ejemplo, la alpha Melanocyte Stimulating Hormone (MSH), la Endotelina 1 (ET1), el Stem Cell Factor (SCF), las prostaglandinas E2 y F2 α (PGE2, PGF2 α), el basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) o el Nerve Growth Factor (NGF).

Asimismo, la función desempeñada por los fibroblastos en la pigmentación es ahora indiscutible: segregando unos factores idénticos a los producidos por los queratinocitos, tales como bFGF, SCF o el "hepatocyte growth factor" (HGF), o diferentes tales como dickkopf1 y unas proteínas de la matriz, los fibroblastos modulan el desarrollo, el crecimiento, la morfología y la diferenciación de los melanocitos.

Por otro lado, los componentes de la unión dermo-epidérmica, las moléculas de la matriz extracelular dérmica (ECM) también tienen un impacto sobre el melanocito y la pigmentación. En efecto, los melanocitos se adhieren a las moléculas de la membrana basal, por medio de unas integrinas y receptores, en particular a la laminina y al colágeno IV, y la presencia de las moléculas de la membrana basal es necesaria para la buena posición basal de los melanocitos. La calidad de la unión dermo-epidérmica (o JDE), cuyos componentes y su localización resultan de la interacción entre fibroblastos y queratinocitos, influyen el tipo de anclaje (integrinas) a nivel de la JDE.

La modulación de las proteínas ECM derivadas de fibroblastos afecta también a la proliferación, la morfología y la actividad melanogénica de melanocitos normales. En particular el colágeno I, el colágeno IV, la fibronectina y la laminina estimulan la actividad tirosinasa, modulan la dendricidad de los melanocitos y su proliferación.

Además, existen unos bucles celulares de regulación: los queratinocitos pueden actuar directamente sobre los melanocitos o indirectamente sobre los fibroblastos, que a su vez modularán los melanocitos: por ejemplo, la secreción de IL-1 α y TNF- α por los queratinocitos puede estimular la producción de HGF y de SCF por los fibroblastos, que a su vez activa los melanocitos. De modo similar, los fibroblastos pueden liberar unas citoquinas simuladoras de queratinocitos (KGF por ejemplo). Estos últimos a su vez producirán unos factores de modulación de la pigmentación.

Se sabe también que la exposición de la piel al sol induce una estimulación de la pigmentación: es el bronceado, que corresponde a una activación transitoria de los melanocitos y un aumento de la síntesis de melanina.

Esta respuesta se debe en gran parte a la contribución de los factores paracrinicos de las células asociadas, los queratinocitos y los fibroblastos, cuya producción incrementa por los UV.

De manera inesperada, el modelo según la invención permite reproducir estos fenómenos y por lo tanto ensayar unas sustancias o unos estímulos susceptibles de modificar la pigmentación cutánea.

El procedimiento de evaluación según la invención permite tener en cuenta todos estos fenómenos y por lo tanto evaluar la capacidad de sustancias o de los estímulos susceptibles de modular la pigmentación cutánea, directa y/o indirectamente.

El equivalente de piel o "piel reconstruida" según la invención presenta un equivalente de epidermis diferenciado estratificado, que comprende al menos una capa superficial y al menos una capa basal. Ventajosamente, los queratinocitos reproducen las características de una epidermis *in vivo*, a saber un epitelio multicapa estratificado con una capa basal en contacto con el equivalente de la dermis y cuyos estratos superiores demuestran una diferenciación, reproduciendo desde la profundidad hacia la periferia una capa suprabasal (o capa espinosa), una capa granulosa (*stratum granulosum*) y una capa córnea (*stratum corneum*) de una epidermis. Por capa superficial del equivalente de epidermis se entiende al menos una capa que corresponde a la capa suprabasal, granulosa o córnea.

Los queratinocitos utilizados en el equivalente de epidermis pueden ser preparados según cualquier método conocido de la técnica anterior. Se puede citar a título de ejemplo el cultivo a partir de epidermis disociado que proviene de muestras de piel normal o patológica.

Preferiblemente, según la invención, los queratinocitos utilizados se preparan a partir de epidermis disociada que proviene de muestras de piel humana normal o patológica, en particular según el método descrito en Rheinwald y Green, Cell, vol 6, 331-344, 1975. Pueden provenir de piel caucásica, asiática o africana, de diferentes sitios anatómicos (tales como en particular la espalda, la cara, el seno, la parte superior de las manos, las palmas, etc.), de zonas que han sido expuestas o no al sol. Se pueden utilizar unos queratinocitos que provienen de pieles normales. Según un modo particular de realización de la invención, se pueden utilizar también unos queratinocitos

que provienen de patologías cutáneas, tales como por ejemplo manchas de vejez (lentigo actínico), melasma, vitiligo, nevo, xeroderma pigmentoso o melanoma. Pueden también ser unos queratinocitos genéticamente modificados, que sobreexpresan o subexpresan algunos genes.

5 Los melanocitos están integrados en la epidermis y están localizados en la capa basal del equivalente de la epidermis según la invención. Estos melanocitos están distribuidos de manera homogénea en el equivalente de la epidermis, es decir que su densidad de distribución es sustancialmente constante en un plano paralelo a la superficie de dicho equivalente de dermis y sustancialmente similar a la encontrada en la piel humana. La totalidad de los melanocitos se encuentra así en la capa basal del equivalente de la epidermis según la invención, la ausencia de melanocitos en las capas suprabasales y el estrato córneo del equivalente de la epidermis demuestra la calidad de la reconstrucción.

15 Los melanocitos son unos melanocitos que provienen de piel humana adulta, joven o de recién nacido, en particular de piel humana adulta. Tales melanocitos expresan la enzima TRP-2, contrariamente a los melanocitos del folículo piloso. La naturaleza de la melanina sintetizada es por lo tanto diferente: los melanocitos en la epidermis producen eumelanina compuesta de DHI-melanina y de DHICA-melanina mientras que los melanocitos en el cabello producen principalmente solamente DHI-melanina debido a la ausencia de la expresión de TRP-2.

20 Por otro lado, el principal estímulo fisiológico de los melanocitos de la piel es la radiación UV que, activando la melanogénesis y la redistribución de la melanina, induce un oscurecimiento de la piel, el bronceado. Esta funcionalidad fisiológica no concierne a los melanocitos del cabello, cuya pigmentación no es inducida por los UV.

25 Los melanocitos pueden provenir de piel caucásica, asiática o africana, de diferentes sitios anatómicos (tales como en particular la espalda, la cara, el seno, la parte superior de las manos, las palmas, etc.), de zonas que han sido expuestas o no al sol. Se pueden utilizar unos melanocitos que provienen de pieles normales. Según un modo particular de realización de la invención, se pueden utilizar también unos melanocitos que provienen de patologías cutáneas tales como, por ejemplo, manchas de vejez (lentigo actínico), melasma, vitiligo, nevo, xeroderma pigmentoso o melanoma. Pueden también ser unos melanocitos genéticamente modificados que sobreexpresan o subexpresan algunos genes.

30 Los melanocitos localizados en la capa basal producen unos melanosomas y melanina que se transfieren en los queratinocitos cercanos. Se puede así reproducir el fenotipo de pieles que presentan una pigmentación constitutiva más o menos intensa relacionada con el tipo de melanocitos. La pigmentación constitutiva puede ser cuantificada mediante cualquier método de medición de la pigmentación o de la cantidad de melanina, como por ejemplo, por espectrocolorimetría (medición de la luminancia), por medición en cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC, por espectrofotometría visible después de la disolución de la piel por el soleno o la sosa, o por análisis de imágenes después de la coloración de la melanina por Fontana-Masson, por tratamiento de imágenes confocal o multifotónica.

40 Ventajosamente, el equivalente de piel según la invención presenta una luminancia, medida según la técnica de Chardon *et al.* (In Biological responses to ultraviolet A radiation, Ed Urbach 1992) inferior o igual a 80, en ausencia de cualquier exposición a los UV y/o a un agente propigmentante. Este valor podrá ser más bajo, en particular en el caso de equivalente de piel africana, y podrá en particular variar de +80 a -40 para unos fenotipos que van de muy claro a negro. En general, las pieles reconstruidas pigmentadas según la invención presentan una diferencia de luminancia (Delta L) de al menos 1,5 con respecto a una piel reconstruida que no comprende melanocitos, y esto en ausencia de cualquier irradiación UV.

45 El equivalente de dermis según la invención comprende unos fibroblastos cuyos ejes principales están orientados en al menos dos direcciones perpendiculares.

50 Ventajosamente, el porcentaje de fibroblastos orientados longitudinalmente con respecto a la superficie del equivalente de dermis es inferior al 50%.

55 El equivalente de dermis comprende una matriz o retículo libre de colágeno, contráctil en todas las direcciones, homogéneo sin biopsia; los fibroblastos, y llegado el caso otras células de la dermis, están distribuidos en un gel continuo de colágeno.

60 El equivalente de dermis comprende al menos una matriz de colágeno de tipo I en la que están distribuidos los fibroblastos. Puede contener además otros constituyentes de la matriz extracelular. Por "constituyente de matrices extracelulares" se designan en particular unas moléculas tales como los colágenos en particular el colágeno IV, las lamininas, la entactina, la fibronectina, los proteoglicanos, los glicosaminoglicanos, el ácido hialurónico. Según uno de los modos de realización de la invención, el equivalente de dermis contiene al menos un colágeno IV y laminina; preferentemente, contiene también entactina. Las concentraciones de estos diferentes constituyentes podrán ser adaptadas por el experto en la materia y estarán, por ejemplo para la laminina, comprendidas entre el 1 y el 15% del volumen final), para el colágeno IV entre el 0,3 y el 4,5% del volumen final y para la entactina entre el 0,05 y el 1% del volumen final.

El colágeno utilizado puede ser un colágeno de origen bovino, de cola de rata o de pez o cualquier otra fuente de colágeno nativo o producido por ingeniería genética que permite una contracción en presencia de fibroblastos.

La matriz es un gel de colágeno no tenso, obtenido por contracción tanto horizontal como verticalmente, que no impone organización preferencial de los fibroblastos. Tal matriz denominada también "libre" no se adhiere al soporte y sus volúmenes pueden ser modificados a voluntad, confiriéndole un grosor y un diámetro variable; el grosor del equivalente de la dermis será generalmente de al menos 0,05 cm y en particular de aproximadamente de 0,05 a 2 cm, pero podrá ser aumentado sin perjudicar a las propiedades ventajosas del equivalente de piel según la invención; asimismo su diámetro será adaptado por el experto en la materia de aproximadamente 3 mm a 20 cm o más.

Entre el compartimiento dérmico que comprende los fibroblastos vivos y el equivalente de epidermis multiestratificado, el contacto es directo y constituye una unión dermoepidérmica parecida a la existente *in vivo* tanto en el plano estructural como bioquímico. En el plano bioquímico, comprende unos componentes de la membrana basal; de la lámina densa, de la lamina lúcida y zona sub-basal, tales como, entre otros, el colágeno IV, el colágeno VII, la laminina 5, la entactina, la fibronectina.

El equivalente de piel, útil en el procedimiento de evaluación según la invención, puede también contener unas células endoteliales, unas células de papilas dérmicas, unas células del sistema inmunitario, tales como unos linfocitos, unas células dendríticas, unos macrófagos o unas células Langerhans, unos adipocitos, unas células nerviosas, y sus mezclas.

Como se ha indicado anteriormente, el equivalente de piel presenta una pigmentación constitutiva, y la pigmentación puede ser además aumentada por exposición a un agente pro-pigmentante y/o a radiaciones UV.

En particular, después de la estimulación por los UV a dosis equivalentes de la irradiación diaria o cenital recibidas por una piel humana de un individuo en condiciones fisiológicas, los fibroblastos del modelo según la invención producen unos factores citosolubles tales como unas citoquinas o unos factores de crecimiento que participan en la pigmentación y/o en su modulación.

Además, el número de melanocitos en la capa basal aumenta después de la estimulación por los UV, en particular de un factor de al menos 1,5, y su morfología está modificada: presentan un aumento de la dendricidad marcado por un aumento del número de dendritas, así como su alargamiento; la cantidad de melanina aumenta también por síntesis y por aumento de la transferencia en las capas epidérmicas de un factor superior o igual a 1,5.

El aumento de la pigmentación se evalúa por medición de la variación de luminancia de la piel o cualquier otro método de cuantificación de la melanina, como por ejemplo por medición en cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC, por espectrofotometría visible después de la disolución de la piel por el solueno o la sosa, por análisis de imágenes después de la coloración de la melanina por Fontana-Masson o por tratamiento de imágenes confocal o multifotónico.

La funcionalidad fisiológica del modelo según la invención después de UV, se muestra por lo tanto por los cambios de los parámetros siguientes:

- el color macroscópico: las pieles expuestas a los UV son claramente más oscuras que las pieles no expuestas: esta estimulación macroscópica de la pigmentación está cuantificada por la disminución de la luminancia (DL = 4.38).

- la densidad de los melanocitos: la densidad de los melanocitos después de UV aumenta como en la piel normal.

- la cantidad de melanina: la pigmentación está realmente estimulada después de UV: la cantidad de melanina aumenta y este aumento está cuantificado por análisis de imágenes, después de la coloración Fontana-Masson (coloración de revelación de los gránulos de melanina) o por ensayo de la melanina después de la extracción con solueno o con sosa.

La invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación de tal equivalente de piel. El procedimiento comprende en particular las etapas siguientes:

a) puesta en contacto de fibroblastos y de una solución de colágeno, después incubación durante un tiempo suficiente para obtener una matriz de colágeno contraído en la que se distribuyen los fibroblastos, que constituyen un equivalente de la dermis,

b) co-inoculación por una mezcla de queratinocitos y de melanocitos, del equivalente de la dermis obtenido en a), y cultivo en inmersión en un medio líquido,

c) emersión del conjunto del cultivo (queratinocitos y melanocitos inoculados sobre el equivalente de la dermis)

obtenida en b), y continuación del cultivo en la interfaz aire-líquido hasta obtener un equivalente de epidermis pluriestratificada que contiene unos melanocitos, sobre un equivalente de dermis que contiene unos fibroblastos en una matriz de colágeno, que constituye un equivalente de piel.

- 5 Preferentemente, el equivalente de epidermis pluriestratificada forma unas capas córneas y los melanocitos están localizados en el asentamiento basal de la epidermis.

El equivalente de piel así obtenido puede ser extraído o utilizado sobre su soporte en diferentes procedimientos de evaluación.

- 10 La etapa a puede efectuarse con un colágeno de tipo I, en particular de origen bovino, o una mezcla de colágenos I y III, (un 30% aproximadamente con respecto al volumen final del retículo) en suspensión homogénea. Ventajosamente, se añaden otros constituyentes tales como laminina (en particular del 1 al 15% con respecto al volumen final), colágeno IV (en particular del 0,3% al 4,5% con respecto al volumen final) y/o entactina (en particular del 0,05% al 1% con respecto al volumen final) para obtener una suspensión homogénea.

- 15 Los fibroblastos se obtienen a partir de piel humana, ventajosamente de piel adulta. Puede tratarse de fibroblastos papilares y/o reticulares, solos o en mezcla, en cualquier proporción, procedente de piel caucásica, asiática o africana, de diferentes sitios anatómicos (espalda, cara, seno, parte superior de las manos, palmas, etc.) de zonas que han sido expuestas o no al sol. En un modo de realización particular, se utilizan unos fibroblastos que provienen de patologías cutáneas tales como, por ejemplo manchas de vejez (lentigo actínico), melasma, vitiligo, nevo, xeroderma pigmentoso o melanoma. Pueden también ser unos fibroblastos genéticamente modificados, que sobreexpresan o subexpresan algunos genes.

- 20 Se cultivan en un medio adecuado, conocido por el experto en la materia, después se pone en suspensión antes de la mezcla con la suspensión de colágeno y unos factores de crecimiento. La mezcla se incuba durante de 1 a 6 días, preferentemente durante 4 o 5 días, a una temperatura de aproximadamente 37°C, generalmente comprendida entre 36°C y 37,5°C. Ventajosamente, la mezcla se incuba en un soporte que no permite su adhesión, en particular que impide la adhesión de la mezcla a los bordes del soporte; tal soporte puede ser obtenido en particular por un tratamiento previo de su superficie, por ejemplo por revestimiento de dicho soporte por suero o albúmina bovina. Se obtiene así un gel de colágeno que se ha contraído libremente en varias direcciones, expulsando el medio nutritivo, y en el que se incrustan los fibroblastos.

- 25 Para realizar la etapa b, se utilizan unos queratinocitos que provienen de piel humana, preferentemente de piel adulta humana. Pueden provenir de piel caucásica, asiática o africana, de diferentes sitios anatómicos (la espalda, la cara, el seno, la parte superior de las manos, las palmas, etc.), de zonas que han sido expuestas o no al sol. En un modo de realización particular, se utilizan unos queratinocitos que provienen de patologías cutáneas, tales como por ejemplo manchas de vejez (lentigo actínico), melasma, vitiligo, nevo o melanoma. Pueden también ser unos queratinocitos genéticamente modificados, que sobreexpresan o subexpresan algunos genes.

- 40 Se puede obtener una preparación de queratinocitos según los métodos clásicos de cultivo celular.

En particular se podrá, a partir de un explante cutáneo extraído de un sujeto, proceder de la siguiente manera:

- 45 - se elimina el tejido subcutáneo con la ayuda de un escalpelo;
- se descontamina la muestra cutánea mediante un tratamiento antibiótico (por ejemplo: gentamicina);
- 50 - se separa la dermis de la epidermis mediante tratamiento proteolítico (por ejemplo: tripsina y dispasa) y después se disecciona;
- se favorece después la disociación de las células en presencia de una solución de un 0,05% de tripsina y un 0,02% de EDTA; y se neutraliza el efecto de la tripsina mediante la adición de un medio de cultivo DMEM que contiene un 10% de suero;
- 55 - se homogeneiza la suspensión celular, que se lava después en un medio de cultivo para queratinocitos según la técnica de Rheinwald y Green (Cell, 1975).

- 60 Los queratinocitos son amplificados antes de la inoculación según la técnica de Rheinwald y Green (Cell, vol 6, 331-344, 1975) por cultivo sobre un soporte nutritivo constituido de fibroblastos 3T3 en un medio adecuado conocido por el experto en la materia, en presencia de factores de crecimiento, en particular de aminoácidos, suero, toxina colérica, insulina, tri-yodo-tironina y solución tampón de pH. En particular, tal medio de cultivo podrá contener en particular al menos un factor de crecimiento mitogénico para los queratinocitos (por ejemplo epidermal growth factor (EGF) y/o keratinocyte growth factor (KGF), en particular KGF), insulina, hidrocortisona y facultativamente un antibiótico (por ejemplo: gentamicina, anfotericina B).

Ventajosamente, dicho medio podrá comprender además un suero o un extracto pituitario, por ejemplo de origen bovino, epinefrina, transferrina y/o aminoácidos no esenciales.

Los melanocitos son unos melanocitos que provienen de piel humana, joven o adulta, procedente de piel caucásica, asiática o africana, de diferentes sitios anatómicos (espalda, cara, seno, prepucio, parte superior de las manos, palmas, etc.), de zonas que han sido expuestas o no al sol. En un modo de realización particular, se utilizan unos melanocitos que provienen de patologías cutáneas, como por ejemplo manchas de vejez (lentigo actínico), melasma, vitiligo, nevo, melanoma. Pueden también ser unos melanocitos genéticamente modificados, que sobreexpresan o subexpresan algunos genes.

Son amplificados por cultivo en un medio adecuado en ausencia de éster de forbol compuesto de un medio de base tales como el DMEM/F12 o el MCDB153 y adicionado de factores de crecimiento específicos de los melanocitos (tales como, por ejemplo, bFGF, SCF, ET-1, ET-3, α MSH) y en particular en el medio M2 (Promocell) o en otros medios tal como el M254 (Cascades BiologicsTM).

Se preparan unas suspensiones celulares de melanocitos y de queratinocitos a partir de estos cultivos, y se mezclan para obtener unas suspensiones mixtas queratinocitos/melanocitos. La relación melanocitos/queratinocitos puede estar comprendida entre 1:10 y 2:1, y es generalmente de alrededor de 1:1.

El procedimiento de preparación de un equivalente de piel según la invención comprende por lo tanto unas etapas durante las cuales los queratinocitos y los melanocitos son amplificados separadamente en su propio medio de crecimiento. Las células son después separadas y co-inoculadas directamente en el equivalente dérmico a una densidad y relación definidas.

Este método implica una mayor flexibilidad y un control posible de cada uno de los tipos celulares durante la amplificación y durante la inoculación de las células epidérmicas sobre la dermis equivalente. Este control de la cantidad de cada uno de los tipos celulares inoculados, así como de las relaciones, representa una ventaja para la aplicación industrial en términos de control de la reconstrucción epidérmica y de reproducibilidad.

Se ve, por lo tanto, que según unas variantes de la invención, se pueden utilizar unos queratinocitos y unos melanocitos de piel normal, o bien utilizar unos melanocitos y unos queratinocitos que provienen de patologías cutáneas, incluso uno de los 2 tipos celulares que proviene de patologías cutáneas y el otro que corresponde a unas células normales, sanas.

Esta suspensión mixta está depositada sobre el equivalente de la dermis; el equivalente de la dermis está ventajosamente fijado sobre un soporte por un material biológico tal como el colágeno. La suspensión melanocitos/queratinocitos se deposita en un anillo o cualquier medio equivalente que permita su mantenimiento en una parte de superficie delimitada. Se añade un medio nutritivo líquido con el fin de recubrir la mezcla de células; este medio contiene unos factores de crecimiento conocidos por el experto en la materia, en particular EGF y/o KGF. El medio se cambiará regularmente y el cultivo se continúa en inmersión, generalmente durante una duración comprendida entre 2 y 10 días, en particular de 5 a 8 días, y de alrededor de 7 días. El medio contendrá ventajosamente KGF a partir del segundo día de inmersión e idealmente a partir del cuarto día de inmersión.

Como se ha indicado anteriormente, el equivalente de la dermis podrá comprender unos fibroblastos normales y/o de origen patológico. Estos diferentes tipos de dermis podrán ser asociados a un equivalente de epidermis preparado a partir de mezclas queratinocitos/melanocitos normales o patológicos, según las diversas variantes descritas anteriormente.

Las pieles son después, de manera conocida en sí misma, puestas en emersión para obtener la diferenciación de los queratinocitos y la formación de un equivalente de epidermis estratificada. Esta etapa c que corresponde al cultivo en inmersión en la interfaz aire-líquido se continúa hasta obtener una estructura diferenciada, en general durante aproximadamente 7 días. Sin embargo, la etapa c se puede continuar durante más tiempo, por ejemplo durante aproximadamente 28 días, conservando al mismo tiempo un equivalente de piel que presenta las características ventajosas precisadas anteriormente. El medio de cultivo nutritivo se cambiará regularmente. El equivalente de piel se extrae después para efectuar unos ensayos necesarios.

El procedimiento de preparación no utiliza sustancia mutágena, tal como el TPA o PMA, y las células no presentan modificaciones de tipo tumoral.

El modelo de piel susceptible de ser obtenido según la invención presenta una pigmentación constitutiva, y una funcionalidad que permite una pigmentación inducible, y esto para un modelo *in vitro*, en ausencia de cualquier injerto sobre un organismo vivo más completo.

El modelo de piel según la invención permite comprender la vía de regulación de la melanogénesis en su globalidad. Esto puede traducirse por una actividad directa sobre el melanocito, pero también por una actividad (pro o anti-pigmentante) medida por el queratinocito, el fibroblasto, el conjunto del contexto tridimensional y la influencia del

micro-entorno.

Es útil en particular en diferentes procedimientos de evaluación.

5 El agente a evaluar en la realización de los procedimientos según la invención podrá ser cualquier sustancia o compuesto químico o biológico, o cualquier tratamiento o fenómeno físico susceptible o apto para modular la pigmentación, directa o indirectamente. A título de ejemplo de tratamiento físico susceptible de ser evaluado según la invención, se puede mencionar una irradiación luminosa, por ejemplo UV o IR, en particular con un tratamiento LED (light emitting diode).

10 Por aplicación del agente al equivalente de piel, se entiende el hecho de provocar una interacción entre el agente a evaluar y al menos una parte del equivalente de piel, ya sea por contacto directo o por cualquier otro medio.

15 La invención se refiere en particular a un método de cribado de un agente susceptible de modular la pigmentación, pudiendo dicho agente ser un compuesto o una mezcla de compuestos, obtenido en particular por síntesis química o por extracción a partir de materia prima de origen vegetal o bacteriana/levadura. El procedimiento será en particular útil para cribar e identificar unos activos útiles en el campo de la cosmética. Los agentes pueden así ser todos moléculas, factores de crecimiento, derivados retinoicos, hormonas, extractos vegetales, que pueden intervenir sobre el compartimento epidérmico, dérmico o de unión. Los moduladores pueden ser unos siRNA o unos antagonistas.

El procedimiento podrá también ser útil para evaluar la modulación de la pigmentación de activos útiles en el campo farmacéutico, en particular en dermatología.

25 Según otro aspecto, el procedimiento según la invención permitirá evaluar las modificaciones de los diferentes factores implicados durante la aplicación de un agente que modula la pigmentación.

Por modular la pigmentación, se entiende según la invención modificar el nivel de pigmentación constitutiva o inducida de la piel, bien aumentándolo, o bien disminuyéndolo o inhibiéndolo, ya sea directa o indirectamente.

30 En el procedimiento según la invención, el equivalente de piel control se preparará y conservará en condiciones idénticas a las del equivalente de piel al que se aplica el agente a evaluar, y la medición de la pigmentación se efectuará en tiempos idénticos sobre los equivalentes de piel control y el que ha recibido el agente a evaluar.

35 Según un modo de realización, el agente a evaluar se aplica por contacto directo con al menos una parte del equivalente de piel. Según otro modo de realización, el agente puede también ser aplicado en el medio de cultivo de dicho equivalente de piel, incluso con un medio que provocará una interacción indirecta del agente con uno de los constituyentes del equivalente de piel. A título no limitativo de modo de aplicación alternativo del agente al equivalente de piel, se puede citar en particular la inyección, la mesoterapia o la iontoforesis.

40 El agente a evaluar puede ser aplicado en particular sobre un equivalente de piel que comprende al menos unos fibroblastos y/o unos queratinocitos y/o unos melanocitos que provienen de trastornos pigmentarios tales como las manchas de vejez (lentigo actínico).

45 Según uno de los modos de realización del procedimiento, el agente a evaluar es un agente que inhibe la pigmentación, del cual se desea medir la actividad despigmentante y/o anti-pigmentante. El procedimiento permite en particular evaluar el efecto de productos destinados a prevenir, ralentizar o reducir las manchas pigmentarias y/o otros trastornos pigmentarios.

50 El procedimiento permite, según uno de sus aspectos, evaluar un agente despigmentante, es decir evaluar la capacidad de dicho agente para disminuir la pigmentación constitutiva o inducida.

Según otro aspecto, el procedimiento tiene como objetivo evaluar un agente anti-pigmentante, es decir ensayar la capacidad de dicho agente para prevenir y/o reducir la pigmentación inducida.

55 Según un aspecto de la invención, el producto a evaluar estará aplicado en un modelo patológico, tal como se ha descrito anteriormente, por ejemplo de trastornos híper o hipopigmentados, tales como el vitiligo, el melanoma, el nevo, el lentigo actínico, el melasma, etc. a partir de células (melanocitos pero también queratinocitos o fibroblastos) aisladas de estas patologías o modificadas genéticamente ("silencing", sobreexpresión, etc.).

60 Según otro modo de realización del procedimiento según la invención, el agente a evaluar es un agente que favorece la pigmentación, solo o en combinación con la radiación UV.

65 Según un modo de realización particular, los equivalentes de piel son sometidos además a una exposición de radiaciones UV, siendo las radiaciones UV aplicadas antes, concomitantemente y/o después de la aplicación del agente a evaluar, o durante un periodo de tiempo equivalente sobre el equivalente de piel control.

El procedimiento según la invención será en particular útil para evaluar unos filtros solares.

5 La invención permitirá también evaluar el poder fotoprotector de un agente que modula la pigmentación. Se comparará entonces el nivel de daños inducidos por la exposición UV antes o después de la estimulación o inhibición de la pigmentación por el agente, en particular sobre la formación de las "células sunburn", de los daños al ADN, del estrés oxidativo, etc.

10 Como se ha indicado anteriormente, el equivalente de piel presenta una pigmentación constitutiva, y la pigmentación puede además aumentar por exposición a un agente pro-pigmentante y/o a radiaciones UV.

15 En particular, después de la estimulación por los UV a dosis equivalentes a la irradiación diaria o cenital recibidas por una piel humana de un individuo en condiciones fisiológicas, los fibroblastos del modelo según la invención producen unos factores citosolubles tales como unas citoquinas o unos factores de crecimiento que participan en la pigmentación y/o en su modulación.

20 Además, el número de melanocitos en la capa basal aumenta después de la estimulación por los UV, en particular en un factor de al menos 1,5, y su morfología se modifica: presentan un aumento de la dendricidad marcado por un aumento del número de dendritas así como su alargamiento; la cantidad de melanina aumenta también por síntesis y por aumento de la transferencia en las capas epidérmicas en un factor superior o igual a 1,5.

25 El aumento de la pigmentación se evalúa por medición de la variación de luminancia de la piel o cualquier otro método de cuantificación de la melanina como, por ejemplo, por medición en cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC, por espectrofotometría visible después de la disolución de la piel por el soleno o la sosa, por análisis de imágenes después de la coloración de la melanina por Fontana-Masson o por tratamiento de imágenes confocal o multifotónico.

30 El procedimiento según la invención permite evaluar el efecto de los UV sobre la pigmentación, que pueden actuar directamente sobre los melanocitos y/o indirectamente sobre los queratinocitos, que a su vez activarán los melanocitos (acción sobre la melanogénesis, la proliferación o la adhesión de los melanocitos).

Permite además, de manera única, evaluar el impacto sobre la pigmentación de los UV, que pueden actuar:

35 - sobre los fibroblastos, las proteínas de la matriz extracelular, y los elementos de la unión dermo-epidérmica. En respuesta, estos factores o modificaciones inducidas pueden estimular directamente los melanocitos y/o indirectamente los queratinocitos, que a su vez estimularán los melanocitos,

40 - en los queratinocitos, que a su vez modularán los fibroblastos, las proteínas de la matriz extracelular, y los elementos de la unión dermo-epidérmica, y en consecuencia la pigmentación.

Permite también ensayar unos productos o unas moléculas que interfieren con la pigmentación constitutiva o inducida por el sol (bronceado): frenar, inhibir o estimular, por vía tópica y sistémica

45 - despigmentantes, antipigmentantes

- propigmentantes (activadores de la pigmentación solos o con los UV)

50 Según una variante del procedimiento de evaluación según la invención, se realiza además un grupo de medición suplementario con unos productos de referencia conocidos por su actividad, que favorece o, al contrario, inhibe la pigmentación.

55 En esta variante, se compara además la pigmentación (i) del equivalente de piel *in vitro* al que se ha aplicado el agente a evaluar, con la (iii) de un equivalente de piel al que se ha aplicado una sustancia de referencia que favorece o inhibe la pigmentación.

60 Se podrá elegir por ejemplo seleccionar los agentes para los cuales la pigmentación es al menos superior o igual a la observada para la sustancia de referencia, en el caso de un agente que favorece la pigmentación. A la inversa, se podrán seleccionar los agentes para los cuales la pigmentación es inferior o igual a la obtenida con la sustancia de referencia en el caso de un agente despigmentante.

65 Se podrá también comparar la variación de pigmentación medida, por un lado, entre el equivalente de piel al que se ha aplicado el agente a evaluar y el equivalente de piel control (i)-(ii) y, por otro lado, el equivalente de piel al que se ha aplicado la sustancia de referencia y el equivalente de piel control (iii)-(ii); los agentes seleccionados serán aquellos para los cuales la modulación de la pigmentación será al menos igual a la medida para la sustancia de referencia.

Según un modo de realización particular, el equivalente de piel *in vitro* comprende al menos unos queratinocitos, melanocitos y/o fibroblastos modificados genéticamente, en particular por sobreexpresión de cDNA, por extinción de gen por mutagénesis dirigida, o por dsRNA, según la técnica de siRNA o expresión por shRNA.

5 Según otro modo de realización, el equivalente de la dermis comprende un equivalente de matriz extracelular, comprendiendo los constituyentes de dicho equivalente de matriz extracelular al menos un colágeno de tipo I, y los constituyentes han sufrido al menos una modificación con respecto a un equivalente de matriz extracelular de piel joven, sana. Puede tratarse, por ejemplo, de modificación de la naturaleza, de la cantidad o de las proporciones de las macromoléculas que constituyen el equivalente de la dermis, y/o de modificaciones químicas. Se podrá así hacer
10 variar la composición del equivalente de la dermis, y/o las proporciones en particular de colágeno IV, lamininas entactinas, fibonectina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos y/o ácido hialurónico presentes, más allá de las concentraciones clásicamente utilizadas e indicadas anteriormente. Los constituyentes del equivalente de matriz extracelular pueden, en particular, haber sufrido una modificación química seleccionada entre la glicación, la reticulación y la oxidación.

15 El procedimiento según la invención permite comprender la vía de regulación de la melanogénesis en su globalidad. Esto puede traducirse por una actividad directa sobre el melanocito, pero también por una actividad (pro o anti-pigmentante) medida por el queratinocito, el fibroblasto, el conjunto del contexto tridimensional y la influencia del microambiente.

20 Permite evaluar el impacto sobre la pigmentación de agentes que pueden actuar:

- sobre los fibroblastos, las proteínas de la matriz extracelular, y los elementos de la unión dermo-epidérmica. En respuesta, estos factores o modificaciones inducidos pueden estimular directamente los melanocitos y/o indirectamente los queratinocitos, que a su vez estimularán los melanocitos.

- en los queratinocitos, que a su vez modularán los fibroblastos, las proteínas de la matriz extracelular, y los elementos de la unión dermo-epidérmica y, en consecuencia, la pigmentación.

30 El procedimiento puede así ser útil para

* ensayar el impacto sobre la pigmentación de células procedentes de trastornos hiper o hipopigmentados, tales como el vitiligo, el melanoma, el nevo, el lentigo actínico, el melasma, etc. a partir de células (melanocitos, pero también queratinocitos o fibroblastos) aisladas de estas patologías o modificadas genéticamente ("silencing", sobreexpresión, etc.).

* estudiar la influencia de desregulaciones queratinocitarias o fibroblásticas (queratinocitos o fibroblastos patológicos) sobre la pigmentación,

40 * para estudiar la influencia de desregulaciones de la matriz extracelular sobre la pigmentación (glicación, derivación (cross-link), oxidación de las macromoléculas de la matriz extracelular, o modificaciones de la naturaleza, de la cantidad y de la proporción de las macromoléculas.

45 La invención se refiere también a un kit de producción de una piel reconstruida que comprende un soporte de la dermis, unos melanocitos y unos queratinocitos, así como los medios descritos anteriormente.

La invención se ilustrará más en detalle en los ejemplos siguientes. En estos ejemplos, se referirá a las figuras siguientes:

50 Figura 1: Piel reconstruida pigmentada humana

Figura 2: Piel reconstruida pigmentada humana con una pigmentación constitutiva unida al tipo de melanocito

55 Figura 3: Inducción de la pigmentación por los UV en la piel reconstruida pigmentada

Figura 4: Inducción de la pigmentación por alfa MSH en la piel reconstruida pigmentada

Ejemplo 1: Preparación de los equivalentes de piel

60 Preparación de los retículos (D-4)

Las dermis equivalentes se realizan con colágeno I bovino y unos fibroblastos humanos procedentes de la dermis.

65 Las dermis equivalentes se realizan con un colágeno I bovino y unos fibroblastos humanos procedentes de la dermis según las técnicas descritas por Asselineau *et al.* 1985 (Exp Cell Res. vol. 159, 536-539) y Bernerd y Asselineau 1997 (Dev Biol, vol 183, 123-138). Se realiza previamente un "coating" de la caja de Petri con MEM que contiene un

ES 2 596 811 T3

10% de suero.

5 Antes de verter la preparación de colágeno que contiene las células, una solución de laminina (3%/volumen final) de colágeno IV (1,5%/volumen final) y de entactina (0,35%/volumen final) se añade a la mezcla, que se agita vigorosamente. Esta suspensión se coloca en la estufa (37°C – 5% CO₂) para permitir al retículo contraerse.

Inoculación de los queratinocitos y de los melanocitos (D0)

10 La inoculación en queratinocitos y melanocitos sobre la dermis equivalente se realiza después de la contracción de los retículos.

Para ello, las células son amplificadas 7 días antes de la inoculación, en su medio de crecimiento respectivo:

15 Los melanocitos se amplifican en un medio de cultivo para melanocitos, el medio M2 (Promocell) en ausencia de cualquier éster de forbol.

Los queratinocitos se amplifican según la técnica de Rheinwald y Green, Cell, vol 6, 331-344, 1975 por cultivo sobre un soporte nutritivo constituido de fibroblastos 3T3.

20 Para la inoculación de los queratinocitos y de los melanocitos sobre la dermis equivalente, el retículo se pega en primer lugar en el fondo de una caja con la ayuda de una preparación a base de colágeno (para 2 retículos, 0,46 ml MEM 1,76 X + 0,09 ml FCS + 0,05 ml NaOH 0,1 N + 0,1 ml MEM Hepes 10% FCS + 0,3 ml de colágeno dializado).

25 Los melanocitos y los queratinocitos son tripsinados y las suspensiones celulares se ajustan a una concentración de 200.000 células/ml cada una con un medio constituido de MEM 10% FCS + 2 mM L-Glutamina +1 mM piruvato sódico, +1 X aminoácidos no esenciales, + un 0,2% penicilina estreptomycinina + un 0,1% antibiótico anti-micótico + 10 ng/ml EGF, 10⁻¹⁰ M toxina del cólera + 0,4 µg/ml hidrocortisona + 0,625µl/ml de SupplementMix (Promocell) = medio PRP).

30 Una suspensión mixta de melanocitos y de queratinocitos se prepara con 0,25 ml de la suspensión de queratinocitos y 0,25 ml de suspensión de melanocitos. La suspensión final que contiene por lo tanto 50000 queratinocitos y 50000 melanocitos se deposita dentro de un anillo (14 mm de diámetro) colocado en el retículo pegado. Alrededor del anillo se añaden 6 ml de medio PRP.

35 Las cajas se colocan en estufa a 37°C-5% de CO₂. Después de 2 horas, los anillos se retirados. El mismo medio de cultivo se renueva 2 días después.

Cuatro días después de la inoculación, el EGF (10 ng/ml) del medio PRP está sustituido por KGF (10 ng/ml).

40 Cultivo-emersión de las pieles reconstruidas pigmentadas (D7)

Después de 7 días de cultivo en inmersión, las pieles se ponen en emersión sobre una rejilla (interfaz aire-líquido). El medio se cambia cada 2 días.

45 Después de 7 días de emersión, las pieles que presentan una morfología muy parecida a la de la piel humana normal están listas para ser extraídas y analizadas, o pueden ser mantenidas en cultivo durante más tiempo para diferentes experimentos con un cambio de medio cada 2 días.

50 Ejemplo 2: Piel reconstruida pigmentada humana que contiene los 3 tipos celulares, melanocitos, queratinocitos y fibroblastos (figura 1)

La piel, después de 7 días de emersión, presenta una histología y una estructura tridimensional parecida a la de la piel humana.

55 Posee una epidermis estratificada y diferenciada, constituida de las diferentes capas celulares (basal, espinosa, granulosa) y una capa córnea.

La dermis comprende unos fibroblastos vivos incrustados en la matriz colagénica (figura 1A).

60 Los melanocitos se integran en la epidermis y muestran una morfología y una densidad similares a las de la piel normal (figura 1C reacción de DOPA sobre epidermis separada). Están bien localizados en la capa basal (figura 1B, inmunomarcado TRP1, línea blanca discontinua que indica la unión dermo-epidérmica), producen unos melanosomas y melanina que se transfieren a los queratinocitos próximos (figura 1D, coloración de la melanina por Fontana Masson).

65 Ejemplo 3: Piel reconstruida pigmentada humana con una pigmentación constitutiva unida al tipo de melanocito

(figura 2)

El modelo es capaz de integrar diferentes cepas de melanocitos de los menos pigmentados a los más pigmentados (modelos robustos) y el fenotipo de la piel reconstruida, más o menos pigmentado, corresponde al tipo de melanocito utilizado (mantenimiento de la fisiología): en efecto, cuanto más pigmentada sea la cepa de melanocito (de M03 a M504), más intenso será el color macroscópico de las pieles y la cantidad de melanina visible sobre fuente. Esta pigmentación macroscópica se traduce por una disminución de la luminancia (figura 2 luminancia).

Ejemplo 4: Inducción de la pigmentación por los UV en la piel reconstruida pigmentada (figura 3)

A partir de 7 días de emersión, las pieles reconstruidas se someten a los UV solares para inducir la pigmentación. Se utiliza un simulador solar: proporciona unos UVB y unos UVA con un espectro comparable al del sol (relación UVB/UVA de 14). Las pieles se exponen a los UV 3 veces, una vez cada 2 días. Las pieles se extraen 48h después de la última exposición. Se realizan unas condiciones de control en ausencia de exposición al simulador solar.

En las pieles sometidas a los UV, los melanocitos están siempre presentes y bien localizados en la capa basal (figura 3 inmunomarcado de TRP1, la línea blanca discontinua indica la unión dermoepidérmica). Están activados por los UV: más numerosos (figura 3, gráfica de densidad de melanocitos), más dendríticos y más reactivos a la reacción Dopa que en las pieles no expuestas. Un aumento de la cantidad de melanina se mide (x1.8) después de la coloración Fontana Masson en las pieles fotoexpuestas con respecto a las pieles control (figura 3 cantidad de melanina). Esta estimulación de la pigmentación por los UV se cuantifica mediante la medición de la luminancia (L^*): la disminución de la luminancia ($\Delta L = 4,38$) muestra que las pieles expuestas a los UV son más oscuras que las pieles no expuestas (figura 3 luminancia).

Ejemplo 5: Inducción de la pigmentación en la piel reconstruida pigmentada por un agente propigmentante (figura 4)

En presencia de un agente propigmentante conocido, el α MSH, puesto en el medio a partir de la fase de emersión y a la concentración de 50 nM, las pieles extraídas 18 días después son macroscópicamente más pigmentadas. La medición de la luminancia confirma este oscurecimiento ya que disminuye en 6,7 puntos entre las pieles no tratadas y las tratadas por α MSH (figura 4 luminancia).

Los melanocitos son más dendríticos y producen claramente más melanina visible por el marcado Fontana-Masson en presencia de α MSH (figura 4 coloración de Fontana Masson).

REIVINDICACIONES

1. Equivalente de piel *in vitro* caracterizado por que comprende al menos un equivalente de epidermis que comprende unos queratinocitos que forman al menos una capa basal y al menos una capa superficial y al menos un equivalente de la dermis que comprende un retículo libre de colágeno, y por que dicho equivalente de piel comprende unos melanocitos que producen melanina de manera constitutiva y unos fibroblastos vivos, estando todos los melanocitos en la capa basal del equivalente de la epidermis y distribuidos de manera homogénea en el equivalente de la epidermis, siendo la densidad de distribución de dichos melanocitos sustancialmente constante en un plano paralelo a la superficie de dicho equivalente.
2. Equivalente de piel *in vitro* según la reivindicación anterior, caracterizado por que en el equivalente de dermis el porcentaje de fibroblastos orientados longitudinalmente con respecto a la superficie del equivalente de dermis es inferior al 50%.
3. Equivalente de piel *in vitro* según al menos una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el equivalente de dermis comprende una matriz de colágeno de tipo I en la que están distribuidos los fibroblastos.
4. Equivalente de piel *in vitro* según al menos una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que los melanocitos son unos melanocitos que provienen de piel humana.
5. Equivalente de piel según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que su pigmentación aumenta por exposición a un agente pro-pigmentante y/o a radiaciones UV.
6. Procedimiento de preparación de un equivalente de piel según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
- a) puesta en contacto de fibroblastos, de una solución de colágeno, y después incubación durante un tiempo suficiente para obtener una matriz de colágeno contraído, en la que se distribuyen los fibroblastos, que constituyen un equivalente de la dermis,
- b) co-inoculación del equivalente de la dermis por una mezcla de queratinocitos y de melanocitos sobre el equivalente de la dermis obtenido en a), y cultivo en inmersión en un medio líquido,
- c) emersión del cultivo de queratinocitos y de melanocitos sobre el equivalente de dermis obtenido en b), y seguido del cultivo en la interfaz aire-líquido hasta obtener un equivalente de la epidermis pluriestratificada que contiene unos melanocitos, sobre un equivalente de la dermis que contiene unos fibroblastos en una matriz de colágeno, que constituye un equivalente de piel.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado por que los melanocitos son unos melanocitos humanos, obtenidos a partir de piel adulta, y previamente amplificados.
8. Procedimiento según una al menos de las reivindicaciones 6 o 7, caracterizado por que los queratinocitos y los fibroblastos se obtienen a partir de piel adulta humana.
9. Procedimiento según una al menos de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado por que la etapa a) se efectúa en presencia de colágeno IV, de laminina y/o entactina.
10. Procedimiento de evaluación de la capacidad de un agente para modular la pigmentación, caracterizado por que
- (a) se aplica dicho agente a un equivalente de piel *in vitro* según una al menos de las reivindicaciones 1 a 5,
- (b) se compara la pigmentación (i) del equivalente de piel *in vitro* al que se ha aplicado el agente a evaluar a la (ii) de un equivalente de piel control que no ha sido sometido al agente.
11. Procedimiento de evaluación según la reivindicación 10, caracterizado por que dicho agente se aplica al equivalente de piel por contacto directo con al menos una parte de dicho equivalente de piel.
12. Procedimiento de evaluación según una al menos de las reivindicaciones 10 a 11 caracterizado por que dicho equivalente de piel comprende al menos unos fibroblastos y/o unos queratinocitos y/o unos melanocitos que provienen de trastornos pigmentarios.
13. Procedimiento de evaluación según una al menos de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado por que dicho agente es un agente que inhibe la pigmentación.
14. Procedimiento según una al menos de las reivindicaciones 10 a 13, caracterizado por que el agente a evaluar se aplica sobre unas zonas del equivalente de piel que presentan una hiper-pigmentación.

15. Procedimiento según una al menos de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado por que dicho agente a evaluar es un agente que favorece la pigmentación.
- 5 16. Procedimiento de evaluación según una al menos de las reivindicaciones 10 a 15, caracterizado por que los equivalentes de piel se someten además a una exposición de radiaciones UV, siendo las radiaciones UV aplicadas antes, concomitantemente y/o después de la aplicación del agente a evaluar, o durante un periodo de tiempo equivalente sobre el equivalente de piel control.
- 10 17. Procedimiento de evaluación según una al menos de las reivindicaciones 10 a 16, caracterizado por que se compara además la pigmentación (i) del equivalente de piel *in vitro* al que se ha aplicado el agente a evaluar, a la (iii) de un equivalente de piel al que se ha aplicado una sustancia de referencia que favorece o que inhibe la pigmentación.
- 15 18. Procedimiento de evaluación según una al menos de las reivindicaciones 10 a 17, caracterizado por que el agente a evaluar modula la pigmentación por acción al menos en parte sobre los queratinocitos, los fibroblastos, los constituyentes de la matriz extracelular y/o la unión dermo-epidérmica.
- 20 19. Procedimiento de evaluación según una de las reivindicaciones 16 a 18, caracterizado por que el agente a evaluar comprende al menos un filtro solar.

Figura 1

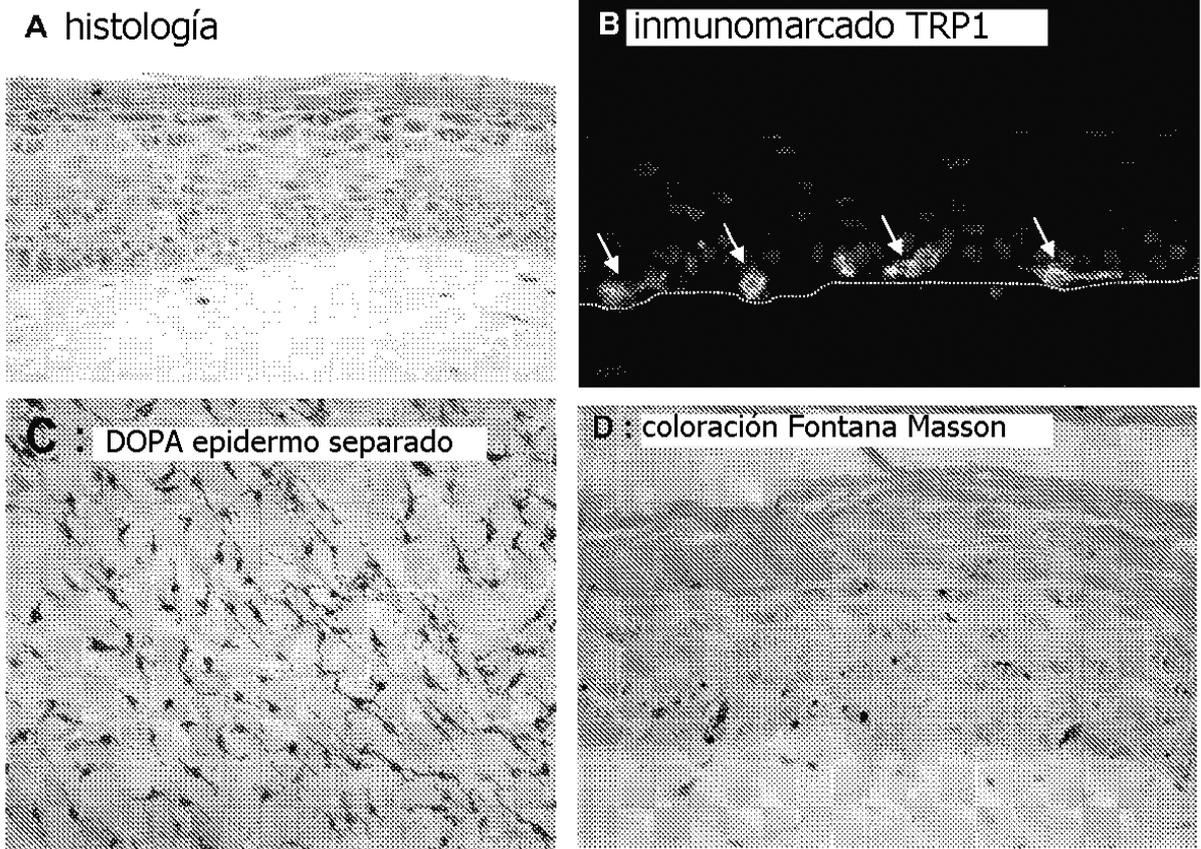


Figura 2

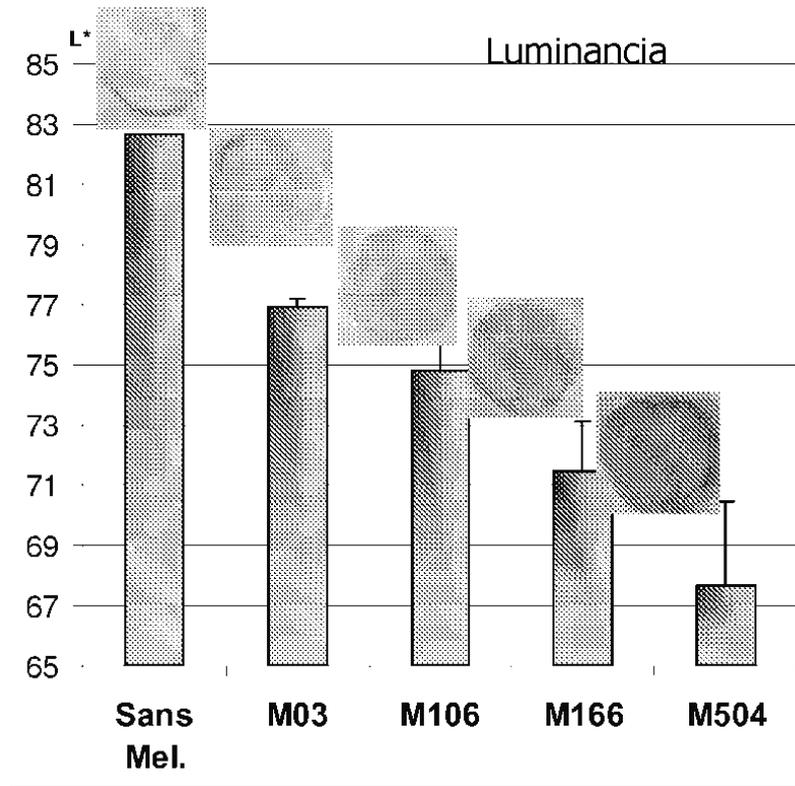


Figura 3

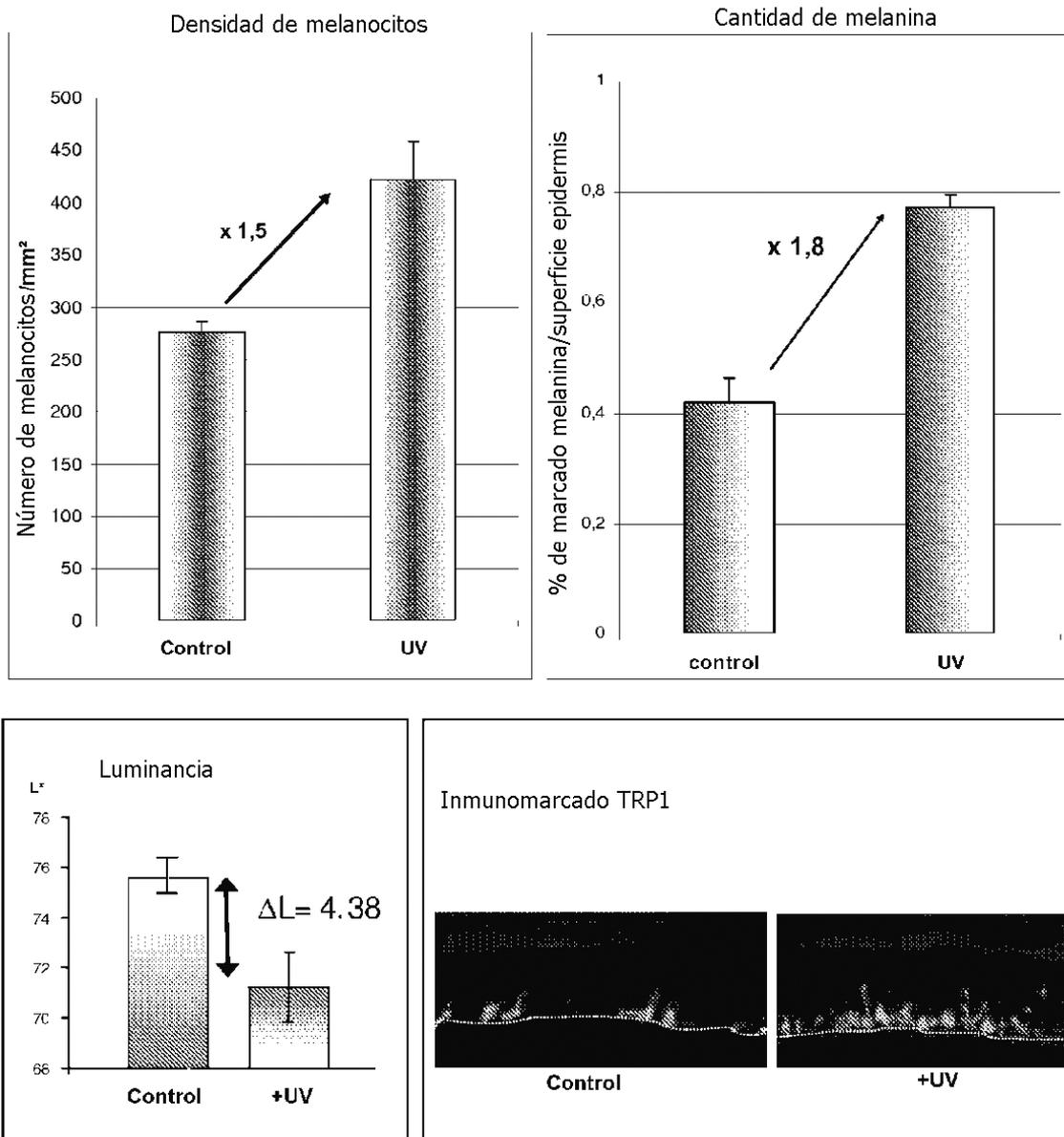
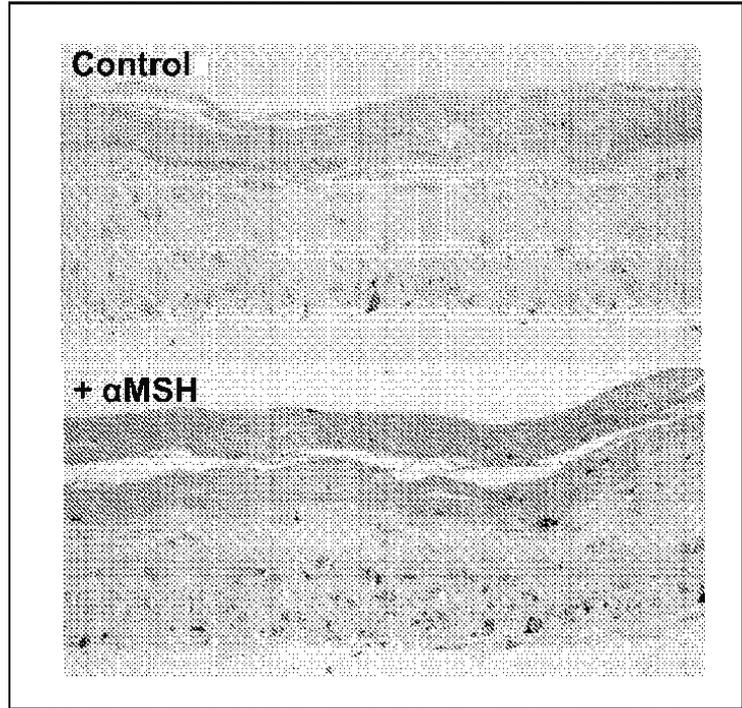
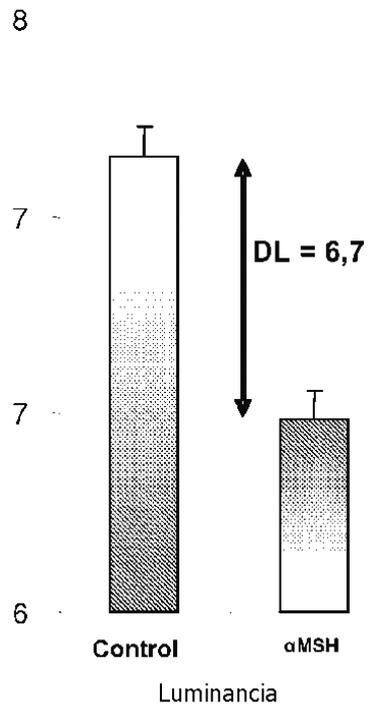


Figura 4



Melanina visualizada por Fontana Masson