(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 644 762**

(51) Int. CI.:

C12N 5/071 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2007 E 07111537 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 1878790**

(54) Título: **Equivalente de epidermis capaz de pigmentarse, obtenido a partir de células de la matriz, procedimiento de preparación y utilización**

(30) Prioridad:

13.07.2006 FR 0652984

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.11.2017

(73) Titular/es:

L'OREAL (100.0%)
14, RUE ROYALE
75008 PARIS, FR

(72) Inventor/es:

BAKKAR, KHALID y
ASSELINEAU, DANIEL

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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 epidermis capaz de pigmentarse, obtenido a partir de células de la matriz, procedimiento de preparación y utilización

La presente invención se refiere a una epidermis equivalente capaz de pigmentarse, que comprende unas células procedentes de la diferenciación de las células de la matriz, células localizadas en el bulbo piloso y forman un pequeño cúmulo celular alrededor de la papila dérmica, así como a su procedimiento de preparación.

La presente invención se refiere también a una piel reconstruida capaz de pigmentarse y que comprende eventualmente unos folículos pilosos, que comprende dicho equivalente de epidermis, a su procedimiento de preparación y a su utilización para evaluar el efecto de productos tópicos cosméticos, farmacéuticos o dermatológicos.

La piel reconstruida según la invención se podrá utilizar también para la preparación de injertos destinados a trasplantarse sobre mamíferos, más particularmente sobre pacientes humanos tales como los quemados graves.

Se busca elaborar, desde hace muchos 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 constituyen unos ensayos predictivos de la actividad de activos cosméticos y/o farmacéuticos o también unos efectos secundarios de ingredientes tópicos.

Así, se han podido elaborar unos modelos más o menos parecidos a la piel humana. Se pueden citar por ejemplo los modelos descritos en los siguientes documentos: EP 0 285 471, EP 0 285 474, EP 0 418 035, WO-A-90/02796, WO-A-91/16010, EP 0 197 090, EP 0 020 753, FR 2 665 175, FR 2 689 904.

De manera general, los modelos de piel reconstruida descritos en estos documentos se preparan a partir de fibroblastos de la papila dérmica y/o de células extraídas en la capa epitelial externa (también denominada ORS por Outer Root Sheath), debido a la facilidad de obtención de estas células. En efecto, estas células se extraen cuando se arranca un cabello y son capaces de fabricar una epidermis cuando se depositan sobre un soporte, frecuentemente un equivalente de dermis, y se cultivan en un medio de cultivo adecuado.

Cuando los queratinocitos provienen de ORS, los pocos melanocitos que pueden estar presentes en estos modelos de epidermis son poco numerosos y no permiten obtener un modelo de piel pigmentada satisfactorio (Lenoir MC, Bernard BA, Pautrat G, Darmon M, Shroot B. Outer root sheath cells of human hair follicle are able to regenerate a fully differentiated epidermis in vitro.Dev Biol. 1988 Dec;130(2):610-20 y Limat A, Breitkreutz D, Hunziker T, Boillat C, Wiesmann U, Klein E, Noser F, Fusenig NE. Restoration of the epidermal phenôtype by follicular outer root sheath cells in recombinant culture with dermal fibroblasts.Exp Cell Res. Junio de 1991;194(2):218-27).

Con el objetivo de obtener unos modelos de pieles pigmentadas, se conoce añadir a un cultivo de queratinocitos unos melanocitos epidérmicos disponibles comercialmente (FR 2 665 175). Sin embargo, la naturaleza de la pigmentación obtenida con tal modelo no reproduce de manera satisfactoria la pigmentación natural.

Las células de la matriz, que están localizadas en el bulbo piloso y forman un pequeño cúmulo celular alrededor de la papila dérmica, están principalmente constituidas de precursores de queratinocitos que constituyen una base germinativa y que proliferan rápidamente para diferenciarse formando el tallo piloso, desempeñando así una función esencial en el ciclo piloso. Desde el principio de la fase anágena hasta el final de ésta, estas células matriciales proliferarán hasta la fase catágena, después desaparecerán en la fase telógena. (Ebling FJ. The biology of hair. Dermatol Clin. Julio de 1987;5(3):467-81. Review; Saitoh M, Uzuka M, Sakamoto M. Human hair cycle. J Invest Dermatol. Enero de 1970;54(1):65-81). La matriz comprende también unos melanocitos foliculares que son responsables de la pigmentación del cabello.

La proliferación y la diferenciación de estas células de la matriz, células localizadas en el bulbo piloso y forman un pequeño cúmulo celular alrededor de la papila dérmica, se controlan por la papila dérmica (Botchkarev VA, Kishimoto J. Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling. J Invest Dermatol Symp Proc. Junio de 2003;8(1):46-55. Review).

De manera sorprendente, la solicitante ha puesto en evidencia que el cultivo en una dermis artificial de las células de la matriz células localizadas en el bulbo piloso y forman un pequeño cúmulo celular alrededor de la papila dérmica podía conducir a una epidermis completa, que comprende en particular unos queratinocitos y unos melanocitos.

Aunque los melanocitos foliculares presentes en la matriz estén normalmente destinados a teñir el cabello, resultan también capaces de crecer en un entorno epidérmico, y también funcionales para pigmentar unas epidermis producidas *in vitro* según el procedimiento de la presente invención, pero también *in vivo* después del injerto. Así, la solicitante ha elaborado un nuevo procedimiento de preparación de un modelo de piel capaz de pigmentarse a partir exclusivamente de células del cabello, las células de la matriz, células localizadas en el bulbo piloso y que forman un

pequeño cúmulo celular alrededor de la papila dérmica.

Este procedimiento se muestra ventajoso, ya que permite obtener un modelo de piel que comprende una epidermis completa utilizando un único tejido, la matriz, células localizadas en el bulbo piloso y que forman un pequeño cúmulo celular alrededor de la papila dérmica que aporta todos los tipos celulares de la epidermis, además, las células son compatibles entre sí, en un estado poco diferenciado que les permite multiplicarse formando un tejido epidérmico que reproduce las características de una epidermis viva.

Este procedimiento de preparación de equivalente de epidermis no necesita el pretratamiento que tiene como objetivo enriquecer el tejido en un tipo celular dado.

Las células de la matriz se pueden utilizar sea cual sea la fase en la que se encuentra el cabello: anágena, catágena o telógena.

Finalmente, este procedimiento necesita un número muy bajo de células (se inoculan aproximadamente 1000 células) con respecto a las técnicas ya descritas en la bibliografía, que utilizan unos queratinocitos de ORS (que, por su parte, necesitan la inoculación de aproximadamente 33000 células) y siendo la cinética de colonización de las células de la matriz elevada, por lo tanto se acelera la preparación de las epidermis reconstruidas.

Una dificultad a superar reside en la obtención de las células de la matriz, células localizadas en el bulbo piloso y que forman un pequeño cúmulo celular alrededor de la papila dérmica, de calidad y en cantidad suficiente.

En condiciones normales, cuando un cabello cae o después del arranque, el compartimiento de la papila dérmica-células de la matriz permanece en la dermis del cuero cabelludo. Este compartimiento iniciará el desarrollo de un nuevo ciclo piloso y volverá a dar un nuevo folículo. De este modo, arrancar un cabello no permite obtener estas células matriciales, por lo que se necesitará realizar una biopsia del cuero cabelludo, y después aislar estas células mediante microdisección.

Además de ser difíciles de aislar, las células de la matriz, células localizadas en el bulbo piloso y que forman un pequeño cúmulo celular alrededor de la papila dérmica, son también difíciles de cultivar, al menos por las razones siguientes:

a) su número es particularmente bajo;

b) se disocian fácilmente, por lo tanto es difícil localizarlas durante la microdisección;

c) no adhieren sobre un soporte plástico;

d) son difíciles de amplificar ya que tienden a formar unas pequeñas colonias y no un cultivo primerio en la confluencia necesaria para la preparación de una epidermis equivalente.

Algunos autores han propuesto cultivar estas células en co-cultivo con los fibroblastos de la papila. El inconveniente de este método es que el cultivo obtenido no es homogéneo, las células de la matriz están contaminadas con los fibroblastos dérmicos de la papila utilizados en co-cultivo (Reynolds AJ, Lawrence CM, Jahoda CA Human hair follicle germinative epidermal cell culture. J Invest Dermatol. Octubre de 1993;101(4):634-8).

Luo *et al.* han propuesto una técnica de microdisección, después de cultivo de las células de la matriz sobre soporte plástico (Luo *et al.*: Methods for culturing hair follicle epithelial matrix cells; Reg. number: H1610; 5 de noviembre de 1996). Sin embargo, esta técnica de microdisección conduce a rendimientos muy bajos en células de la matriz y el cultivo de estas células permite únicamente obtener una monocapa de células no diferenciadas que no puede servir de modelo de piel completa.

La solicitante ha aislado las células de la matriz, células localizadas en el bulbo piloso y que forman un pequeño cúmulo celular alrededor de la papila dérmica, y ha elaborado un procedimiento de cultivo de estas células sobre una dermis equivalente, estas células proliferan rápidamente y se diferencian para formar una epidermis completa.

De manera preferida, el tejido matricial se obtiene mediante una nueva técnica de microdisección que preserva la cantidad y la integridad de las células, no están separadas las unas de las otras. Esta microdisección permite aislar y conservar la totalidad de las células de la matriz sobre un soporte de dermis equivalente.

Con esta técnica de disección, las células de la matriz se adhieren más fácilmente sobre el equivalente de la dermis, proliferan uniformemente y se diferencian. El equivalente de epidermis obtenido podrá además comprender unos tipos celulares diferentes de los queratinocitos tales como los melanocitos.

Las técnicas conocidas de preparación de epidermis capaces de pigmentarse utilizan unos queratinocitos de ORS a los que se añaden unos melanocitos después de un pre-cultivo *in vitro*, sin embargo, una consecuencia de este pre-

cultivo es que la diferenciación de las células se realiza fuera del contexto epidérmico, los melanocitos no desarrollan una cantidad de dendritas comparables a los melanocitos observados *in vivo*. Su introducción posterior en el modelo de epidermis no garantiza una distribución homogénea de los melanocitos a nivel de la capa basal de queratinocitos, ni una funcionalidad óptima de estos melanocitos. Finalmente, los melanocitos obtenidos son generalmente bipolares (dos dendritas) y tienen por lo tanto una baja capacidad de transmisión de los granos de melaninas a los queratinocitos.

Así, según uno primero de sus objetivos, la presente invención se refiere a la utilización de células de la matriz para la preparación de un equivalente de epidermis pigmentado.

Se entiende por “células de la matriz” las células localizadas en el bulbo piloso y que forman un pequeño cúmulo celular alrededor de la papila dérmica (Ebling FJ. The biology of hair.Dermatol Clin. Julio de 1987;5(3):467-81. Review; Saitoh M, Uzuka M, Sakamoto M. Human hair cycle. J Invest Dermatol. Enero de 1970;54(1):65-81). Estas células podrán ser muestreadas, amplificadas y conservadas en bancos de tejidos.

Para preservar la integridad del tejido matricial, estas células se podrán extraer según el procedimiento siguiente: unos folículos pilosos son colocados en una caja Petri que comprende un medio de cultivo mínimo adicionado del 2% de antibiótico, unos aminoácidos esenciales. El epitelio del bulbo se separa de la papila dérmica y de la funda conjuntiva, después la región bulbosa se corta encima de la papila dérmica. El fragmento obtenido se coloca después en una dermis equivalente en el interior de un anillo estéril, después las células de la matriz se cultivan en un medio detallado en el procedimiento de preparación de la epidermis a continuación y en el ejemplo 1.

Las células de la matriz aportan todas las células necesarias para la preparación de una epidermis capaz de pigmentarse, así, la utilización de células de la matriz para la preparación de un equivalente de epidermis no necesita ningún otro tipo de célula y se podrá realizar con la exclusión de cualquier aportación de célula exógena.

Según un segundo objeto, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un equivalente de epidermis que comprende al menos una etapa de cultivo de células de la matriz sobre un equivalente de dermis.

El “equivalente de epidermis”, también designado como modelo de epidermis, obtenido según el procedimiento de la invención es un tejido completo que reproduce las características de una epidermis *in vivo*, a saber, un epitelio multicapa estratificado queratinizado, que comprende al menos unos queratinocitos, con unas células basales en contacto con una dermis equivalente y cuyos estratos superiores demuestran la diferenciación terminal que reproduce un *stratum granulosum* y un *stratum corneum* histológicamente normales. Este equivalente de epidermis comprende también unos melanocitos funcionales, es decir capaces de transferir unos melanosomas (granos de melanina) a los queratinocitos, la observación histológica de la epidermis muestra una organización de los melanocitos a nivel de la capa basal que reproduce así fielmente la estructura normal de la piel.

Una característica de este modelo de epidermis es un número elevado de melanocitos que comprenden numerosas dendritas (tres o más), que engloban regularmente los queratinocitos basales, apareciendo estas características muy claramente durante la observación de una sección transversal de modelo de epidermis (véase en particular la figura 3 en la que se puede ver que los queratinocitos de la capa basal están rodeados de una capa gruesa y oscura que corresponde a los melanocitos).

Estas características permiten en particular distinguir un modelo de epidermis obtenido según el procedimiento de la invención con respecto a los procedimientos del estado de la técnica. En efecto, las epidermis preparadas según los procedimientos clásicos (adición ulterior de melanocitos) comprenden un número bajo de melanocitos, posicionados entre unos queratinocitos basales con dos dendritas.

Preferentemente, el equivalente de epidermis comprende también unas células de Langerhans y/o unas células de Merkel.

Además, esta epidermis es capaz de pigmentarse de manera uniforme.

En efecto, parece que el modelo de epidermis según la invención presenta una pigmentación homogénea con unos granos de melanina regularmente posicionados en el polo superior de los queratinocitos, así como en el *stratum corneum*. Esta distribución es ventajosa con respecto a los modelos de epidermis de la técnica anterior, que presentan menos granos de melaninas distribuidos irregularmente en la epidermis.

Más específicamente, el procedimiento según la invención se caracteriza por que comprende:

a- la inoculación de células de la matriz, células localizadas en el bulbo piloso y forman un pequeño cúmulo celular alrededor de la papila dérmica, sobre un equivalente de dermis que descansa sobre un soporte sumergido en un medio de cultivo;

b- la multiplicación de las células de la matriz, células localizadas en el bulbo piloso y forman un pequeño cúmulo

celular alrededor de la papila dérmica, a la superficie de dicho equivalente de dermis;

c- la elevación de dicho soporte de tal manera que el medio de cultivo no recubra la cara superior del equivalente de epidermis en desarrollo.

En particular, el soporte puede ser una rejilla-soporte.

El "equivalente de dermis" o soporte dérmico, utilizado según la invención, puede ser uno cualquiera de los descritos en la técnica anterior (en particular los descritos en el documento FR 2 665 175). A título de ejemplo, se pueden citar como soporte los retículos contraídos colágeno/fibroblastos, la dermis previamente desepidermizada (Prunieras *et al.*, Ann. Chir. Plast., 1979, 24, n°4, 357-362), un soporte inerte seleccionado entre el grupo que consiste en una membrana sintética semi-permeable (en particular los descritos en el documento FR 2 833 271), las membranas artificiales como, por ejemplo, los filtros de marca Millipore, los sustitutos subcutáneos a base de colágeno, o cualquier otro soporte que expositivo al aire compatible con la viabilidad y la adhesión celular.

Preferentemente, la dermis equivalente consistirá en un retículo de colágeno en el que se distribuyen unos fibroblastos dérmicos que están en un estado de diferenciación equivalente al observado *in vivo*.

Este tipo de equivalente de dermis se puede preparar según diferentes procedimientos, por ejemplo tal como se describe en el documento EP 0 418 035, en WO 00/29553 o también EP 0 285 471.

Este procedimiento podrá comprender las etapas siguientes de cultivo:

a) de células contráctiles recogidas, por ejemplo, a partir de cultivos monocapas realizados sobre un medio nutritivo inoculado por unos fragmentos de tejido animal o humano, con

b) un medio nutritivo adicionado de componentes de la matriz extracelular de la dermis, formando dicha mezcla un gel que se contrae expulsando el medio nutritivo para formar el equivalente de dermis.

Como célula contráctil, se pueden utilizar unos fibroblastos; se utiliza, ventajosamente, como células contráctiles, unos fibroblastos dérmicos obtenidos a partir de donantes humanos sanos y extraídos, a partir de los cultivos monocapas, por tripsinación controlada. Como se explica a continuación, la elección de las células contráctiles condicionará la diferenciación de las células de la matriz, su elección se deberá realizar por lo tanto en función de la calidad de la epidermis equivalente deseada.

Las células de la matriz constituyen un depósito de células pluripotentes capaces, en función del contexto celular creado por el equivalente de dermis, de formar piel o cabello, ya que el fibroblasto del equivalente de dermis puede dirigir el programa de diferenciación del queratinocito.

Así, si el equivalente de dermis sobre el cual descansan las células de la matriz contiene mayoritariamente unos fibroblastos de piel interfolicular, debido a la interacción entre los fibroblastos y los queratinocitos de la matriz, los queratinocitos de la matriz formarán un equivalente de epidermis interfolicular.

El fibroblasto de piel podrá ser un fibroblasto papilar o reticular o la suma de los dos.

Para la preparación de un modelo de epidermis capaz de pigmentarse, se podrá utilizar un fibroblasto interfolicular.

La realización del procedimiento de preparación según la invención consiste en inocular el equivalente de dermis, o sustrato dérmico, con las células de la matriz.

Se depositan unas matrices enteras sobre la dermis equivalente. El número de matrices depositadas depende de la superficie del equivalente de la dermis. Por ejemplo, cuando los equivalentes dérmicos se preparan en una placa de 60 mm, éstos, después de la contracción, tienen una superficie de 2 cm^2 aproximadamente y se inoculan con aproximadamente 10 matrices.

Se mantienen unas condiciones que permiten la multiplicación de las células de la matriz en la superficie de dicho sustrato, estando el desarrollo de este cultivo de células de la matriz favorecido por la utilización de al menos un medio nutritivo mínimo, preferentemente un medio 3F yal como se describe en el ejemplo 1 al contacto de dichas células de la matriz.

Ventajosamente, después de la inoculación de las células de la matriz sobre el sustrato, se mantiene, preferentemente entre 5 y 6 días, el sustrato implantado en inmersión en este medio nutritivo que recubre las células de la matriz.

Después, se coloca el equivalente de dermis en contacto con aire, para ello, se le coloca en una rejilla-soporte elevada con respecto al fondo del receptáculo y se ajusta el nivel del medio nutritivo, para que la rejilla-soporte esté

simplemente cubierta, pero que el medio nutritivo no recubra la cara superior del equivalente de piel en desarrollo.

Según una variante, el procedimiento según la invención podrá además comprender una etapa suplementaria que tiene como objetivo inducir a la pigmentación del equivalente de epidermis. Podrá tratarse de una estimulación por radiación UV.

El equivalente de piel según la invención así constituido está bien diferenciado, bien organizado. Es también globalmente homogéneo.

Se entiende por “equivalente de piel”, también denominado piel reconstruida en lo sucesivo, el conjunto equivalente de epidermis que reposa sobre una dermis equivalente.

El equivalente de epidermis así preparado comprende al menos unos queratinocitos y unos melanocitos.

El equivalente de epidermis puede también comprender unas células de Langerhans y/o unas células de Merkel, estas células se podrán añadir en particular sobre el soporte durante la inoculación de las células de la matriz.

Según una variante del procedimiento según la invención, es posible preparar un equivalente de piel capaz de reconstituir uno o varios folículos pilosos utilizando un equivalente de dermis que comprende unos fibroblastos de la papila dérmica y/o de los fibroblastos de la funda conjuntiva y/o de las papilas dérmicas enteras.

Si se elige incluir en el equivalente de dermis unos fibroblastos del cabello tales como los fibroblastos de la papila o los fibroblastos de la funda conjuntiva o toda la papila o la funda conjuntiva o fracciones de la funda conjuntiva (Reynolds AJ, Lawrence CM, Jahoda CA Human hair follicle germinative epidermal cell culture. J Invest Dermatol. Octubre de 1993;101(4):634-8), debido a la interacción entre estos fibroblastos y las células de la matriz, los queratinocitos reproducirán la morfogénesis del pelo o del cabello (tallo piloso).

Otro objeto de la presente invención se refiere a un equivalente de epidermis capaz de pigmentarse que comprende unos melanocitos que comprenden tres dendritas o más, que rodean los queratinocitos basales, caracterizado por que está constituido de células procedentes de la proliferación y de la diferenciación de las células de la matriz que comprende al menos unos queratinocitos y melanocitos.

Se trata más específicamente de un equivalente de epidermis preparado según el procedimiento de la invención, el equivalente de epidermis presenta la particularidad de poder pigmentarse uniformemente y de manera homogénea reproduciendo la pigmentación de una piel sana al mismo tiempo *in vitro* e *in vivo* después del injerto.

La pigmentación del modelo de piel o de epidermis (síntesis de melanina por los melanocitos) se puede cuantificar mediante cualquier método conocido, en particular mediante una coloración denominada de Fontana Masson.

A título de ejemplo y sin carácter limitativo, la pigmentación puede observarse y/o cuantificarse por:

- medición del número de granos de melanina en un cierto número de cortes verticales coloreados por análisis de imágenes asistida por ordenador;

- medición del contenido en melanina de los homogeneizados de cultivos mediante técnicas bioquímicas;

- medición de la actividad de la tirosina epidérmica contenida en los cultivos mediante técnicas bioquímicas;

- medición del número de melanocitos presentes y de su localización en los cultivos por coloración con DOPA, mediante técnicas de inmunofluorescencias indirectas o de microscopía electrónica;

- medición instrumental del color por colorimetría que tiene en cuenta el equilibrio variable entre los diferentes pigmentos y sus estados fisicoquímicos:

- cualquier otra técnica que permite evaluar precisamente la intensidad de la pigmentación obtenida.

La solicitante ha podido poner en evidencia también que después de un injerto, el equivalente de epidermis presentaba ventajosamente esta capacidad para pigmentarse. Además, la pigmentación obtenida es homogénea, uniforme e idéntica a la de la piel de origen.

Sea cual sea la variante de procedimiento elegida para la preparación de la piel equivalente, el equivalente de epidermis y/o de piel es un modelo tridimensional útil como ensayo alternativo para todos los ensayos que necesitarían unos experimentos animales, por ejemplo, los estudios de liberación de activos, de su penetración y/o absorción y/o biodisponibilidad cutánea, los estudios de tolerancia, de compatibilidad, de eficacia de activos y/o de ingredientes cosméticos, farmacéuticos o dermatológicos.

El equivalente de epidermis y/o de piel según la invención se puede utilizar también en procedimientos automatizados de cribados de productos cosméticos, farmacéuticos o dermatológicos para identificar nuevos activos.

El equivalente de piel según la invención permite también el estudio fisiológico del mecanismo de pigmentación de la piel así como del crecimiento del cabello y/o del pelo.

El equivalente de epidermis según la invención que reproduce la pigmentación natural de la piel, es particularmente ventajoso para ensayar unos activos despigmentantes, unos activos pigmentantes, o unos filtros solares.

Las aplicaciones pueden revelarse particularmente útiles para el fotoenvejecimiento o el envejecimiento, en particular cuando se buscan unos productos capaces de aclarar “manchas de envejecimiento” o lentigos, o más generalmente aclarar el color de la piel.

Los equivalentes de epidermis que comprenden unos folículos pilosos permitirán realizar en particular unas cinéticas de crecimiento del pelos o del cabello, y por lo tanto cualquier estudio que necesita numerosos cabellos vivos y tan completos como sea posible en un contexto *in vivo*, tal como el estudio del ciclo del cabello o de los factores capaces de influenciar este ciclo que va hasta el estudio de activos que favorecen el crecimiento del cabello, de activos que permiten luchar contra la caída del cabello o también de activos que ralentizan el crecimiento del pelo.

Debido a la presencia de melanocitos activos, este modelo permite también el estudio de activos que pueden influenciar el color del cabello y/o del pelo, en particular por la inducción o la inhibición de producción de melanina.

Finalmente, este modelo permite también estudiar el efecto de activos destinados a modificar la estructura del pelo y/o del cabello.

Los procedimientos de cribado de producto para identificar nuevos activos comprenden una etapa (a) de puesta en contacto de dicho producto a ensayar con una epidermis equivalente según la invención, después una etapa (b) de lectura del efecto del producto sobre el equivalente de epidermis.

Según una variante del procedimiento de cribado según la invención, se utilizará un modelo de piel completo.

Preferentemente, para la realización de la etapa (a), el producto a ensayar se aplicará de manera tópica, por ejemplo formulado en formulaciones tópicas clásicas o bien introducido en el medio de cultivo.

Según el efecto buscado, la etapa (b) podrá consistir, de manera no exhaustiva, en comparar con un equivalente de epidermis según la invención que no ha estado en contacto con el producto a ensayar (control) y/o en observar una modificación de la intensidad de la pigmentación o de la despigmentación de la epidermis equivalente, eventualmente por marcación y cuantificación de la melanina (por ejemplo por coloración según el método de Fontana Masson), una aceleración o una disminución del crecimiento del tallo piloso, eventualmente un efecto sobre la producción de las queratinas del cabello.

La etapa (b) se podrá realizar también mediante el análisis de marcadores epidérmicos y/o dérmicos, tales como proteínas de estructura, en particular, unas proteínas de diferenciación epidérmica y macromolecular de la matriz dérmica.

Los parámetros medidos sobre las epidermis o pieles equivalentes puestos en contacto con el producto a ensayar se compararán con los medidos sobre epidermis o pieles equivalentes controles cultivados en las mismas condiciones, pero que no habrán recibido el producto a ensayar.

Cuando el modelo de epidermis o de piel comprende unas células del sistema inmunitario, las células de Langerhans, los ensayos de cribado se podrán destinar también a identificar unos productos susceptibles de inducir unas irritaciones o unas reacciones alérgicas.

Para ello, los parámetros observados en la etapa (b) del procedimiento de cribado se seleccionarán entre:

- la citotoxicidad;

- la liberación de mediadores de la inflamación;

- los daños celulares revelados por histología o por la liberación de lactato deshidrogenasa (marcador de la integridad membranaria de los queratinocitos) (Roguet *et al.* J Tox *in vitro* 6:303 (1992) y Ponec M en *In Vitro* Toxicology. Ediciones Rougier, Maibach y Golberg p 107, 1994);

- la modificación de la síntesis y de la composición de los lípidos de la piel, particularmente las ceramidas y los fosfolípidos (JID 86,598 (1986));

- la estratificación de las células epiteliales como marcador de su diferenciación (M Prunieras & R Roguet Toxicologie cellulaire *in vitro* methodes & applications. Ediciones M adolphe, A Guillouzo y F Marano. Ediciones INSERM 1995 p 191-236) (DUFFY PA, FLINT OP: *In vitro* dermal irritancy test. In CK Atterwill and CE Steele (Ediciones): *In vitro* methods in Toxicology Cambridge Univ. Press Cambridge 1987, p. 279-297)(Use of skin cell culture for *in vitro* assessment of corrosion and cutaneous irritancy, Roguet, Cell Biology and Toxicology, 1999:15, 63-75).

El equivalente de epidermis encontrará también unas aplicaciones para la preparación de injertos destinados a transplantarse en pacientes que presentan un desorden cutáneo tal como una quemadura, un defecto de cicatrización, una úlcera cutánea, psoriasis, un desorden pigmentario tal como el vitíligo, la canicie.

La aplicación se refiere también a cualquier patología que se traduce por anomalías de pigmentación graves, para las cuales una corrección por injerto se puede considerar, por ejemplo hipomelanosis o hipermelanosis congénitas o adquiridas (Na GY, Seo SK, Choi SK, Single hair grafting for the treatment of vitiligo. J Am Acad Dermatol. Avril de 1998; 38(4):580-4.) unas causas accidentales, por ejemplo una piel que se ha quemado en una gran superficie del cuerpo de la cara (por ejemplo: los grandes quemados); unas causas quirúrgicas, por ejemplos una piel que ha sufrido una escisión para el tratamiento de un nevo (Kumagai *et al.*, Ann Plast Surg. 39: 483-488, 1997), o de un tatuaje (Kumagai *et al.*, An Plast Surg. 33: 385-391, 1994).

La aplicación se refiere también a desórdenes relacionados con la desnaturalización de la matriz.

El equivalente de piel según la invención permite también realizar unos autoinjertos cuando se prepara a partir de fragmentos de escalpe de cuero cabelludo después de la extracción por microdisección de las matrices del cabello que conduce a la formación rápida *in vivo* de una epidermis uniformemente pigmentada. Estos autoinjertos pueden relacionarse con las úlceras, pero también las quemaduras graves (Limat A, French LE, Blal L, Saurat JH, Hunziker T, Salomon D. Organotypic cultures of autologous hair follicle keratinocytes for the treatment of recurrent leg ulcers. J Am Acad Dermatol. Febrero de 2003; 48(2):207-14.)

En este caso específico, la piel reconstruida permite también realizar múltiples microinjertos en pacientes que sufren vitíligo a fin de repigmentar unas zonas deficitarias en coloración, en condiciones mejores que las que existen que utilizan células de ORS que contienen pocos melanocitos.

Para todas estas aplicaciones, el equivalente de piel según la invención presenta la ventaja de pigmentarse naturalmente. La zona cutánea injertada es así más estética y reproduce un comportamiento fisiológico normal durante la exposición al sol.

Ejemplo I – Preparación de un modelo de piel pigmentada

Asselineau D, Bernard B, Bailly C, Darmon M. Epidermal morphogenesis and induction of the 67 kD keratin polypeptide by culture of human keratinocytes at the liquid-air interface. Exp Cell Res. Agosto de 1985; 159(2):536-9.

Asselineau D, Bernard BA, Darmon M. Three-dimensional culture of human keratinocytes on a dermal equivalent A model system to study epidermal morphogenesis and differentiation *in vitro*. Models dermatol, vol.3, p. 1-7(Karger, Basel 1987).

I-A- Preparación del equivalente de dermis

Los fibroblastos se descongelan, se cultivan en el medio para fibroblastos (MEM +10% de FCS (suero fetal de ternera) y se tripsinan.

Para la realización de los retículos, las células se utilizan en la confluencia entre 12 y 13 días después de la descongelación y se preparan con el fin de obtener una suspensión celular en MEM Hépes 10% FCS a 2106 células/ml.

Preparación de los medios de cultivo

MEM 1,76 X

MEM 10X 17,6 ml

NaHCO3 7,5 %, es decir 5,1 ml

1,76 mM de L-Glutamina, es decir 0,88 ml

0,88 mM de piruvato sódico, es decir 0,88 ml

0,88 X aminoácidos no esenciales, es decir 0,88 ml

8,8 U / 8,8 µg/ml (0,088 %) de penicilina estreptomicina, es decir 0,088 ml

0,04 X (0,04%) de antibiótico anti-micótico, es decir 0,044 ml

Agua ultra pura estéril 75 ml

MEM Hépes 10% FCS

MEM 25 mM Hépes 50 ml

2 mM de L-Glutamina, es decir 0,5 ml

1 mM de piruvato sódico, es decir 0,5 ml

1 X aminoácidos no esenciales, es decir 0,5 ml

20 U / 20 µg/ml (0,2%) de penicilina estreptomicina, es decir 0,1 ml

0,1 X (0,1%) de antibiótico anti-micótico, es decir 0,05 ml

10% FCS, es decir 5 ml

NaOH 0,1N

10 ml de NaOH 1N

90 ml de agua ultrapura estéril

Esta solución se pasa sobre filtro Millipore de membrana GV Durapore 0,22 µm

Ácido acético 1/1000

0,5 ml de ácido acético glacial 100%

499,5 ml de agua ultrapura estéril

Preparación de los retículos

Utilización de colágeno Gattefossé

3,22 ml de MEM 1,76 X

0,63 ml de FCS

0,35 ml de NAOH 0,1N

0,2 ml MEM Hépes 10% FCS

Volumen =4,4 ml

Se añade a esta solución 0,5 ml de suspensión celular.

Después se introduce lentamente el volumen necesario de colágeno frío.

Se vacía el contenido del Erlenmeyer en una caja bacteriológica Falcon de 60 mm de ø.

Se coloca la caja en el horno (37ºC – 5% de CO_2) durante aproximadamente 1h30 – 2h.

Se deja la contracción realizarse durante 3 días.

Se inoculan después las células de la matriz.

I-B- Microdisección y cultivo (inoculación) de las células de la matriz (figura 1)

A partir de una biopsia de piel, se realiza una microdisección de los folículos pilosos que se colocan en una caja de Petri que contiene el medio de cultivo. Se separa el epitelio del bulbo de la papila dérmica y de la funda conjuntiva y se corta la región bulbar en la parte superior de la papila dérmica, este fragmento se coloca después sobre la dermis equivalente al interior de un anillo estéril ejerciendo una ligera presión con la ayuda de una aguja, la separación de la funda conjuntiva con las células de la matriz se realiza más fácilmente sin recurrir a las enzimas proteolíticas, se elimina por lo tanto la parte dérmica y se cultivan las células de la matriz con el medio de cultivo 3F durante una semana.

I-C- Obtención de la piel reconstruida

Después de 7 días de cultivo en inmersión, las pieles se ponen en emersión.

Se verifica no obstante que los queratinocitos salen del retículo observando con microscopio.

En una caja bacteriológica Falcon, se coloca una rejilla de emersión.

Se añaden 7,5 ml MEM 10% FCS + 3 F evitando la formación de bulbos.

Se recorta el pegamento alrededor de la piel a emerger con la ayuda de un escalpelo estéril.

Se transfiere la piel sobre la rejilla con una pinza curva y un “cell-lifter”.

Se colocan las cajas en horno a 37ºC-5% de CO2.

Se cambia el medio el miércoles y el viernes (7,5 ml MEM 10% FCS + 3 F).

Después de 7 días de emersión, las pieles están listas para ser utilizadas.

Medio de cultivo utilizado: **MEM 10% FCS + 3F**

MEM 500 ml

2 mM de L-Glutamina, es decir 5 ml

1 mM de piruvato sódico, es decir 5 ml

1 X aminoácidos no esenciales, es decir 5 ml

20 U / 20 µg/ml (0,2 %) Penicilina estreptomicina, es decir 1 ml

0,1 X (0,1%) antibiótico anti-micótico, es decir 0,5 ml

10 ng/ml EGF es decir 0,5 ml de la solución stock a 10 µg/ml

10-10 M toxina de cólera, es decir 5 µl de la solución stock a 10-5M

0,4 µg/ml de hidrocortisona, es decir 0,4 ml de la solución stock a 0,5 mg/ml

10% FCS, es decir 50 ml

Las figuras 2 y 3 representan unos cortes transversales de piel reconstruida según el procedimiento de la invención.

Su observación muestra una epidermis estratificada coronada de un *stratum corneum* que reproduce una epidermis *in vivo*. Se puede ver también que la epidermis de la figura 3 comprende melanina.

Ejemplo II – preparación de un modelo de piel que comprende un folículo piloso

Las condiciones experimentales de los protocolos descritos en el ejemplo I se reproducirán utilizando unos fibroblastos foliculares en la etapa I-A-.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de células de la matriz, células localizadas en el bulbo piloso y que forman un pequeño cúmulo celular alrededor de la papila dérmica, para la preparación de un equivalente de epidermis capaz de pigmentarse.

2. Procedimiento de preparación de un equivalente de epidermis que comprende al menos una etapa de cultivo de células de la matriz, células localizadas en el bulbo piloso y que forma un pequeño cúmulo celular alrededor de la papila dérmica, sobre un equivalente de dermis.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que comprende:

a- la inoculación de células de la matriz, células localizadas en el bulbo piloso y que forma un pequeño cúmulo celular alrededor de la papila dérmica, sobre un equivalente de dermis que descansa en un soporte sumergido en un medio de cultivo;

b- la multiplicación de las células de la matriz células localizadas en el bulbo piloso y que forma un pequeño cúmulo celular alrededor de la papila dérmica, en la superficie de dicho equivalente de dermis;

c- la elevación de dicho soporte de tal manera que el medio de cultivo no recubra la cara superior del equivalente de epidermis durante la elaboración.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que el equivalente de dermis de la etapa (a) es un retículo de colágeno, en el que se reparten unos fibroblastos dérmicos.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que dichos fibroblastos son unos fibroblastos interfoleculares.

6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado por que la etapa b consiste en mantener las células de la matriz en contacto con el equivalente de dermis sumergido en un medio nutritivo durante 5 a 6 días.

7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el medio nutritivo es un medio 3F.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende además una etapa que induce a la pigmentación.

9. Equivalente de epidermis susceptible de obtenerse mediante el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, que comprende unos melanocitos con tres dendritas o más y constituido de células procedentes de la proliferación y diferenciación de células de la matriz, que comprende al menos unos queratinocitos y unos melanocitos.

10. Equivalente de epidermis según la reivindicación 9, que comprende además unas células de Langerhans y/o de Merkel.

11. Equivalente de piel, caracterizado por que comprende un equivalente de epidermis según una cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10.

12. Utilización de un equivalente de piel según la reivindicación 11, para ensayar la liberación y/o la penetración y/o la absorción y/o la biodisponibilidad cutánea y/o la tolerancia y/o la compatibilidad y/o la eficacia de compuestos.

13. Utilización según la reivindicación 12, en unos procedimientos automatizados de cribado de compuestos cosméticos, farmacéuticos o dermatológicos.

14. Utilización según la reivindicación 12 o 13 para la identificación de compuesto modulador de la pigmentación de la piel.

15. Utilización según la reivindicación 12 o 13, para la identificación de compuesto modulador del crecimiento del pelo y/o del cabello.

16. Utilización según la reivindicación 12 o 13, para la identificación de compuestos susceptibles de inducir a unas reacciones cutáneas de irritación o alergia.

17. Procedimiento de cribado de producto para identificar nuevos activos, que comprende una etapa (a) de puesta en contacto de dicho producto a ensayar con una epidermis equivalente según una cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10, después una etapa (b) de lectura del efecto de dicho producto sobre el equivalente de

epidermis.

18. Utilización de un equivalente de epidermis según una cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10 para la preparación de injertos destinados a tratar unos desórdenes cutáneos seleccionados entre una quemadura, un defecto de cicatrización, una úlcera cutánea, la psoriasis, un desorden pigmentario tal como el vitíligo, la hipomelanosis o la hipermelanosis congénitas o adquiridas o debido a una causa quirúrgica.

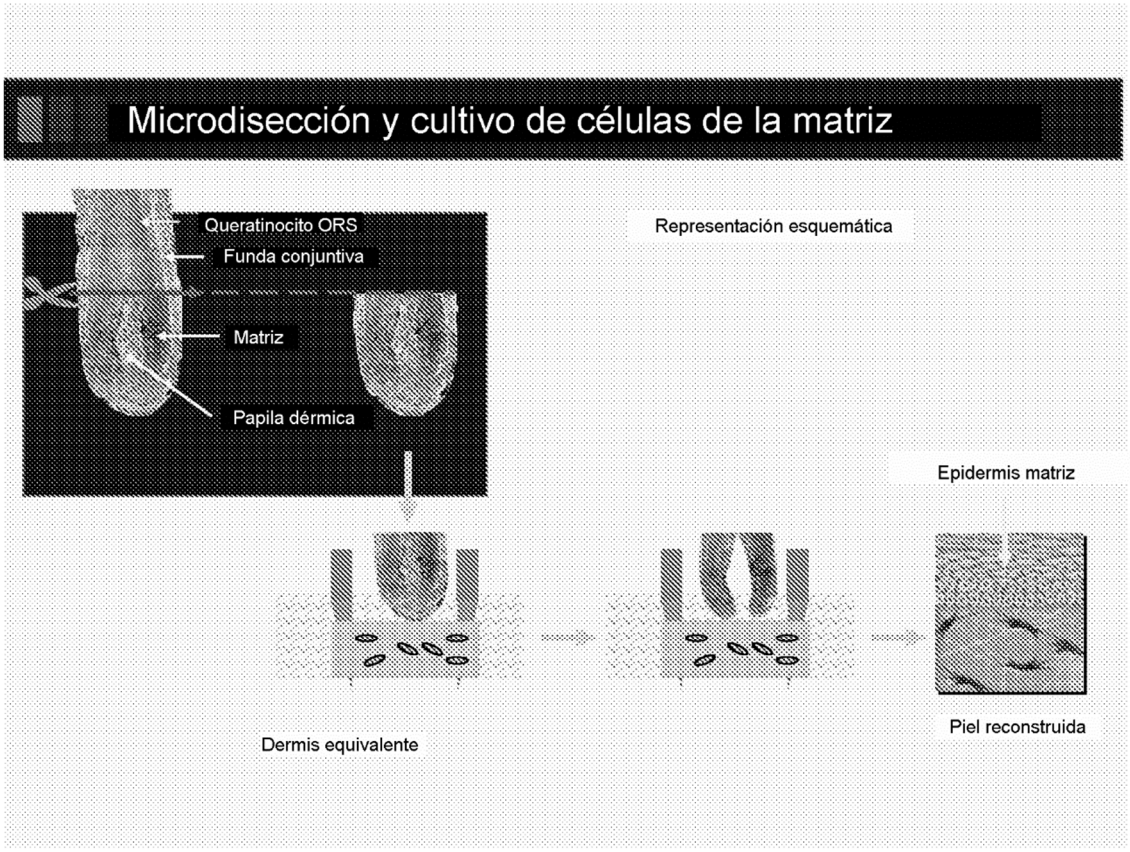
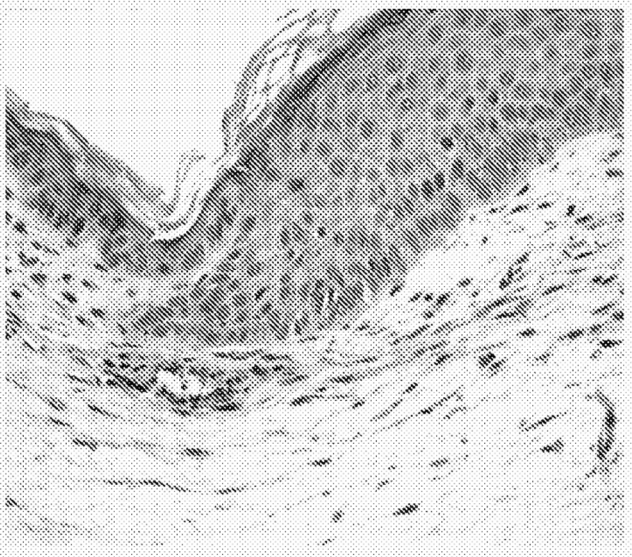

Microdisección y cultivo de células de la matriz
Queratinocito ORS
Funda conjuntiva
Matriz
Papila dérmica
Representación esquemática
Epidermis matriz
Dermis equivalente
Piel reconstruida

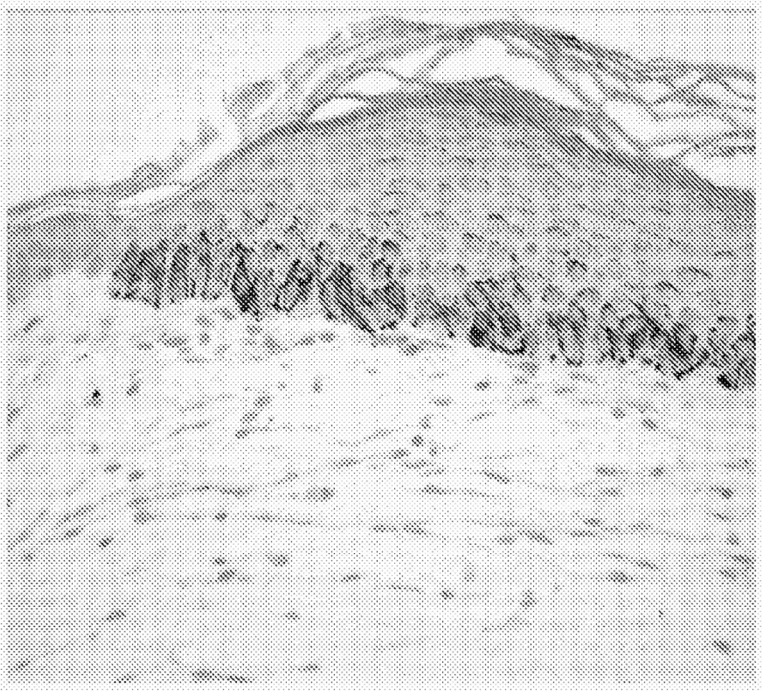
Figura 1

FIG 2



Aspecto histológico de la piel reconstruida obtenida con las células de la matriz después de 8 semanas de injerto.
Se observa la presencia de melanocitos foliculares.

FIG 3



Piel reconstruida obtenida con las células de la matriz después de ocho semanas de injerto.
El marcado por Fontana masson muestra la presencia de melanina