

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 096**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2013 PCT/EP2013/059215**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO13164436**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2013 E 13724530 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2882290**

54 Título: **Sistema que permite el mantenimiento de la supervivencia y el transporte de biopsias de piel y sus aplicaciones**

30 Prioridad:

03.05.2012 FR 1254091

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

21.04.2020

73 Titular/es:

**GENOSKIN (100.0%)
29 R Jeanne Marvig Incubateur Midi-Pyrénées
31400 Toulouse, FR**

72 Inventor/es:

DESCARGUES, PASCAL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 755 096 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

Sistema que permite el mantenimiento de la supervivencia y el transporte de biopsias de piel y sus aplicaciones

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para la conservación y/o el mantenimiento de la supervivencia de biopsias de piel de mamífero, preferiblemente humano, que permite su transporte y, si fuera necesario, su cultivo. La presente invención describe igualmente una biopsia de piel así conservada por dicho procedimiento y su utilización como modelo principalmente en un kit para el cribado o la selección de compuestos cosméticos o terapéuticos.

Técnica anterior

10 La piel está constituida por la superposición de la epidermis y la dermis. La epidermis es un epitelio pavimentoso pluriestratificado y escamoso. Forma una barrera que resiste los estragos de la desecación, así como las agresiones mecánicas, químicas y microbianas. El tipo celular principal que constituye la epidermis es el queratinocito. Este tejido comprende igualmente otras poblaciones celulares, tales como los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel (véase el anexo). La epidermis se subdivide convencionalmente en cuatro estratos distintos
15 que comprenden desde las capas internas hasta las capas más superficiales: la capa basal (una capa), la capa espinosa (4-15 capas), la capa granulosa (1-3 capas) y la capa córnea (5-10 capas). La epidermis reposa sobre la dermis gracias a una membrana basal constituida entre otras por moléculas de colágeno. La dermis contiene redes vasculares y nerviosas muy densas, así como anexos epidérmicos, estructuras queratinizadas que prolongan la epidermis y que incluyen los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas. La piel reposa
20 sobre un tejido subcutáneo, denominado hipodermis, constituido principalmente por células grasas y que participa, entre otras cosas, en la elasticidad de la piel y en la termorregulación del organismo.

Los sistemas de cultivo *in vitro* o *ex vivo* de piel se han desarrollado desde hace mucho tiempo para la investigación académica o aplicada (Lebonvallet *et al.*, "The evolution and use of skin explants: potential and limitations for dermatological research". *Eur J Dermatol*, 2010; 20 (6): 671-84). De aquí en adelante, la prohibición en Europa de la
25 utilización de animales para el desarrollo de productos cosméticos (Pauwel M and Rogiers V. "Human health safety evaluation of cosmetics in the EU: a legally imposed challenge to science". *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010 Mar 1; 243(2): 260-74), así como la importancia dada por la regla de las 3R (reducir, reutilizar, reciclar) en relación con la experimentación con animales durante el desarrollo farmacéutico (Wells DJ. "Animal welfare and the 3Rs in European biomedical research". *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Dic; 1245:14-6), confieren a los sistemas *in vitro* o *ex vivo*
30 de cultivo de la piel, en particular los que permiten el cultivo de piel humana, una importancia estratégica para las industrias cosméticas, químicas y farmacéuticas. Los sistemas de cultivo *in vitro* o *ex vivo* de piel son modelos de elección para el estudio de la biología cutánea. En efecto poseen todos los tipos celulares de la piel, organizados en una estructura tridimensional (3D). Reflejan directamente los parámetros de los individuos, como la edad, el sexo, el estado patológico de la piel o la exposición al sol (Lebonvallet *et al.* 2010).

35 Si los sistemas o dispositivos de cultivo *in vitro* o *ex vivo* de piel son modelos de elección para la investigación, los sistemas o dispositivos existentes se adaptan mal a su transporte y mantenimiento de la supervivencia.

Existen varios sistemas o dispositivos de cultivo, más o menos perfeccionados (Lebonvallet *et al.*, 2010), sin embargo, estos sistemas o dispositivos son generalmente frágiles y no permiten su envío por carretera o por aire, sin que esto pueda afectar a su integridad. En efecto, en estos sistemas o dispositivos, la biopsia de piel no está
40 mantenida firmemente por un soporte físico. Se puede dejar flotando en una solución de medio de cultivo o ser depositada en un inserto de membrana porosa o sobre una rejilla de acero inoxidable. La ventaja de los dos últimos procedimientos es permitir el mantenimiento de la parte superficial de la epidermis, la capa córnea, directamente en contacto con el aire atmosférico. Esto permite el estudio de la aplicación tópica de sustancias en la superficie de la piel.

45 Igualmente, se pueden citar en la presente memoria los documentos de patentes publicados con los números EP 2019316, US2011/045477 o WO2004/092354 que describen sistemas de cultivo *in vitro* o *ex vivo* de piel, pero que no mencionan ningún soporte ni dispositivo para el mantenimiento y transporte de biopsias de piel.

Más recientemente, se ha desarrollado un sistema de cámara de acero inoxidable para mantener firmemente grandes biopsias de piel y permitir su cultivo *in vitro* o *ex vivo* hasta 4 semanas (Lars Steinstraesser *et al.* "A Human Full-Skin Culture System for Interventional Studies". *Eplasty* 2009;9:e5). Aunque interesante, este sistema se adapta poco al cultivo celular por el hecho mismo de sus dimensiones y su composición (acero inoxidable). Además, este sistema se basa en una puesta en tensión significativa de la piel, que no refleja las condiciones fisiológicas encontradas para este órgano *in vivo*. Como la técnica anterior más próxima a la presente invención, se puede citar
50 igualmente el documento EP 0702081 que describe un procedimiento *ex vivo* para el mantenimiento de un fragmento de piel artificial que comprende dos tipos de esponjas de colágeno de diferente densidad, inoculadas con fibroblastos y queratinocitos, encerradas en una matriz constituida por gelatina. La publicación de Jacobs *et al.* ("Methyl green-pyronine staining of porcine organotypic skin explant cultures: an alternative model for screening for skin irritants", *ATLA*, 28, 279-92, 2000) describe la utilización de biopsias de piel de cerdo colocadas en un medio de

5 cultivo, tratadas con producto irritante y luego incluidas en una matriz sólida, antes de ser congeladas y luego coloreadas. El documento US 2003/040113 describe un soporte multicapas para el cultivo celular, en el que el soporte celular se siembra con células vivas suspendidas en un gel. El documento WO 2004/022696 describe un soporte de fibrina, que comprende fibrinógeno y trombina, utilizado para el cultivo de células, principalmente queratinocitos. Por último, el documento WO 2012/059703, depositado antes de la presente solicitud y publicado el 10 de mayo de 2012, después del depósito de la presente solicitud, describe un procedimiento para la conservación y/o el mantenimiento de la supervivencia de la epidermis.

10 Estos documentos no describen ni sugieren ningún procedimiento para el mantenimiento de la supervivencia y el transporte de un fragmento o de una biopsia de piel depositado en una matriz líquida capaz de solidificarse y por tanto mantenido firmemente por la matriz, pero igualmente alimentado, estando contenido el conjunto en un inserto cuyo fondo está constituido por una membrana porosa.

15 Con respecto a las biopsias de piel, el estudio de ciertos medios de cultivo utilizados para mantener *in vitro* o *ex vivo* estas biopsias de piel ha puesto de manifiesto el efecto perjudicial de la presencia de suero sobre la estructura de la piel, mientras que la presencia de iones de calcio a una concentración de 1,4 mM es importante para la cohesión del tejido, por medio de la estimulación de la producción de matriz extracelular y de la diferenciación epidérmica (Lebonvallet *et al.*, 2010).

20 Durante muchos años, se ha intentado poner a punto nuevos procedimientos para poder conservar y/o mantener la supervivencia de biopsias de piel de mamífero, preferiblemente humano o de cerdo. Esto especialmente si estos procedimientos permiten el transporte y el cultivo de estas biopsias.

El desarrollo de tales modelos es en efecto muy importante, en particular para la investigación dermatológica y para los estudios necesarios para la elaboración de productos farmacéuticos y/o cosméticos.

Por tanto, sería deseable poder disponer de un sistema, dispositivo y/o procedimiento que permitan obtener tales biopsias de piel y suficientemente robustos como para permitir su transporte (ya sea aéreo y/o terrestre).

25 La obtención de dicho modelo permitirá preservar la organización 3D y las funciones de la piel de una biopsia, y esto ventajosamente con relación a los cultivos de piel reconstruidos habitualmente con largos desarrollos y que requieren técnicas complejas (siendo las biopsias más fáciles de obtener y teniendo un mayor potencial para la investigación dermatológica, en particular para los estudios sobre la matriz extracelular, estructura 3D o las interacciones entre los diferentes tipos de células cutáneas).

30 Dichos modelos tendrían como ventajas poder permitir la realización de estudios necesarios para una mejor comprensión del papel de la piel, principalmente de su epidermis y dermis, tanto en el campo mecánico como en el campo fisiológico. Dichas biopsias mantenidas sólidamente gracias a dicho sistema, dispositivo y/o procedimiento robusto, permitirían igualmente la extracción de capas celulares de la capa córnea de la epidermis por desprendimientos superficiales sucesivos realizados con ayuda de una cinta autoadhesiva (denominado en inglés *tape stripping*). Dichas biopsias así conservadas y transportables pueden ser igualmente utilizadas como modelos de elección, en comparación con los modelos de piel reconstruida y sus inconvenientes (véase Lebonvallet *et al.* 2010) para la predicción por ensayos *in vitro* o *ex vivo*, de la actividad de los principios activos cosméticos y/o farmacéuticos o también de los efectos secundarios de los compuestos tópicos.

Este es precisamente el objeto de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

40 Sorprendentemente, la sociedad solicitante ha puesto de manifiesto que la realización del procedimiento de la invención y del dispositivo resultante como se describe a continuación permite obtener biopsias de piel capaces de ser conservadas y/o transportadas y que pueden servir, si es necesario, como modelo experimental.

45 La invención tiene por tanto por objeto un procedimiento *ex vivo* o *in vitro* para el mantenimiento de la supervivencia *in vitro* o *ex vivo* y el transporte de biopsia de piel, comprendiendo dicha biopsia de piel al menos la epidermis, la dermis y los anexos epidérmicos, habiendo sido extraída previamente dicha biopsia de un mamífero, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

50 a) El depósito de dicha biopsia de piel sobre una matriz líquida capaz de poder solidificarse bajo la acción de un aumento o una disminución de la temperatura y/o por la adición de un compuesto o de una composición específicos de manera que la parte superficial de dicha biopsia correspondiente a la totalidad de la epidermis permanezca emergida mientras la dermis subyacente a esta epidermis está completamente sumergida, eligiéndose dicha matriz líquida, capaz de poder solidificarse, entre el plasma sanguíneo o una solución derivada de plasma sanguíneo diluido en tampón fisiológico hasta como máximo 10%, una solución de fibrinógeno, una solución de colágeno, gelatina, geles poliméricos sintéticos, geles naturales de agarosa o de agar-agar de bajos puntos de fusión, geles de almidón o de polisacárido, o una de sus mezclas,

estando contenida dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse en un inserto cuyo fondo está constituido por una membrana porosa, y

estando dispuesto dicho inserto en un recipiente o pocillo; y

5 b) La solidificación de dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse inducida por un aumento o una disminución de la temperatura y/o por la adición de un compuesto o de una composición específicos, teniendo esta solidificación el efecto de aprisionar la parte sumergida de dicha biopsia de piel en dicha matriz así solidificada, y de hacer que se adhiera dicha matriz solidificada a las paredes laterales y a dicha membrana porosa del inserto, y estando en contacto dicha parte superficial epidérmica de la biopsia, que queda emergida, con el aire atmosférico o bajo una atmósfera controlada que comprende en parte aire.

10 Preferiblemente, dicho inserto se dispone en un recipiente o pocillo vacío (tipo de cubeta de microplaca o placa que puede servir para el cultivo celular, preferiblemente de fondo plano).

15 Según un modo de realización particular, un procedimiento según la invención comprende, previamente al depósito de la biopsia de piel sobre una matriz líquida capaz de poder solidificarse bajo la acción de un aumento o de una disminución de la temperatura y/o por la adición de un compuesto o de una composición específicos, una etapa de fijación a la superficie epidérmica de la biopsia de piel de un anillo constituido por un material hidrófobo, siendo el diámetro exterior de dicho anillo superior al diámetro de la superficie epidérmica de la biopsia, siendo el diámetro interior de dicho anillo inferior al diámetro de la superficie epidérmica de la biopsia.

Más precisamente, la fijación del anillo se realiza previamente a la etapa a) de depósito de la biopsia y previamente a la etapa i) de flotación de la biopsia.

20 Preferiblemente, el material hidrófobo del anillo es un material no tóxico para la piel, puede ser un polímero de parafina, de tipo Parafilm® (Sigma) o un polímero de silicona. Según un modo particular, el anillo se prepara a partir de una película de material hidrófobo, por la perforación de esta película según las dimensiones deseadas. El espesor del anillo está comprendido preferiblemente entre 0,1 mm y 2 mm, preferiblemente entre 0,1 y 1 mm, más preferiblemente entre 0,1 mm y 0,5 mm, y más preferiblemente entre 0,12 y 0,2 mm.

Dicho anillo puede estar constituido por un material opaco o translúcido. Según un modo de realización particular, el anillo está constituido por un material opaco.

30 Según un modo de realización más particular, dicho anillo está fijado a la superficie epidérmica de la biopsia con ayuda de un pegamento, preferiblemente añadido a la superficie inferior del anillo. Dicho pegamento se puede elegir entre cualquier tipo de material no tóxico para la piel y que tenga por efecto la adhesión del anillo a la piel, pudiendo ser este material silicona. Preferiblemente, dicho pegamento es hidrófobo.

Preferiblemente, después de la etapa b), dicho recipiente o pocillo se cubre por una tapa y, si es necesario, se sella y, si es necesario, se envuelve en una envolvente protectora apta para el transporte.

35 Una matriz líquida capaz de poder solidificarse es una solución líquida que comprende al menos un compuesto o una composición específicos cuya concentración en dicha solución líquida es tal que, durante la aplicación de condiciones apropiadas, principalmente condiciones particulares de temperatura, la solución líquida toma una consistencia de tipo sólido o gelificada. Dicho compuesto o una composición específicos puede ser de origen animal, vegetal o sintético, determinándose su naturaleza y su concentración en función de las características fisicoquímicas deseadas de la matriz cuando se solidifica, principalmente la flexibilidad y la resistencia de la matriz.

40 Según un modo de realización del procedimiento según la invención, en la etapa a), dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse se elige entre cualquier solución líquida, preferiblemente nutritiva, capaz de solidificarse o gelificarse en condiciones particulares compatibles con la supervivencia y el cultivo de células de piel que componen dicha biopsia.

45 La presente invención describe igualmente un procedimiento *ex vivo* o *in vitro* de conservación o de mantenimiento de la supervivencia de una biopsia de piel, siendo dicha biopsia apta para ser transportada, habiendo sido extraída dicha biopsia previamente de un mamífero, u obtenida de una colección o banco de muestras de piel, o también obtenida de una piel en cultivo, caracterizado por que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

50 i) la flotación de una biopsia de piel cilíndrica en una matriz líquida elegida entre una solución derivada de plasma sanguíneo, solución de fibrinógeno o de colágeno, o de una solución de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión o una mezcla de estas soluciones, estando contenida esta matriz líquida en dicho inserto, dejando esta flotación la superficie epidérmica de la biopsia emergida, mientras que la dermis está sumergida;

ii) la inducción rápida de la solidificación de dicha solución que rodea la biopsia de piel; y,

iii) el cultivo *in vitro* o *ex vivo* o el mantenimiento de la supervivencia de la biopsia de piel en dicha matriz así solidificada.

Preferiblemente, dicha matriz líquida o solidificada no contiene ningún factor de crecimiento ni suero.

5 En la etapa i), la flotación de una biopsia de piel cilíndrica se efectúa en una matriz líquida que comprende una primera solución elegida entre una solución derivada de plasma sanguíneo, una solución de fibrinógeno o una solución de colágeno, y una segunda solución de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión. Cuando la matriz líquida contiene una solución de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión, esta segunda solución se calienta previamente durante un tiempo y a una temperatura suficientes para ser líquida y para permanecer líquida a aproximadamente 37°C durante el tiempo suficiente para mezclarse con la primera solución en dicho inserto y hasta el depósito de dicha biopsia de piel.

10 Preferiblemente, dicha segunda solución se calienta previamente hasta su temperatura de fusión o ligeramente superior, preferiblemente entre 65°C y 70°C.

Preferiblemente, el agar-agar o la agarosa de bajo punto de fusión es un agar-agar o una agarosa cuya temperatura máxima de gelificación está comprendida entre 24°C y 28°C, y la temperatura de fusión es superior a 65,5°C en solución al 1,5%.

15 Preferiblemente y como ejemplo, aunque sin limitación, esta agarosa es la agarosa denominada LMP Agarose Low melting point (GIBCOBRL, Life Technologies).

Preferiblemente, dicha segunda solución es una solución de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión, cuya concentración de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión está comprendida entre 1% y 5% (preferiblemente en una solución fisiológica), más preferiblemente comprendida entre 2% y 5%, entre 3% y 4,5%, entre 3,5% y 4,5% o también entre 3,8% y 4,2% o entre 3,9% y 4,1%, siendo 4% la concentración más preferida.

20 Esta segunda solución de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión a dicha concentración y una vez calentada a su temperatura de fusión, o ligeramente superior, permite ser conservada en forma líquida durante al menos 1 hora y preferiblemente durante al menos 4 horas, 10 horas o 16 horas a 37°C.

25 Preferiblemente, en dicha matriz líquida que comprende dicha primera y dicha segunda solución de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión, la concentración final de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión está comprendida entre 0,1% y 2%, preferiblemente entre 0,2% y 1,8%.

30 Dicha concentración permite obtener no solo una matriz que, una vez solidificada, permite conservar la estructura 3D y mantener la supervivencia de dicha biopsia de piel, sino igualmente obtener una matriz sólida pero suficientemente flexible para no ser frágil y ser resistente a choques puntuales. La solidificación de esta matriz líquida tiene lugar después del depósito de la biopsia de piel dejando el dispositivo así obtenido a una temperatura comprendida entre 37°C y la temperatura ambiente, preferiblemente a 20°C.

Según un modo de realización particular, en dicha matriz líquida que comprende dicha primera y dicha segunda solución de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión, la concentración final de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión está comprendida entre 1% y 2%, preferiblemente entre 1,25% y 1,75%, preferiblemente entre 1,4% y 1,6%, siendo 1,5% la concentración más preferida.

35 Según otro modo de realización particular, en dicha matriz líquida que comprende dicha primera y dicha segunda solución de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión, la concentración final de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión está comprendida entre 0,1% y 2%, preferiblemente entre 0,2% y 1,75%, siendo 0,25% la concentración más preferida. Dicha concentración permite obtener una matriz que, una vez solidificada, permite conservar la estructura 3D y mantener la supervivencia de dicha biopsia de piel, pero obtener igualmente una matriz suficientemente flexible para no ser frágil y ser resistente a los efectos mecánicos aplicados a la biopsia, por ejemplo, durante un efecto que imita el masaje de la piel para la aplicación de una preparación tal como, por ejemplo, una crema. La solidificación de esta matriz líquida se realiza después del depósito de la biopsia de piel, dejando el dispositivo así obtenido a una temperatura comprendida entre 37°C y la temperatura ambiente, preferiblemente a 20°C.

45 Preferiblemente, el volumen de dicha matriz líquida es 1/3 a 2/3 del volumen total del inserto, preferiblemente de 2/5 a 3/5 del volumen total, siendo la mitad del volumen total del inserto el volumen preferido.

Preferiblemente, dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse contiene además células distintas de las células que componen dicha biopsia de piel, preferiblemente elegidas del grupo de células constituidas por fibroblastos, células endoteliales o células nerviosas.

50 En un modo de realización aún más preferido, dichas células son fibroblastos, preferiblemente fibroblastos primarios (en oposición a los linajes de fibroblastos), más preferiblemente fibroblastos dérmicos y/u obtenidos de prepucio humano.

Estos fibroblastos primarios, principalmente dérmicos, se pueden preparar y obtener a partir de métodos estándares bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento Howard BV *et al.*, "A new method

for the establishment of diploid fibroblast cell cultures from human foreskins". Proc Soc Exp Biol Med. 1976 Nov; 153(2): 280-3).

5 Preferiblemente, dichas células, principalmente fibroblastos, están contenidas en la matriz a una concentración entre $5 \cdot 10^3$ y $5 \cdot 10^5$ por mL, más preferiblemente entre 10^4 y 10^5 por mL, siendo entre $3 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^4$ por mL la concentración más preferida.

El procedimiento según la invención tal como se describe permite a la vez el cultivo y un transporte seguro de biopsias de piel (por vía terrestre, marítima o aérea). De hecho, la biopsia de piel no solo está aprisionada y, por tanto, firmemente mantenida por la matriz sólida en el inserto de membrana porosa, sino igualmente alimentada, pudiendo así viajar sin medio de cultivo durante su transporte manteniendo mientras la supervivencia.

10 Por cultivo se pretende designar en la presente memoria, en particular, el mantenimiento del estado fisiológico y, si es necesario, morfológico del explante de piel y por tanto, de las células que lo componen.

15 Este procedimiento tiene la ventaja de poder efectuar el depósito de la biopsia de piel en una primera etapa sobre una fase líquida (principalmente por medio de un inserto que contiene dicha matriz en forma líquida, pudiéndose inducir en dicha matriz líquida la solidificación), y en una segunda etapa, provocar la solidificación de esta matriz líquida, permitiendo esta solidificación fijar o inalterar la estructura 3D de dicha biopsia, lo que permite obtener la conservación o el mantenimiento de la supervivencia de dicho explante y su posible transporte manteniendo mientras igualmente su estructura 3D.

20 Este procedimiento se demuestra ventajoso porque permite obtener una biopsia de piel que puede ser conservada o mantenida su supervivencia de manera prolongada sin degradación apreciable, y además capaz de ser transportada, ya sea por vía terrestre, marítima o aérea.

Dicha biopsia de piel comprenderá preferiblemente al menos la epidermis, la dermis y los anexos epidérmicos.

Preferiblemente, dicha epidermis comprende el conjunto de sus capas celulares, así como los anexos epidérmicos en su totalidad.

25 Por "conjunto de sus capas celulares" para una epidermis se pretende designar en la presente memoria la capa basal, la capa espinosa, la capa granular y la capa córnea.

Por "anexos epidérmicos en su totalidad" se pretende designar en la presente memoria los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas.

Esta biopsia de piel podrá comprender igualmente una parte del tejido subcutáneo denominado también hipodermis.

También preferiblemente, dicha biopsia de piel es una biopsia de mamífero elegido entre el hombre o el cerdo.

30 También preferiblemente, dicha biopsia de piel se extrae recientemente para permitir su supervivencia *in vitro* o *ex vivo*.

Por extraída recientemente, se entiende en la presente memoria una extracción efectuada desde hace menos de 1 hora, preferiblemente menos de 24 horas.

35 Las biopsias de piel se preparan preferiblemente a partir de piel sana, procedente de cualquier lugar del cuerpo del mamífero, como por ejemplo, aunque sin limitación, abdomen, tórax, mama (o pezones), cuero cabelludo, nalgas, etc.

40 Las biopsias de piel se preparan también preferiblemente a partir de piel de mamífero que presenta una patología, como por ejemplo, aunque sin limitación, a partir de tejidos patológicos obtenidos por ablación, y procedentes, por ejemplo, de un paciente o animal que presenta un cáncer cutáneo (melanoma, cánceres baso- o espino-celulares, otro tipo de cáncer cutáneo), una placa de psoriasis, lesión de eccema o una dermatitis atópica o cualquier otro tipo de patología cutánea.

En un aspecto particular, dicha biopsia de piel utilizada en este procedimiento es una biopsia de piel obtenida de una colección u obtenida después de un cultivo de piel.

Preferiblemente, las biopsias de piel son de forma cilíndrica.

45 Preferiblemente, las biopsias de piel son de forma cilíndrica cuyo diámetro puede variar entre 1 mm y 50 mm, más preferiblemente entre 1 y 20 mm de diámetro, más preferiblemente entre 1 y 10 mm.

Según un modo de realización igualmente preferido, dicha biopsia extraída previamente es una biopsia de forma cilíndrica cuyo espesor está comprendido entre 1 y 20 mm, preferiblemente entre 2 y 15 mm de espesor, más preferiblemente entre 2 y 10 mm.

En un modo de realización preferido, dicho inserto cuyo fondo está constituido por una membrana porosa es un inserto en forma de canasta, cuyo diámetro está comprendido preferiblemente entre 5 y 40 mm, más preferiblemente entre 9,5 y 30 mm.

Más preferiblemente, dicho inserto es un inserto suspendido o sobre pilotes, preferiblemente suspendido.

- 5 Más preferiblemente, dicha membrana porosa es una membrana de una porosidad que permite evitar que la matriz líquida capaz de poder solidificarse fluya a través de la membrana antes de su solidificación, más preferiblemente elegida entre 0,4 y 8 μm , más preferiblemente entre 0,4 y 1,5 μm , siendo la porosidad preferida entre 0,8 μm y 1,2 μm .

- 10 Más preferiblemente, dicha membrana porosa es una membrana elegida de poli(tereftalato de etileno) (PET), nitrocelulosa o policarbonato.

- 15 Entre estos insertos, se pueden mencionar los proporcionados en particular por la sociedad Nunc (Roskilde, Dinamarca), BD Falcon (Becton Dickinson France SAS, 38801 Le Pont-De-Claix, Francia), Millicell® (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU.) o Costar® (Grosseron SAS, 44819 Saint-Herblain Francia), por ejemplo, los insertos con una membrana de policarbonato, de PET o de nitrocelulosa preenvasados en placas de múltiples pocillos para placas de Petri de 6, 8, 12 y 24 pocillos. y cuya porosidad de la membrana puede variar entre 0,4 y 8 μm , siendo más preferidas las placas de 8 pocillos y/o con una porosidad de membrana de 0,8 μm a 1 μm y/o de PET.

En un modo de realización preferido, dicho recipiente en el que se deposita dicho inserto es un pocillo de una placa de cultivo celular de 6, 8, 12, 24 o 48 pocillos.

- 20 Entre estas placas de cultivo se pueden mencionar las proporcionadas en particular por la sociedad Nunc, BD Falcon, o bajo las referencias Millicell® o Costar®.

Preferiblemente, el fondo del inserto está situado a una distancia comprendida entre 1 mm y 2.5 mm del fondo del recipiente que contiene dicho inserto, principalmente del fondo del pocillo de la placa de cultivo (o del fondo de la placa de Petri según la denominación).

- 25 En otro modo de realización preferido, en la etapa a), dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse tiene una concentración de Ca^{2+} entre 1 mM y 5 mM, preferiblemente Ca^{2+} entre 1,5 mM y 4,5 mM. Según un modo de realización preferido, en la etapa a) dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse tiene una concentración de Ca^{2+} entre 1 mM y 2 mM preferiblemente Ca^{2+} entre 1,2 mM y 1,4 mM. Según otro modo de realización preferido, en la etapa a), dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse tiene una concentración de Ca^{2+} entre 2 mM y 3 mM, preferiblemente Ca^{2+} entre 2,5 mM y 2,8 mM y más preferiblemente Ca^{2+} 2,8 mM.

También preferiblemente, dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse contiene entre 5 y 500 mg/mL de ácido ascórbico, preferiblemente entre 25 y 75 mg/mL, siendo 50 mg/mL de ácido ascórbico la concentración más preferida.

- 35 Más preferiblemente, dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse es un medio que tiene una concentración de Ca^{2+} entre 1 y 5 mM y que contiene entre 5 y 500 mg/mL de ácido ascórbico.

En un modo de realización preferido, dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse contenida en el inserto en la etapa a), es una matriz líquida, cuya primera solución de la mezcla (siendo la segunda solución la solución de agar-agar o de agarosa) es preferiblemente nutritiva, e igualmente capaz de poder solidificarse bajo la acción de un aumento o una disminución de la temperatura y/o por la adición de un compuesto o de una composición específicos.

- 40 Preferiblemente, dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse no contiene ningún factor de crecimiento ni suero animal o humano.

Preferiblemente, en la etapa a), dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse no recubre la cara superior de la epidermis antes de que esta matriz se solidifique en la etapa b).

- 45 Según otro modo de realización igualmente preferido, en la etapa a) de dicho procedimiento, la biopsia de piel se coloca luego sobre una matriz líquida capaz de poder solidificarse, principalmente como se indicó anteriormente, y dicha matriz líquida se elige entre cualquier solución líquida que aporte todos los ingredientes nutritivos y/o necesarios para su cultivo, en particular para el mantenimiento del estado fisiológico inicial de las células que lo constituyen. Esta solución es capaz de solidificarse o gelificarse en condiciones particulares compatibles con la supervivencia y el cultivo de la biopsia de piel.

- 50 Preferiblemente, dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse es una solución líquida derivada de plasma sanguíneo tratado con un agente anticoagulante con propiedades reversible mezclada con una solución de agar-agar o de agarosa.

Preferiblemente, dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse contiene un plasma sanguíneo, fibrinógeno o colágeno, mezclado con una solución de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión,

5 Según un modo de realización igualmente preferido del procedimiento según la invención, en la etapa a), dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse es una solución derivada de plasma sanguíneo que contiene de 25% a 60%, preferiblemente entre 35% y 45% (v/v) de plasma sanguíneo, de 70% a 35% de una solución fisiológica, tal como una solución de NaCl al 0,9%, de 5% a 12%, preferiblemente 8%, de una solución salina de CaCl₂ al 1%, un agente antifibrinolítico en concentración suficiente para obtener la actividad antifibrinolítica deseada, preferiblemente entre 5% y 2%, eligiéndose preferiblemente el agente antifibrinolítico entre ácido tranaxémico o aprotinina y una solución de agarosa de bajo punto de fusión entre 0,5% y 4%, preferiblemente entre 1% y 2%.

10 Según un modo de realización también preferido del procedimiento según la invención, en la etapa a), dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse es una solución líquida de fibrinógeno y trombina, o de colágeno o de plasma sanguíneo, mezclada con un solución de gelatina, que comprende geles poliméricos sintéticos, naturales tales como geles de agarosa, en particular los geles de agarosa o de agar-agar de bajo punto de fusión, geles de almidón o de polisacáridos, y cuya incubación a 37°C permite su solidificación.

15 Según un modo de realización igualmente preferido del procedimiento según la invención, en la etapa a):

- dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse contiene una solución líquida derivada de plasma sanguíneo tratado con un agente anticoagulante con propiedades reversibles, preferiblemente con citrato de sodio; y
- la solidificación de dicha matriz en la etapa b) para esta solución se puede obtener en presencia de iones de calcio, preferiblemente también en presencia de trombina.

20 Cuando la matriz líquida capaz de poder solidificarse es una matriz líquida que contiene una solución de plasma sanguíneo, una solución de fibrinógeno o de colágeno, la solidificación de dicha matriz en la etapa b) se puede realizar para esta solución por adición de trombina o por aumento de la temperatura, o también con ayuda de factores secretados por las células aportadas en la matriz, tales como los fibroblastos primarios.

25 Según un modo de realización igualmente preferido del procedimiento según la invención, en la etapa b), dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse se solidifica después como máximo de 8 horas, preferiblemente menos de 2 horas o menos de una hora, una duración de menos de 30 minutos, siendo menos de 10 minutos, la duración más preferida, para iniciar la fase de solidificación de la matriz líquida después del depósito de la biopsia de piel sobre esta matriz líquida en la etapa a).

30 Según otro aspecto, la invención se refiere a la utilización de dicha biopsia de piel obtenida por dicho procedimiento según la presente invención para fines de modelo *ex vivo* o *in vivo* particularmente para análisis toxicológicos, especialmente análisis de absorción percutánea, de metabolismo, de sensibilización, de corrosión o de irritación, o para fines de investigación, en particular ciertos parámetros exógenos como los rayos UV, el estrés, los medicamentos o principios activos con efecto cosmético, o también ciertas proteínas de señalización, como las citoquinas, podrían ser aplicadas dichos modelos para estudiar las respuestas de las células y los tejidos que forman la piel o que están asociados con ella.

35 Preferiblemente, dichos análisis toxicológicos se eligen entre ensayos de sensibilización, de absorción, de metabolismo, de corrosión o de irritación de la piel.

40 Según otro aspecto, la presente invención tiene por objeto un procedimiento *ex vivo* o *in vitro* de conservación o de mantenimiento de la supervivencia de una biopsia de piel capaz de ser transportada, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

A) la conservación o el mantenimiento de la supervivencia de la biopsia de piel previamente extraída y capaz de ser transportada, obtenida directamente por un procedimiento según la presente invención;

B) el transporte de dicha biopsia de piel así obtenida en la etapa A); y

45 C) el cultivo de dicha biopsia de piel así obtenida después del transporte en la etapa B) en condiciones de cultivo adecuadas y/o en presencia del compuesto o compuestos que se desea analizar, estando en contacto con el aire la epidermis de dicha biopsia de piel.

50 Preferiblemente, en la etapa C), el cultivo de dicha biopsia de piel así obtenida después del transporte en la etapa B) en condiciones de cultivo adecuadas y/o en presencia del compuesto o compuestos que se desea analizar, se puede realizar mediante un medio de cultivo adicional, que puede contener dichos compuestos, y añadido al recipiente o pocillos, pudiendo este medio adicional difundirse a través de la membrana porosa del inserto.

Según un modo de realización igualmente preferido del procedimiento según la invención, en la etapa C), dicha biopsia de piel así dispuesta se cultiva durante un período entre 1 y 15 días y preferiblemente entre 1 y 7 días, y a una temperatura comprendida entre 4°C y 37° C.

- Según otro aspecto, la invención tiene por objeto la utilización de un dispositivo para la conservación y/o el mantenimiento de la supervivencia de una biopsia de piel obtenida directamente por el procedimiento de la invención que comprende un inserto cuyo fondo está constituido por una membrana porosa, estando dispuesto dicho inserto en un pocillo y conteniendo dicho inserto una matriz líquida capaz de poder solidificarse bajo la acción de un aumento o de una disminución de la temperatura y/o por la adición de un compuesto o de una composición específicos, eligiéndose dicha matriz capaz de poder solidificarse entre plasma sanguíneo o una solución derivada de plasma sanguíneo diluido en tampón fisiológico hasta un máximo del 10%, una solución de fibrinógeno, una solución de colágeno, gelatina, geles poliméricos sintéticos, geles naturales de agarosa o de agar-agar de bajos puntos de fusión, geles de almidón o de polisacárido, o una de sus mezclas.
- Según otro aspecto, la invención tiene por objeto un dispositivo para la conservación y/o el mantenimiento de la supervivencia de una biopsia de piel que comprende un inserto cuyo fondo está constituido por una membrana porosa, estando dispuesto dicho inserto en un pocillo y conteniendo dicho inserto una matriz solidificada o gelificada que se adhiere a las paredes laterales y a dicha membrana porosa del inserto.
- En un dispositivo según la invención, dicho inserto está colocado en un recipiente o un pocillo vacío, del tipo de cubeta de microplaca o placa que puede servir para cultivo celular, preferiblemente con fondo plano. Preferiblemente, dicho inserto está suspendido en el recipiente o en el pocillo y puede ser retirado del recipiente o del pocillo.
- En un modo particular de realización de un dispositivo según la invención, dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse o dicha matriz solidificada o gelificada que se adhiere a las paredes laterales y a dicha membrana porosa del inserto, se elige entre cualquier solución líquida, preferiblemente nutritiva, capaz de solidificarse o gelificarse en condiciones particulares compatibles con la supervivencia y el cultivo de células de piel que componen dicha biopsia, preferiblemente elegida entre plasma sanguíneo o solución derivada de plasma sanguíneo, particularmente diluido en tampón fisiológico a como máximo 10%, preferiblemente al menos 20%, al menos 30% y 40%, una solución de fibrinógeno, una solución de colágeno, gelatina, geles poliméricos sintéticos, naturales tales como los geles de agarosa especialmente geles de agarosa o de agar-agar de bajo punto de fusión, geles de almidón o de polisacárido, o una de sus mezclas.
- Preferiblemente, dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse comprende una solución derivada de plasma sanguíneo, una solución de fibrinógeno o de colágeno, una solución de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión o una mezcla de estas soluciones.
- Preferiblemente, en dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse que comprende dicha primera y dicha segunda solución de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión, la concentración final de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión está comprendida entre 0,1% y 2%, preferiblemente entre 0,2 y 1,8%.
- Según un modo de realización particular, en dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse que comprende dicha primera y dicha segunda solución de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión, la concentración final de agar-agar o de agarosa de bajo el punto de fusión está comprendida entre 1% y 2%, preferiblemente entre 1,25% y 1,75%, preferiblemente entre 1,4% y 1,6%, siendo 1,5% la concentración más preferida.
- Según otro modo de realización particular, en dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse que comprende dicha primera y dicha segunda solución de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión, la concentración final de agar-agar o de agarosa de bajo punto de fusión está comprendida entre 0,1% y 2%, preferiblemente entre 0,2% y 1,75%, siendo 0,25% la concentración más preferida.
- Preferiblemente, la flotación de una biopsia de piel en una matriz de un dispositivo según la invención deja emergida la superficie epidérmica mientras que la dermis está sumergida.
- En otro aspecto, la presente invención tiene por objeto una biopsia de piel susceptible de ser obtenida u obtenida directamente como modelo por el procedimiento según la presente invención.
- Según este aspecto de la invención, tiene igualmente por objeto un kit que comprende dicha biopsia de piel como modelo, basándose este kit principalmente en la presencia de una matriz sólida, estando adaptada esta matriz sólida por su composición a la conservación y/o al mantenimiento de la supervivencia y de la estructura, en particular 3D, de dicha biopsia de piel y a su transporte.
- Por tanto, según este aspecto, la invención tiene por objeto igualmente un kit, en particular para la evaluación o para la selección de un compuesto cosmético, dermatológico o terapéutico destinado a ser utilizado para la piel, comprendiendo dicho kit dicha biopsia de piel como modelo de piel y obtenida según el procedimiento de la invención.
- La presente invención describe un método de selección *in vitro* de compuestos candidatos para el tratamiento cosmético o terapéutico de la piel, comprendiendo este método las siguientes etapas:
- a) la obtención de una biopsia de piel como modelo según la presente invención;

b) la puesta en contacto de dicho modelo con el compuesto candidato; y

c) la puesta de manifiesto de una modificación fisiológica; y

d) la selección de dicho compuesto si las modificaciones obtenidas son las deseadas para el tratamiento.

5 Otro objeto de la presente invención se refiere a un método que permite realizar tomas de muestras sucesivas de capas celulares superficiales con ayuda de adhesivos (método denominado en inglés "*tape-stripping*"), caracterizado por que estas muestras se toman en un modelo de biopsia de piel obtenida por el procedimiento de la invención. Estas capas celulares así obtenidas se pueden analizar independientemente de la biopsia completa.

10 Por lo tanto, la biopsia de piel como modelo según la invención se puede utilizar también en cualquier procedimiento, especialmente automatizado, para la selección o identificación de nuevos compuestos cosméticos, dermatológicos o farmacéuticos destinados en particular a ser aplicados sobre la piel.

15 Los procedimientos de detección para identificar con el fin de nuevos compuestos eficaces comprenden generalmente una puesta en contacto de dicho compuesto que se ha de analizar con un modelo de piel obtenido según la invención y luego una etapa de lectura del efecto del compuesto sobre dicho modelo, particularmente comparando este efecto con un modelo de control o testigo según la invención que no haya sido puesto en contacto con el compuesto objeto del análisis. Esta última etapa de lectura podrá ser realizada igualmente por la determinación o el análisis de marcadores epidérmicos y/o de células asociadas e incluidas en la matriz solidificada, tales como las proteínas asociadas con estas estructuras. Por ejemplo, si estas células asociadas son células del sistema inmunitario, dicho procedimiento de selección estará destinado, por ejemplo, a identificar o seleccionar compuestos de ensayo capaces de inducir efectos secundarios no deseados, tales como reacciones alérgicas o de sensibilización.

20 Los productos analizados podrán ser igualmente vectores de expresión de genes o también ácidos nucleicos, tales como ácidos nucleicos antisentido, microRNA, siRNA capaces de modificar la expresión de un gen constitutivo de células presentes en dicho modelo de la invención.

25 Otros efectos tales como la expresión de ciertos mediadores o la citotoxicidad intrínseca de los compuestos de ensayo frente a ciertas células de la piel podrán también investigarse como efecto secundario, o frente a ciertas células asociadas que habrán podido ser insertadas además con la biopsia de piel en la matriz antes de su solidificación.

Por supuesto, estos modelos de control se utilizarán en las mismas condiciones que el modelo de la invención que ha recibido el producto de ensayo.

30 La presente invención describe igualmente un procedimiento para determinar el tratamiento terapéutico adaptado para un individuo que padece un trastorno o patología de la piel, especialmente de la epidermis o de la dermis, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

a) a partir de una biopsia de piel extraída de dicho paciente, la obtención de un modelo según la presente invención;

b) la puesta en contacto de dicho modelo con un compuesto candidato para dicho tratamiento;

35 c) la puesta de manifiesto de la modificación fisiológica o morfogénica de la piel, principalmente de la epidermis o de la dermis, asociada con la eficacia del tratamiento para dicho trastorno o dicha patología; y

d) la selección de dicho compuesto si las modificaciones obtenidas son las deseadas para el tratamiento.

40 La presente invención describe un procedimiento para determinar el tratamiento terapéutico adaptado para un individuo que padece un trastorno de la piel, particularmente de la epidermis o de la dermis, caracterizado por que en la etapa a), la biopsia de piel utilizada proviene de una colección o cultivo de piel.

En otro aspecto, la presente invención tiene por objeto la utilización de un modelo según la presente invención, para determinar para un producto los efectos secundarios sobre la piel, tales como, por ejemplo:

- su toxicidad

- su adsorción o absorción;

45 - su distribución, su metabolismo, su excreción;

- su poder irritante o corrosivo

- su poder sensibilizante.

Dicho modelo podrá ser en efecto según la presente invención utilizado o realizado en cualquier procedimiento o ensayo *in vitro* o *ex vivo* que requieran experimentos con animales o seres humanos, como, por ejemplo, el estudio

de la liberación o penetración de principios activos, y/o de su biodisponibilidad cutánea, el estudio de su eficacia, o también de su tolerancia, de su compatibilidad, siendo estos principios activos considerados para fines cosméticos, dermatológicos y/o farmacéuticos.

5 Según un modo de realización preferido, dicho producto ensayado es un producto cosmético, dermatológico o farmacéutico.

La utilización como modelo se referirá igualmente a su puesta en práctica para el estudio de cualquier patología que dé como resultado anomalías de la piel, particularmente de la epidermis y/o de la dermis, en particular también para todas las células situadas debajo de la epidermis para las cuales la epidermis constituye una barrera natural y para las cuales es posible una terapia por vía tópica.

10 Otras características y ventajas de la invención aparecen en la siguiente descripción con los ejemplos y las figuras. Las figuras cuyas leyendas se dan a continuación, así como los ejemplos que siguen, tienen la intención de ilustrar la invención sin limitar su alcance.

Leyendas de las figuras

Figuras 1A, 1B y 1C: Esquema que describe el procedimiento según la invención.

15 - Etapa 1: Se prepara una biopsia cilíndrica de piel (Figura 1A);

- Etapa 2: La biopsia se coloca en flotación en un recipiente/inserto de membrana porosa que contiene una solución preparada con una mezcla de plasma sanguíneo y agarosa fundida, estando dicho inserto dispuesto (suspendido) en un pocillo de placa de cultivo celular no llenado previamente de medio nutritivo (Figura 1B);

20 - Etapa 3: La solución de plasma sanguíneo se solidifica por coagulación; y la biopsia dispuesta sobre el plasma coagulado se mantiene en cultivo por difusión del medio de cultivo a través de la membrana porosa del inserto (Figura 1C).

Figura 2: Esquema que describe la fijación del anillo hidrófobo sobre la superficie epidérmica de la biopsia.

25 Figuras 3A y 3B: Esquema que representa la biopsia asociada al anillo, colocada en flotación en un inserto de membrana porosa que contiene la matriz, en el que el pocillo de cultivo celular no está lleno previamente con medio nutritivo (Figura 3A), o en el que el pocillo de cultivo celular está lleno con medio nutritivo (Figura 3B).

Ejemplos

Ejemplo 1: Realización del procedimiento (Véanse las Figuras 1A, 1B y 1C)

30 Un dispositivo para la conservación y/o el mantenimiento de la supervivencia de una biopsia de piel comprende un inserto cuyo fondo está constituido por una membrana porosa. El inserto contiene una matriz líquida capaz de solidificarse o gelificarse, el inserto se coloca en un pocillo.

1. En primer lugar se prepara una biopsia de piel cilíndrica (diámetro 8 mm, espesor 5 mm) de un fragmento de piel recién extraído para facilitar su supervivencia *ex vivo* o *in vitro*.

35 2. La biopsia se deposita cuidadosamente en un inserto (cubeta Millicell™ de 8 pocillos) que dispone en el fondo de una membrana porosa (de PET, porosidad 1 μm), conteniendo este inserto una solución derivada de plasma sanguíneo tratado con un agente anticoagulante con propiedades reversibles en presencia de iones de calcio (citrate de sodio). Esta solución contiene 42% de plasma sanguíneo, 50% de una solución de NaCl al 0,9%, 8% de una solución salina de CaCl₂ al 1%, un agente antifibrinolítico (ácido tranexámico o aprotinina) y agarosa fundida de bajo punto de fusión al 1,5% (Agarose LMP GIBCOBRL, Life Technologies) (fundida en estufa a 65,5°C).

40 3. Al coagular, el plasma actúa como un soporte dérmico sobre el cual se adhiere el explante de piel. La coagulación consiste esencialmente en la transformación, en presencia de iones de calcio y trombina, fibrinógeno presente en el plasma en un armazón de moléculas de fibrina unidas entre sí por enlaces covalentes. El agente antifibrinolítico tiene la función de inhibir las enzimas capaces de degradar la matriz de plasma, siendo estas enzimas segregadas por el explante de piel y, por lo tanto, mantener la integridad del explante. Del mismo modo, la solución de plasma puede ser sustituida por una solución de fibrinógeno o de colágeno. Para esto último, la incubación a 37°C solo permite la solidificación.

4. La solución de agarosa al 1,5% contenida en la solución de plasma gelifica progresivamente a 37°C, permitiendo así que la biopsia de piel se mantenga firme en el inserto. De este modo, la biopsia de piel puede ser transportada sin ser alterada durante un período de 24 horas, 48 horas o más, según las necesidades.

50 5. El conjunto constituido por el explante de piel (o también denominado en la presente memoria fragmento o biopsia de piel) se mantiene en cultivo con la epidermis en contacto con el aire y el medio nutritivo contenido en el inserto dispuesto (suspendido) en el pocillo de la placa de cultivo celular. Si es necesario, el inserto móvil puede elevarse,

permitiendo así la adición o la renovación del medio nutritivo en el pocillo, o la adición de un aditivo particular al medio nutritivo. Según un modo de realización particular, dicho aditivo es un compuesto destinado a ser ensayado durante su contacto con el fragmento o la biopsia.

5 La presencia de una membrana porosa en el fondo del inserto permite la difusión de elementos nutritivos a través de la membrana, llegado el caso la difusión de compuestos producidos por el fragmento o la biopsia de piel durante el cultivo y cuya acumulación local podría ser perjudicial para dicho fragmento o biopsia.

Ejemplo 2: Realización del procedimiento en el que se fija un anillo hidrófobo a la biopsia

10 Se recorta un anillo o disco perforado, cuyo diámetro interior sea 7 mm y el diámetro exterior sea 11 mm de una película hidrófoba de tipo Parafilm® (Sigma) cuyo espesor está comprendido entre 100 y 120 micrómetros. Se prepara una biopsia de piel cilíndrica de un diámetro de 10 mm de un fragmento de piel recién extraído para facilitar su supervivencia *ex vivo* o *in vitro*. La cara inferior del anillo se recubre con silicona líquida, lo que permite la adhesión del anillo a la biopsia. El anillo se dispone por presión sobre la superficie epidérmica de la biopsia, de modo que se superpone sobre la superficie de la biopsia (Figura 2). El disco se dispone de modo que su centro corresponda al de la biopsia. El conjunto constituido por la biopsia y el anillo hidrófobo se deposita cuidadosamente sobre un inserto (Millicell™ *Hanging inserts*, Merck Millipore) que tiene en el fondo una membrana porosa (de PET, porosidad 1 µm), conteniendo este inserto una solución derivada de plasma sanguíneo, tal como la descrita en el Ejemplo 1. En este caso, la incubación a 37°C solo permite la solidificación, la solución de agarosa al 1,5% contenida en la solución de plasma gelifica progresivamente a 37°C permitiendo así el mantenimiento firme la biopsia de piel en el inserto (Figura 3A). El conjunto constituido por la biopsia y el anillo hidrófobo se mantiene en cultivo, con la epidermis en contacto con el aire, en contacto con el medio nutritivo contenido en el pocillo de la placa de cultivo celular en que está dispuesto el inserto (Figura 3B).

Según un ejemplo particular, la presencia de un anillo hidrófobo que delimita una zona de 0,5 cm² permite depositar y mantener en contacto con la biopsia un volumen de solución líquida de 50 microlitros.

25 La adición del disco perforado hidrófobo fijado sobre la biopsia da como resultado una mejor flotación de la biopsia sobre la matriz líquida (durante el depósito en el inserto), pasando la línea de flotación bajo el disco. La presencia del disco permite igualmente delimitar con precisión la zona de la superficie de la biopsia que está en contacto con el aire. Esta zona se utiliza para realizar aplicaciones tópicas. La presencia del disco perforado permite igualmente evitar la difusión lateral de soluciones o formulaciones que se aplican sobre la biopsia, actuando el disco como una barrera para la difusión. El disco permite finalmente evitar el contacto de la zona emergida de la superficie epidérmica de la biopsia con la mezcla de soluciones, constituyendo la matriz cuando dicha mezcla es líquida.

Ejemplo 3: Realización del procedimiento con diferentes concentraciones finales de agarosa de bajo punto de fusión.

Se compararon las propiedades fisicoquímicas de fragmentos de piel mantenidos en diferentes soluciones de matrices.

35 Se prepara una matriz líquida a partir de una primera solución que contiene plasma, y una segunda solución que contiene agarosa de bajo punto de fusión, cuya temperatura máxima de gelificación está comprendida entre 24°C y 28°C y cuya temperatura de fusión es superior a 65,5°C.

40 En el ejemplo donde la proporción final de agarosa de bajo punto de fusión en la matriz (después de la puesta en contacto de la primera y la segunda solución) es 0,25%, la consistencia de la matriz se adapta a un buen mantenimiento de la biopsia durante el transporte por carretera y aéreo, sin alteración de la biopsia.

45 Además, una matriz solidificada que comprende 0,25% de agarosa de bajo punto de fusión conserva una capacidad de deformación adecuada para el mantenimiento de la biopsia durante el transporte, mientras que conserva las propiedades de adhesión de la matriz a la parte sumergida de la biopsia. Las propiedades de mantenimiento y flexibilidad de la matriz así preparada son adecuadas para la realización de ensayos que comprendan un efecto mecánico sobre la biopsia, como por ejemplo un efecto que imite un masaje durante la aplicación de una preparación tal como una crema sobre la piel. En efecto, en este caso la biopsia permanece fijada en la matriz solidificada a pesar de las tensiones mecánicas que se le pueden aplicar.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *ex vivo* o *in vitro* para el mantenimiento de la supervivencia *in vitro* o *ex vivo* y el transporte de biopsia de piel, comprendiendo dicha biopsia de piel al menos la epidermis, la dermis y los anexos epidérmicos, habiéndose extraído dicha biopsia previamente de un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:
- 5 a) el depósito de dicha biopsia de piel sobre una matriz líquida capaz de poder solidificarse bajo la acción de un aumento o de una disminución de la temperatura y/o por la adición de un compuesto o de una composición específicos de manera que la parte superficial de dicha biopsia correspondiente a la totalidad de la epidermis permanezca emergida mientras que la dermis subyacente a esta epidermis esté completamente sumergida,
- 10 eligiéndose dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse entre plasma sanguíneo o una solución derivada de plasma sanguíneo diluido en tampón fisiológico hasta un máximo de 10%, una solución de fibrinógeno, una solución de colágeno, gelatina, geles poliméricos sintéticos, geles naturales de agarosa o de agar-agar de bajos puntos de fusión, geles de almidón o de polisacáridos, o una de sus mezclas,
- 15 estando contenida dicha matriz líquida, capaz de poder solidificarse, en un inserto cuyo fondo está constituido por una membrana porosa, y
- estando dispuesto dicho inserto en un recipiente o pocillo; y
- b) la solidificación de dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse inducida por un aumento o una disminución de la temperatura y/o por la adición de un compuesto o de una composición específicos, teniendo esta solidificación el efecto de aprisionar la parte sumergida de dicha biopsia de piel en dicha matriz así solidificada, y hacer que se adhiera dicha matriz solidificada a las paredes laterales y a dicha membrana porosa del inserto, y estando en contacto dicha parte superficial epidérmica de la biopsia, que permanece emergida con el aire atmosférico o bajo una atmósfera controlada que comprende en parte aire.
2. Procedimiento *ex vivo* o *in vitro* según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho procedimiento comprende, previamente a la etapa a) según la reivindicación 1, una etapa de fijación a la superficie epidérmica de la biopsia de piel de un anillo constituido por un material hidrófobo, siendo el diámetro exterior del anillo de dicho anillo superior al diámetro de la superficie epidérmica de la biopsia, y siendo el diámetro interior de dicho anillo inferior al diámetro de la superficie epidérmica de la biopsia.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que dicha membrana porosa es una membrana con una porosidad elegida entre 0,4 y 8 μm .
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse es un medio que tiene una concentración de Ca^{2+} entre 1 mM y 5 mM y que contiene entre 5 y 500 mg/mL de ácido ascórbico.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse es una solución líquida derivada de plasma sanguíneo tratado con un agente anticoagulante con propiedades reversibles mezclada con una solución de agar-agar o de agarosa.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que dicha solución líquida derivada de plasma es una solución líquida derivada de plasma sanguíneo que contiene de 25% a 60% de plasma sanguíneo, de 70% a 35% de una solución fisiológica, de 5% a 12% de una solución salina de CaCl_2 al 1% y, si es necesario, un agente antifibrinolítico.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse comprende agarosa o agar-agar de bajos puntos de fusión a una concentración final comprendida entre 0,1% y 5%.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse contenida en el inserto no incluye ningún factor de crecimiento ni suero animal ni humano.
9. Procedimiento *ex vivo* o *in vitro* de conservación o de mantenimiento de la supervivencia de una biopsia de piel capaz de ser transportada, comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:
- A) la conservación o el mantenimiento de la supervivencia de la biopsia de piel previamente extraída y capaz de ser transportada directamente obtenida por un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8;
- B) el transporte de dicha biopsia de piel así obtenida en la etapa A); y
- C) el cultivo de dicha biopsia de piel así obtenida después del transporte en la etapa B) en condiciones de cultivo adecuadas y/o en presencia del compuesto o compuestos que se desean analizar, estando la epidermis de dicha biopsia de piel en contacto con el aire.

10. Utilización de un dispositivo para la conservación y/o el mantenimiento de la supervivencia de una biopsia de piel obtenida directamente por un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8 o según la reivindicación 9, comprendiendo dicho dispositivo un inserto cuyo fondo está constituido por una membrana porosa, estando dispuesto dicho inserto en un pocillo, conteniendo dicho inserto una matriz líquida capaz de poder solidificarse bajo la acción de un aumento o una disminución de la temperatura y/o por la adición de un compuesto o de una composición específicos, eligiéndose dicha matriz líquida capaz de poder solidificarse entre plasma sanguíneo o una solución derivada de plasma sanguíneo diluido en tampón fisiológico como máximo al 10%, una solución de fibrinógeno, una solución colágeno, gelatina, geles poliméricos sintéticos, geles naturales de agarosa o de agar-agar de bajos puntos de fusión, geles de almidón o de polisacáridos o una de sus mezclas.
- 5
- 10 11. Kit que comprende una biopsia de piel obtenida por un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8 para la evaluación de un compuesto cosmético, dermatológico o terapéutico destinado a ser utilizado para la piel.

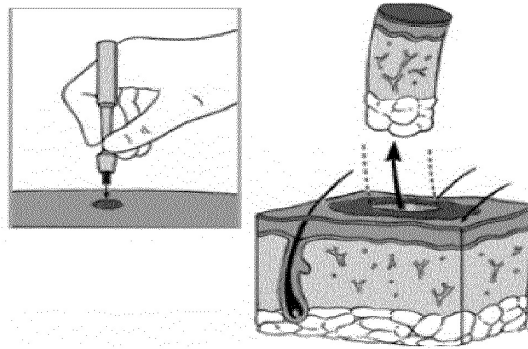


Figura 1A

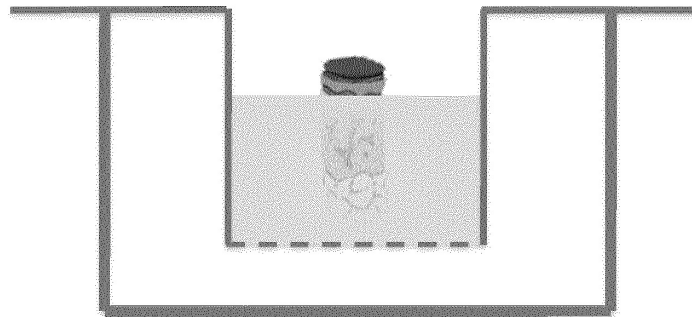


Figura 1B

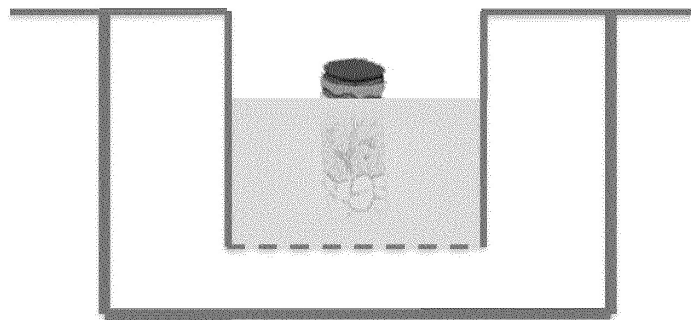


Figura 1C

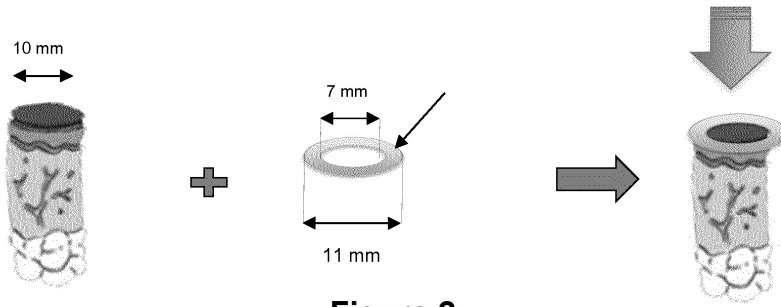


Figura 2

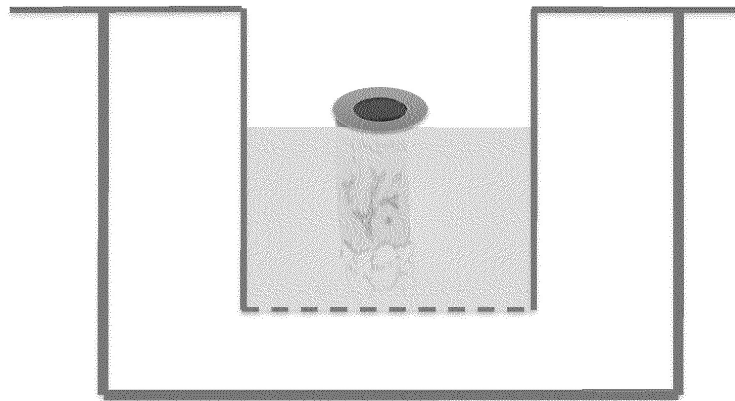


Figura 3A

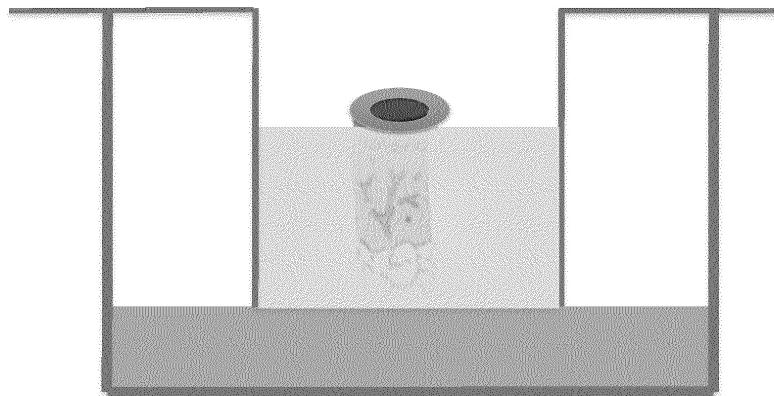


Figura 3B