

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 794 836**

51 Int. Cl.:

A61L 27/60 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2017 PCT/EP2017/069203**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.02.2018 WO18020016**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2017 E 17751324 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3490626**

54 Título: **Equivalente de piel con compartimentos dérmicos yuxtapuestos distintos**

30 Prioridad:

29.07.2016 FR 1657418

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

19.11.2020

73 Titular/es:

**L'OREAL (100.0%)
14 rue Royale
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**ASSELINEAU, DANIEL;
PAGEON, HERVÉ y
RICOIS, SYLVIE**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 794 836 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Equivalente de piel con compartimentos dérmicos yuxtapuestos distintos

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a nuevos equivalentes de piel con heterogeneidad superficial.
- [0002]** Durante muchos años, se ha intentado desarrollar modelos de piel reconstruida que se asemejen lo más posible a la piel humana o animal, con el fin de evitar ensayos experimentales en animales.
- 10 **[0003]** Por lo tanto, es posible reproducir un equivalente dérmico mezclando colágeno y fibroblastos en condiciones que conducen a la formación de tejido dérmico. A continuación, esta etapa puede ir seguida por la reconstrucción de la piel, permitiendo que crezcan queratinocitos en este sustrato para generar una epidermis. El documento EP1046402 describe modelos de piel reconstruida para estudios de piel envejecida, el documento FR2930644 para la evaluación de la pigmentación de la piel.
- 15 **[0004]** Estas pieles reconstruidas convencionales, sin embargo, son homogéneas y todavía no son lo suficientemente similares a la piel humana, que es compleja y heterogénea.
- [0005]** Por lo tanto, existe una gran necesidad de nuevas pieles reconstruidas capaces de reproducir la naturaleza heterogénea de la piel.
- 20 **[0006]** Esta necesidad se ha satisfecho por la presente invención.
- [0007]** De hecho, los presentes inventores han desarrollado un equivalente dérmico que comprende 25 compartimentos dérmicos yuxtapuestos longitudinalmente distintos, lo que permite abordar el problema de la heterogeneidad de la piel no en dirección de la profundidad, sino más bien en dirección longitudinal.
- [0008]** De hecho, demostraron que, al centrarse en compartimentos dérmicos distintos, es posible obtener un equivalente de piel que muestre heterogeneidad superficial gracias a las numerosas interacciones existentes entre la 30 dermis y la epidermis, influyendo la calidad de la dermis en la de la epidermis y, en consecuencia, la apariencia de la epidermis y de la piel superficial.
- [0009]** Por lo tanto, demostraron que una dermis subdividida en compartimentos longitudinalmente distintos permitía abordar las diferencias epidérmicas locales en términos de diferenciación epidérmica y queratinización, dando 35 lugar a efectos superficiales, permitiendo así el estudio de problemas relacionados con la heterogeneidad de la piel.
- [0010]** Los inventores demostraron que es posible preparar dermis que muestren compartimentos dérmicos longitudinalmente distintos, distinguidos por las subpoblaciones dérmicas presentes (fibroblastos papilares y 40 reticulares, o cualquier otra población de fibroblastos), o por las características del colágeno utilizado (glicado o no, o que ha sufrido cualquier otra modificación oxidativa).
- [0011]** Por lo tanto, la presente invención se refiere a un equivalente dérmico longitudinalmente que comprende al menos dos compartimentos dérmicos yuxtapuestos distintos con diferentes composiciones.
- 45 **[0012]** La presente invención también se refiere a un equivalente de piel que presenta heterogeneidad superficial que comprende un equivalente dérmico según la invención.
- [0013]** Un ejemplo de equivalente de piel según la invención, cuyo equivalente dérmico comprende longitudinalmente tres compartimentos dérmicos yuxtapuestos distintos con diferentes composiciones, se presenta en 50 la figura 1.
- [0014]** Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un equivalente dérmico según la invención, que comprende una etapa que consiste en preparar al menos dos entramados yuxtapuestos longitudinalmente distintos de diferentes composiciones, siendo uno de los al menos dos entramados preparado dentro 55 de un molde, mientras que el otro se prepara en la periferia del molde.
- [0015]** Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un equivalente de piel según la invención, que comprende una etapa de preparación de un equivalente dérmico mediante el procedimiento para la preparación de un equivalente dérmico según la invención.
- 60 **[0016]** La presente invención también se refiere al uso de un equivalente dérmico según la invención para la preparación de un equivalente de piel que presenta heterogeneidad superficial.
- [0017]** Otro objeto de la invención se refiere al uso, preferentemente *in vitro*, de un equivalente dérmico según 65 la invención, o de un equivalente de piel según la invención para estudiar heterogeneidades de la piel o trastornos

relacionados con la heterogeneidad de la piel, tales como envejecimiento de la piel y/o inflamación y/o pigmentación.

[0018] Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento de cribado para un compuesto que presenta actividad después de la aplicación tópica sobre la piel, en particular sobre piel que presenta heterogeneidades, particularmente en el campo del antienvjecimiento, tal como para el tratamiento de arrugas y líneas y/o en el campo de la inflamación y/o en el campo de la pigmentación, tal como, por ejemplo, para el tratamiento de manchas de pigmentación, comprendiendo dicho procedimiento de cribado la aplicación de un compuesto candidato sobre el equivalente dérmico según la invención, o sobre el equivalente de piel según la invención.

10 Descripción detallada de la invención

Equivalente dérmico y procedimiento de preparación

[0019] "Compartimento dérmico" significa en esta invención un área de equivalente dérmico que comprende fibroblastos y colágeno.

[0020] Por lo tanto, el equivalente dérmico según la invención comprende longitudinalmente al menos dos compartimentos dérmicos yuxtapuestos distintos, que comprenden en particular fibroblastos y colágeno, pero de diferentes composiciones.

[0021] El equivalente dérmico según la invención comprende, longitudinalmente, al menos dos, preferentemente al menos 3 compartimentos dérmicos yuxtapuestos distintos, de diferentes composiciones.

[0022] "Compartimentos dérmicos yuxtapuestos" significa en esta invención que los compartimentos dérmicos están en contacto entre sí a través de una de sus caras laterales.

[0023] "Compartimentos distintos de diferentes composiciones" significa en esta invención que los compartimentos dérmicos del equivalente dérmico se pueden distinguir entre sí por su composición, en particular por la naturaleza de las células y en particular de los fibroblastos, comprendidos en el compartimento y/o por la naturaleza del colágeno comprendido en el compartimento y/o por el tratamiento aplicado a uno de los constituyentes del compartimento.

[0024] El colágeno presente en los compartimentos dérmicos del equivalente dérmico según la invención puede ser de cualquier tipo y de cualquier origen. Preferentemente, el colágeno se selecciona de entre los colágenos fibrilares de tipo I, III o V. Preferentemente, el colágeno es de tipo I. Preferentemente, el colágeno es de origen animal, en particular de origen bovino. Particularmente, preferentemente, el colágeno es colágeno bovino de tipo I. Como alternativa, el colágeno puede ser una mezcla de diferentes tipos de colágeno, en cualquier proporción y/o de diversos orígenes.

[0025] En una realización particular, uno de los compartimentos dérmicos comprende colágeno que experimentó modificación oxidativa, y otro de los compartimentos dérmicos comprende colágeno que no experimentó modificación oxidativa, o que experimentó otra modificación oxidativa, diferente de la del primer compartimento.

[0026] Algunos ejemplos de modificación oxidativa incluyen glicación, carbonilación y carbamilación.

[0027] En una realización particular, uno de los compartimentos dérmicos comprende colágeno glicado y otro de los compartimentos dérmicos comprende colágeno no glicado.

[0028] "Colágeno glicado" significa en esta invención colágeno que ha experimentado glicación, es decir, colágeno que reaccionó según la reacción de Maillard con una -osa (en particular glucosa o ribosa) para formar una base de Schiff que, después de una reorganización molecular denominada Amadori, puede conducir, a través de una sucesión de reacciones, a la formación de puentes intramoleculares tales como puentes de pentosidina, por ejemplo.

[0029] Diversos procedimientos para monitorizar la formación de productos de glicación se conocen bien por los expertos en la materia, tales como los procedimientos descritos en Cefalu y col. (1995) J. Gerontol A Biol Sci Med Sci 50A:B337-B341, en Sell y col. (1991) Diabetes Metab. Rev. 7:239-251, en Miyata y col. (1996) J. Am. Soc. Nephrol. 7:1198-1206, o en Ahmed y col. (1991) Anal. Biochem. 192:109-111. Por lo tanto, es posible medir el nivel de compuesto de glicación unido al colágeno y/o el nivel de compuesto de glicación restante después de la reacción. Como se ha descrito anteriormente, la glicación de colágeno conduce a la formación de productos de glicación o productos finales de glucosilación avanzada (AGE), tales como pirralina, carboximetil-lisina, pentosidina, N^ε(2-carboxietil)-lisina (CEL), dímero de glioxal-lisina (GOLD), dímero de metilglioxal-lisina (MOLD), 3DG-ARG imidazolona o glucosepano, por ejemplo. Algunos de estos productos de glicación tienen la particularidad de emitir fluorescencia medible tras la excitación. Por ejemplo, la pentosidina, cuando se excita a una longitud de onda (λ_{ex}) de 328 nm, emite fluorescencia a una longitud de onda (λ_{em}) de 378 nm. De manera similar, los AGE, cuando se excitan a una longitud de onda (λ_{ex}) de 370 nm, emiten fluorescencia a una longitud de onda (λ_{em}) de 440 nm. Típicamente, la relación de

- fluorescencia emitida por un producto de glicación dado en un compartimento dérmico que comprende al menos colágeno y fibroblastos glicados con respecto a la fluorescencia emitida por el mismo producto de glicación en un compartimento dérmico que comprende al menos colágeno y fibroblastos no glicados, medidos en las mismas condiciones experimentales, permite caracterizar el nivel de glicación del compartimento dérmico que comprende colágeno glicado. Preferentemente, en el contexto de la invención, el nivel de glicación del compartimento dérmico que comprende colágeno glicado se determina midiendo la fluorescencia de pentosidina y/o AGE. El colágeno glicado se puede obtener mediante cualquier técnica bien conocida por los expertos en la materia, en particular, preincubando colágeno con un azúcar, en particular ribosa o glucosa, antes de su uso para preparar el compartimento dérmico.
- 5
- 10 **[0030]** Los fibroblastos presentes en los compartimentos dérmicos del equivalente dérmico según la invención pueden ser de cualquier origen, aunque son preferentemente fibroblastos de origen humano. Se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante disociación mecánica y/o enzimática de macromoléculas de matriz extracelular dérmica, o mediante el crecimiento de fibroblastos a partir de explantes.
- 15
- [0031]** Los fibroblastos presentes en los compartimentos dérmicos del equivalente dérmico según la invención pueden ser, en particular, fibroblastos papilares y/o fibroblastos reticulares.
- [0032]** "Fibroblastos papilares" significa en esta invención fibroblastos de la dermis papilar.
- 20 **[0033]** "Fibroblastos reticulares" significa en esta invención fibroblastos de la dermis reticular.
- [0034]** En una realización particular de la invención, uno de los compartimentos dérmicos comprende fibroblastos papilares y otro de los compartimentos dérmicos comprende fibroblastos reticulares.
- 25 **[0035]** Los compartimentos dérmicos del equivalente dérmico según la invención también pueden comprender cualquier otro componente que pueda estar presente constitutivamente en la piel, tal como células endoteliales, macrófagos, monocitos, precursores de macrófagos, precursores de células dendríticas o células nerviosas.
- 30 **[0036]** El equivalente dérmico según la invención comprende, longitudinalmente, al menos dos compartimentos dérmicos yuxtapuestos distintos de diferentes composiciones. Además, puede mostrar verticalmente diferencias en la composición. En particular, puede incluir diversas capas de compartimentos dérmicos de diferentes composiciones.
- [0037]** La presente invención también se refiere a un procedimiento para la preparación de un equivalente dérmico como se ha definido anteriormente, que comprende una etapa que consiste en preparar al menos dos entramados yuxtapuestos longitudinalmente distintos de diferentes composiciones, siendo uno de los al menos dos entramados preparado dentro de un molde, mientras que el otro se prepara en la periferia del molde.
- 35 **[0038]** Los al menos dos entramados comprenden colágeno y fibroblastos como se ha definido anteriormente, pero con diferentes composiciones.
- 40 **[0039]** Preferentemente, la etapa de preparación para los al menos dos entramados comprende la preparación de al menos dos soluciones distintas de diferentes composiciones, una para el interior del molde, y la otra para la periferia del molde.
- 45 **[0040]** Las al menos dos soluciones utilizadas para preparar los entramados comprenden colágeno y una suspensión celular de fibroblastos, y muestran diferentes composiciones.
- [0041]** En una realización, una de las al menos dos soluciones comprende una suspensión celular de fibroblastos papilares y la otra de las al menos dos soluciones comprende una suspensión celular de fibroblastos reticulares, tal como se ha definido anteriormente.
- 50 **[0042]** En otra realización, una de las al menos dos soluciones comprende colágeno glicado, mientras que la otra de las al menos dos soluciones comprende colágeno no glicado, como se ha definido anteriormente.
- 55 **[0043]** Preferentemente, las al menos dos soluciones comprenden además medio MEM 1,76X, FCS, NaOH y medio MEM Hepes 25 mM FCS al 10 %.
- [0044]** Como se ha mencionado anteriormente, el colágeno utilizado puede ser cualquier tipo de colágeno, de cualquier origen, ya sea en solitario o en mezcla.
- 60 **[0045]** La solución puede comprender colágeno a una concentración de entre 2 mg/ml y 6 mg/ml, preferentemente entre 3 mg/ml y 5 mg/ml.
- 65 **[0046]** Cuando se utiliza colágeno glicado, la glicación se puede realizar mediante cualquier técnica bien

conocida por los expertos en la técnica, tal como, por ejemplo, la descrita en la solicitud de patente francesa FR2792650.

5 **[0047]** Preferentemente, la solución comprende fibroblastos a una concentración de 1×10^5 a 5×10^6 células/ml, preferentemente a una concentración de 2×10^5 a 2×10^6 células/ml.

[0048] En el contexto de la invención, los al menos dos entramados se preparan en ambos lados de un molde: uno de los al menos dos entramados se prepara dentro de un molde, y el otro se prepara en la periferia o fuera del molde.

10

[0049] Cada uno de los entramados preparados a cada lado del molde se puede preparar mediante cualquier técnica bien conocida por los expertos en la técnica.

15 **[0050]** En particular, cada solución como se ha definido anteriormente, que comprende colágeno y una suspensión celular de fibroblastos, se puede depositar en un sustrato que comprende el molde.

[0051] Preferentemente, las soluciones se incuban de tal manera que permitan la gelificación de colágeno, por ejemplo, durante 10 a 30 min.

20 **[0052]** Preferentemente, el molde se retira una vez que se obtiene la gelificación del entramado, y los entramados se mantienen preferentemente en incubación para permitir que se contraigan. Preferentemente, los entramados se mantienen en incubación durante 1 a 7 días, incluso más preferentemente durante 3 días.

25 **[0053]** El molde utilizado en el contexto de la invención puede ser de cualquier forma y de cualquier material adecuado para el cultivo celular. Por lo tanto, el molde utilizado en el contexto de la invención puede ser rectangular o circular. El molde utilizado en el contexto de la invención está hecho preferentemente de Teflon.

30 **[0054]** En la medida en que el contenido dérmico influye en la diferenciación del compartimento epidérmico, comprendiendo el equivalente dérmico longitudinalmente al menos dos compartimentos dérmicos yuxtapuestos distintos según la invención, puede servir como sustrato para la formación de un equivalente de piel que presenta heterogeneidad superficial inducida por los diferentes compartimentos dérmicos subyacentes.

35 **[0055]** Por consiguiente, la presente invención también se refiere al uso de un equivalente dérmico según la invención para la preparación de un equivalente de piel que presenta heterogeneidad superficial.

Equivalente de piel

40 **[0056]** La presente invención también se refiere a un equivalente de piel que presenta heterogeneidad superficial, que comprende un equivalente dérmico como se define en la sección "*Equivalente dérmico y procedimiento de preparación*" anterior.

45 **[0057]** Por "heterogeneidad superficial" se entiende en esta invención que la superficie del equivalente de piel presenta propiedades o características que varían a lo largo de su longitud, por ejemplo: diferencias en la pigmentación, en la diferenciación de la zona epidérmica superficial, en la elasticidad superficial, etc.

[0058] El equivalente de piel según la invención comprende, en el equivalente dérmico, un equivalente epidérmico que comprende al menos queratinocitos.

50 **[0059]** Los queratinocitos pueden ser de cualquier origen, pero preferentemente son queratinocitos de origen humano. Se pueden preparar mediante cualquier procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica. Por consiguiente, los queratinocitos se pueden preparar cultivando epidermis disociada de muestras de piel normal, o cultivando queratinocitos de la vaina de un folículo piloso.

[0060] Preferentemente, los queratinocitos son queratinocitos de piel humana normal.

55

[0061] Aún más preferentemente, los queratinocitos se preparan a partir de epidermis humana disociada a partir de una muestra de piel normal según el procedimiento descrito en Regnier y col., *Frontier of Matrix Biology*, Vol. 9, 4-35 (Karger, Basel, 1981).

60 **[0062]** El equivalente epidérmico puede comprender cualquier otro tipo de célula, tal como células de Langerhans y/o precursores de células de Langerhans y/o melanocitos.

[0063] Ventajosamente, el equivalente epidérmico comprende además melanocitos y/o células de Langerhans y/o precursores de células de Langerhans.

65

[0064] Los melanocitos pueden aislarse de cualquier órgano que los contenga, tal como la piel normal o el folículo piloso. Preferentemente, los melanocitos se aíslan de la piel normal. Se puede utilizar cualquier procedimiento de preparación de melanocitos bien conocido por los expertos en la técnica, tal como el procedimiento descrito en Olsson y col. (1994) Acta. Derm. Venereol. 74:226-268.

5

[0065] Las células de Langerhans y/o los precursores de células de Langerhans pueden ser como se describe en la solicitud de patente europea EP 789074.

[0066] Preferiblemente, el equivalente epidérmico no está compartimentado longitudinalmente.

10

[0067] "Equivalente epidérmico no compartimentado longitudinalmente" significa en esta invención que el equivalente epidérmico se prepara a partir de una única composición sembrada en al menos dos compartimentos dérmicos yuxtapuestos distintos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, como la dermis y la epidermis interactúan fuertemente, las diferencias en los distintos compartimentos dérmicos yuxtapuestos pueden inducir diferencias longitudinales en las propiedades del equivalente epidérmico formado.

15

[0068] La presente invención también se refiere a un procedimiento para preparar un equivalente de piel como se ha definido anteriormente, que comprende una etapa de preparación de un equivalente dérmico mediante el proceso de preparación de un equivalente dérmico tal como se define en la sección "*Equivalente dérmico y procedimiento de preparación*".

20

[0069] Preferentemente, el proceso de preparación de un equivalente de piel comprende, después de la etapa de preparación del equivalente dérmico, una etapa de reconstitución, en el equivalente dérmico, de un equivalente epidérmico, que comprende al menos queratinocitos.

25

[0070] Esta etapa de reconstitución de un equivalente epidérmico se puede realizar mediante cualquier técnica bien conocida por los expertos en la técnica, tales como las técnicas descritas en las solicitudes de patente EP 285471, EP285474, EP789074, EP502172, EP418035, WO91/16010, EP197090, EP20753, FR2665175 y FR2689904, o que se describen en Asselineau y col. (1985) Exp. Cell. Res. 159:536-539, en Asselineau y col. (1987), Models in dermatol., col III, Ed. Lowe&Mailbach, 1-7 o en Asselineau y col. (1984) Br J Dermatol. 111 Suppl 27:219-22.

30

[0071] Esta etapa de reconstitución puede estar ventajosamente precedida por una etapa de colágeno, en una placa de cultivo, del equivalente dérmico preparado, por ejemplo, utilizando una solución adhesiva que comprende medio MEM 1,76X, FCS, NaOH 0,1 N y MEM Hepes 25 mM FCS al 10 %.

35

[0072] Preferentemente, la etapa de reconstitución se implementa sembrando queratinocitos en el equivalente dérmico, preferentemente en un anillo de siembra.

[0073] Después de sembrar los queratinocitos en el equivalente dérmico, el cultivo se puede mantener ventajosamente sumergido en medio nutritivo, que puede ser, por ejemplo, el medio descrito por Rheinwald y Green (1975) Cell 6:317-330, que permite la proliferación de queratinocitos.

40

[0074] Después de un periodo de incubación, preferentemente de 3 a 15 días, incluso más preferentemente de 7 a 9 días, el equivalente de piel se mantiene preferentemente en la interfaz aire/líquido, por ejemplo, depositándolo en una malla metálica. Este líquido está constituido entonces preferentemente por el mismo medio nutritivo que anteriormente.

45

[0075] A continuación, la incubación continúa, preferentemente hasta que se obtiene un equivalente de piel que muestra las características de la piel, es decir, un equivalente dérmico cubierto por un equivalente epidérmico que presenta las cuatro capas celulares estándar, concretamente, el estrato basal, el estrato suprabasal, el estrato granuloso y el estrato córneo. De esta manera, la incubación se continúa preferentemente durante una duración de entre 5 y 30 días, preferentemente entre 7 y 10 días.

50

Usos

55

[0076] La presente invención también se refiere al uso de un equivalente dérmico como se define en la sección "*Equivalente dérmico y procedimiento de preparación*" anterior, o de un equivalente de piel como se define en la sección "*Equivalente de piel y procedimiento de preparación*" anterior, para estudiar heterogeneidades de la piel o trastornos relacionados con la heterogeneidad de la piel, tales como envejecimiento de la piel y/o inflamación y/o pigmentación.

60

[0077] En particular, el equivalente dérmico y/o el equivalente de piel según la invención son útiles para estudiar la aparición de arrugas o manchas de pigmentación, o cualquier otro fenómeno relacionado con el envejecimiento y/o la pigmentación de la piel, en particular asociado con el fotoenvejecimiento, más específicamente asociado con el efecto de la radiación ultravioleta en la piel, tal como queratosis actínica.

65

[0078] La presente invención también se refiere a un procedimiento de cribado para un compuesto que presenta actividad después de la aplicación tópica sobre la piel, en particular sobre piel que presenta heterogeneidades, particularmente en el campo del antienvjecimiento, tal como para el tratamiento de arrugas y líneas y/o en el campo de la inflamación y/o en el campo de la pigmentación, tal como, por ejemplo, para el tratamiento de manchas de pigmentación, comprendiendo dicho procedimiento de cribado la aplicación de un compuesto candidato sobre el equivalente dérmico según la invención, o sobre el equivalente de piel según la invención.

[0079] La presente invención se ilustrará con más detalle mediante las figuras y el ejemplo a continuación en esta invención.

Breve descripción de las figuras

[0080]

Figura 1: Representación esquemática del equivalente de piel según la invención, que comprende el equivalente dérmico, que comprende longitudinalmente al menos dos compartimentos dérmicos yuxtapuestos distintos de diferentes composiciones según la invención.

Figura 2: (A) Histología del equivalente de piel obtenido en el ejemplo, que comprende 3 compartimentos dérmicos yuxtapuestos distintos: comprendiendo un compartimento fibroblastos reticulares rodeados por dos compartimentos que comprenden fibroblastos papilares. (B) Etiquetado de la filagrina presente en el equivalente de piel obtenido en el ejemplo.

25 Ejemplo

[0081] Este ejemplo muestra una piel reconstruida que presenta, como alternativa, a nivel dérmico, zonas con fibroblastos papilares o reticulares.

30 *Preparación del equivalente dérmico con tres compartimentos distintos*

[0082] Dos soluciones de fibroblastos humanos, comprendiendo unos fibroblastos papilares, y los otros fibroblastos reticulares, se preparan en medio MEM Hepes 25 mM con FCS al 10 % a una velocidad de 2×10^6 células/ml.

35

[0083] A partir de estas soluciones de fibroblastos, se preparan dos soluciones de preparación de entramado distintas, una (solución A) para la periferia de un molde de inclusión de Teflon rectangular de 1,5 cm x 3,8 cm y la otra (solución B) para el interior de este molde.

[0084] La solución A comprende 3,22 ml de medio MEM 1,76X, 0,63 ml de FXS, 0,35 ml de NaOH 0,1 N, 0,2 ml de medio MEM Hepes 25 mM, FCS al 10 % y 0,5 ml de una solución de fibroblastos papilares.

[0085] La solución B comprende 3,22 ml de medio MEM 1,76X, 0,63 ml de FXS, 0,35 ml de NaOH 0,1 N, y 0,2 ml de medio MEM Hepes 25 mM, FCS al 10 % y 0,5 ml de una solución de fibroblastos reticulares.

45

[0086] Se añaden lentamente 2,1 ml de solución de colágeno I soluble en ácido frío (5 mg/ml) a las soluciones A y B.

[0087] Las soluciones se mezclan con una pipeta hasta su homogeneización.

50

[0088] El molde rectangular se coloca en el centro de una placa de microscopio cuadrada de 4 cm x 4 cm cubierta con una solución que comprende 3,22 ml de medio MEM 1,76X, 0,63 ml de FXS, 0,35 ml de NaOH 0,1 N y 0,2 ml de medio MEM Hepes 25 mM, FCS al 10 %. El conjunto se incuba a 37 °C.

[0089] Se vierten 1,7 ml de solución B en el molde y 5,3 ml de solución A en la periferia del molde. A continuación, el conjunto se incuba durante 15 a 20 min, para permitir que se produzca gelificación.

[0090] Una vez obtenida la gelificación, se retira el molde y se transfiere la placa a 37 °C, CO₂ al 5 %.

[0091] Después, la preparación se incuba a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 3 días para permitir que los entramados se contraigan.

Preparación de equivalente de piel

[0092] La siembra con queratinocitos para obtener el equivalente de piel completo se realiza después de 3 días

de contracción del entramado.

[0093] Se prepara una solución adhesiva mezclando 0,46 ml de medio MEM 1,76X, 0,09 ml de FCS, 0,05 ml de NaOH 0,1 N, 0,1 ml de medio MEM Hepes con SVF al 10 % y 0,3 ml de colágeno dializado.

5

[0094] Una gota de esta solución se deposita en medio de una placa de cultivo. Los entramados que comprenden los 3 compartimentos dérmicos preparados anteriormente se toman y se colocan en la gota de solución adhesiva, a continuación, se incuban en el horno a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 20-30 min.

10 **[0095]** Los queratinocitos se ponen en solución en medio MEM con FCS al 10 % + 3F a una concentración de 1x10⁵ células/ml.

[0096] Se coloca un anillo de siembra en los entramados unidos y se depositan 0,5 ml de suspensión celular de queratinocitos en este anillo. Se añade medio MEM con FCS al 10 %+3F alrededor del anillo.

15

[0097] A continuación, se incuba el conjunto a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 2 h.

[0098] Después, el anillo de siembra se retira y las placas se incuban de nuevo a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 7 días, cambiándose el medio de cultivo dos veces por semana.

20

[0099] Después de 7 días de cultivo por inmersión, las pieles se sacan: el adhesivo alrededor de la piel a sacar se corta y el equivalente de piel se transfiere a una malla de emersión en una placa que comprende medio MEM con FCS al 10 % + 3F.

25 **[0100]** Las placas se incuban a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 7 días, cambiándose el medio de cultivo dos veces por semana.

Análisis de los equivalentes de piel obtenidos

30 **[0101]** El equivalente de piel obtenido se estudió por histología y se etiquetó para detectar filagrina. Como se muestra en la **figura 2**, resulta evidente en las histologías correspondientes a las zonas de compartimento dérmico con fibroblastos papilares y de compartimento dérmico con fibroblastos reticulares, que las áreas epidérmicas correspondientes a estos compartimentos pueden distinguirse por la calidad de su diferenciación, que es menos pronunciada para el compartimento de fibroblastos reticulares en comparación con el compartimento de fibroblastos papilares.

35

[0102] Esto se confirma, en el estrato granuloso, por el etiquetado de la filagrina, que es más fuerte en presencia de una parte dérmica que contiene fibroblastos papilares, en comparación con una parte dérmica que contiene fibroblastos reticulares.

REIVINDICACIONES

1. Equivalente dérmico que comprende longitudinalmente al menos dos compartimentos dérmicos yuxtapuestos distintos de diferentes composiciones.
5
2. Equivalente dérmico según la reivindicación 1, en el que al menos uno de los al menos dos compartimentos dérmicos comprende colágeno que ha experimentado modificación oxidativa, y al menos otro de los al menos dos compartimentos dérmicos comprende colágeno que no ha experimentado modificación oxidativa, o que ha experimentado otra modificación oxidativa diferente del primer compartimento.
10
3. Equivalente dérmico según la reivindicación 1 o 2, en el que al menos uno de los al menos dos compartimentos dérmicos comprende fibroblastos papilares y al menos otro de los al menos dos compartimentos dérmicos comprende fibroblastos reticulares.
- 15 4. Equivalente de piel que presenta heterogeneidad superficial, que comprende un equivalente dérmico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Procedimiento para la preparación de un equivalente dérmico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una etapa que consiste en preparar al menos dos entramados yuxtapuestos longitudinalmente
20 distintos de diferentes composiciones, siendo uno de los al menos dos entramados preparado dentro de un molde, mientras que el otro se prepara en la periferia del molde.
6. Procedimiento de preparación según la reivindicación 5, en el que la etapa de preparación de los al menos dos entramados comprende la preparación de al menos dos soluciones distintas de diferentes composiciones,
25 una para el interior del molde y la otra para la periferia del molde.
7. Procedimiento de preparación de un equivalente de piel según la reivindicación 4, que comprende una etapa de preparación de un equivalente dérmico mediante el procedimiento según la reivindicación 5 o 6.
- 30 8. Uso de un equivalente dérmico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un equivalente de piel que presenta heterogeneidad superficial.
9. Uso de un equivalente dérmico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o de un equivalente de piel según la reivindicación 4, para estudiar heterogeneidades cutáneas tales como envejecimiento de la piel y/o
35 inflamación y/o pigmentación.
10. Procedimiento de cribado para un compuesto que presenta actividad después de la aplicación tópica sobre la piel, en particular sobre piel que presenta heterogeneidades, particularmente en el campo del antienvjecimiento, tal como para el tratamiento de arrugas y líneas y/o en el campo de la inflamación y/o en el campo
40 de la pigmentación, tal como, por ejemplo, para el tratamiento de manchas de pigmentación, comprendiendo dicho procedimiento de cribado la aplicación de un compuesto candidato sobre el equivalente dérmico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o sobre el equivalente de piel según la reivindicación 4.

