

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 284**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6881** (2008.01)

**C12N 5/077** (2010.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2018 PCT/EP2018/076347**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2019 WO19063731**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2018 E 18773228 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024 EP 3688192**

54 Título: **Firmas moleculares de tres subpoblaciones de fibroblastos dérmicos y equivalente dérmico que comprende una de estas subpoblaciones**

30 Prioridad:

**28.09.2017 FR 1759026**

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

**30.09.2024**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HAYDONT, VALÉRIE y  
ASSELINEAU, DANIEL**

74 Agente/Representante:

**PONTI & PARTNERS, S.L.P.**

ES 2 980 284 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

Firmas moleculares de tres subpoblaciones de fibroblastos dérmicos y equivalente dérmico que comprende una de estas subpoblaciones

5 La presente invención se refiere a la identificación de subpoblaciones de fibroblastos dérmicos.

La piel se compone de dos compartimentos relacionados, a saber, la epidermis y la dermis.

10 La epidermis está compuesta principalmente por tres tipos de células, a saber, queratinocitos, que son mayoría entre las células de la epidermis, los melanocitos y las células de Langerhans. Estas células forman un epitelio queratinizado que se diferencia en capas superpuestas sobre las cuales hay una capa de células muertas que forman el estrato córneo.

15 La dermis proporciona un soporte sólido para la epidermis. También le proporciona alimento. Está compuesto principalmente por fibroblastos y una matriz extracelular.

La dermis contiene más exactamente dos capas distintas: la capa superficial papilar (300-400 µm, que está en contacto con la epidermis) y la capa reticular subyacente (que se extiende hasta la hipodermis). La trabécula conjuntiva de la dermis que también puede extenderse hasta la hipodermis.

20 La dermis papilar se caracteriza por una matriz extracelular relativamente delgada con una alta densidad celular, mientras que la dermis reticular tiene una red muy densa de fibras de matriz y una baja densidad celular. Los constituyentes de la matriz también son diferentes en las dos capas.

25 Además, cuando se cultivan los fibroblastos de estas distintas capas, denominados fibroblastos papilares y fibroblastos reticulares, respectivamente, tienen características morfológicas distintas. Por ejemplo, los fibroblastos reticulares tienen una apariencia alargada y más cuadrada, mientras que los fibroblastos papilares generalmente tienen una morfología fusiforme delgada. Además, se observan diferencias en proliferación, producción de matriz de cultivo, respuesta a factores de crecimiento y producción de factores de crecimiento entre estas dos subpoblaciones celulares.

30 De este modo, en la piel normal, la dermis está compuesta por al menos dos subpoblaciones de fibroblastos, lo que necesariamente tiene consecuencias esenciales sobre la propia piel.

35 WO2013/076240 describe marcadores de fibroblastos reticulares y de fibroblastos papilares.

Heymer et al (2009) (BIOQUIMICA, vol. 2, 1 de enero de 2009 (2009-01-01), páginas 12-14) describen el aislamiento de queratinocitos y fibroblastos del prepucio humano mediante incubación enzimática en una sola etapa utilizando productos Liberase de grado de investigación.

40 En el campo de los equivalentes de piel (o pieles reconstruidas *in vitro*), es esencial reproducir con la mayor precisión posible las características y propiedades de los diferentes constituyentes de la piel normal para reflejar lo más fielmente posible las reacciones de la piel normal.

45 Habiendo visto diferencias en las propiedades entre las subpoblaciones de fibroblastos dérmicos, es importante que un equivalente de piel *in vitro* comprenda subpoblaciones de fibroblastos dérmicos claramente identificadas usando biomarcadores.

La presente invención satisface esta necesidad.

50 Janson et al. (2012) Journal of Investigative Dermatology 132:2565-2572 realizaron un estudio de transcriptoma para identificar firmas moleculares de fenotipos papilares y reticulares. Identificaron que la proteína MGP se expresa exclusivamente en la dermis reticular, mientras que los genes PDPN y NTN1 presentan una expresión generalmente mayor en los fibroblastos papilares.

55 Nauroy et al. (2017) Journal of Investigative Dermatology identificaron, a partir de muestras de piel de donantes jóvenes únicamente, algunos marcadores expresados diferencialmente en fibroblastos reticulares que no están presentes en fibroblastos papilares. Por ejemplo, se ha identificado que los genes COL11A1, MGP, FGF18, COMP y ACAN están sobreexpresados en fibroblastos reticulares.

60 Sin embargo, estos artículos sólo consideran los fibroblastos papilares y reticulares. Sin embargo, los presentes inventores han demostrado que otra subpoblación de fibroblastos, denominada fibroblastos de la unión dérmica-hipodérmica, podría aislarse en las trabéculas conjuntivas emitidas por la dermis hacia la hipodermis.

Los inventores también han identificado firmas moleculares, que implican un pequeño número de biomarcadores, de modo que se pueden identificar y distinguir las tres subpoblaciones de fibroblastos dérmicos: fibroblastos papilares, fibroblastos reticulares y fibroblastos de la unión dérmica-hipodérmica.

5 Además de aislar por primera vez la subpoblación de fibroblastos de la unión dermo-hipodérmica, estos inventores han demostrado de hecho que los fibroblastos papilares, reticulares y de la unión dermo-hipodérmica podrían identificarse midiendo el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado de los genes UCP2 y FGF9 y opcionalmente los genes COL11A1 y ACAN, y opcionalmente el nivel de expresión del gen KLF9.

10 De hecho, el nivel de expresión del gen UCP2 es significativamente superior en los fibroblastos papilares que en los fibroblastos reticulares y en los fibroblastos de la unión dermo-hipodérmica, mientras que los niveles de expresión de los genes COL11A1, ACAN y FGF9 son significativamente superiores en los fibroblastos reticulares y en los fibroblastos de la unión dermo-hipodérmica que en los fibroblastos papilares. Finalmente, el nivel de expresión del gen KLF9 es significativamente superior en los fibroblastos de la unión dérmica-hipodérmica que en los fibroblastos reticulares.

15 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* de identificación de un fibroblasto dérmico como un fibroblasto papilar, un fibroblasto reticular o un fibroblasto de la unión dérmica-hipodérmica (FJDH), que comprende las siguientes etapas:

- 20 a) proporcionar una muestra biológica que comprende al menos un fibroblasto dérmico,  
b) medir el nivel de un producto de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes UCP2 y FGF9 y opcionalmente los genes COL11A1 y ACAN, y opcionalmente el nivel de un producto de expresión del gen KLF9, y  
25 c) basándose en el nivel o niveles medidos en la etapa b), identificar el fibroblasto dérmico como un fibroblasto papilar, un fibroblasto reticular o un fibroblasto de la unión dérmica-hipodérmica (FJDH),  
y tal como se reivindica en la reivindicación 1.

30 También se describe el uso de un producto de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes UCP2 y FGF9 y opcionalmente los genes COL11A1 y ACAN, opcionalmente en combinación con un producto de expresión del gen KLF9, como marcador para identificar un fibroblasto dérmico *in vitro* como un fibroblasto papilar, un fibroblasto reticular o un fibroblasto de la unión dérmica-hipodérmica (FJDH).

35 En el presente documento se describe un equivalente dérmico *in vitro*, que comprende una subpoblación de fibroblastos de la unión dérmica-hipodérmica (FJDH).

La presente divulgación también describe un equivalente de la piel *in vitro* que comprende un equivalente dérmico.

40 También se describe un kit para identificar un fibroblasto dérmico como un fibroblasto papilar, un fibroblasto reticular o un fibroblasto de la unión dérmica-hipodérmica (FJDH), comprendiendo dicho kit:

- al menos un medio de medición seleccionado del grupo que consiste en un medio para medir el nivel de un producto de expresión del gen UCP2, un medio para medir el nivel de un producto de expresión del gen FGF9, un medio para medir el nivel de un producto de expresión del gen COL11A1 y un medio para medir el nivel de un producto de expresión del gen ACAN

45 y  
- al menos un medio para medir el nivel de un producto de expresión del gen KLF9.

También se describe una micromatriz de ADN para identificar un fibroblasto dérmico como un fibroblasto papilar, un fibroblasto reticular o un fibroblasto de unión dérmica-hipodérmica (FJDH), comprendiendo dicha micromatriz:

50 - al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en una sonda que detecta un producto de expresión del gen UCP2, una sonda que detecta un producto de expresión del gen FGF9, una sonda que detecta un producto de expresión del gen COL11A1 y una sonda que detecta un producto de expresión del gen ACAN

y  
- al menos una sonda que detecta un producto de expresión del gen KLF9.

55 La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

### Descripción detallada de la invención

#### *Fibroblastos*

60 En esta descripción, "fibroblastos dérmicos" se refiere a fibroblastos que se originan en la dermis.

En esta descripción, "fibroblasto papilar" se refiere a un fibroblasto de la dermis papilar, caracterizándose la dermis papilar por una matriz extracelular relativamente delgada y una alta densidad celular. Los fibroblastos papilares en cultivo tienen habitualmente una morfología fusiforme delgada.

65

En esta descripción, "fibroblasto reticular" se refiere a un fibroblasto de la dermis reticular, caracterizándose la dermis reticular por una red relativamente densa de fibras de matriz y una baja densidad celular. Los fibroblastos reticulares en cultivo tienen habitualmente una apariencia alargada y más cuadrada.

5 En esta descripción, "fibroblasto de la unión dermo-hipodérmica" o "fibroblasto FJDH" significa un fibroblasto de la zona situada al mismo nivel que la trabécula conjuntiva emitida por la dermis hacia la hipodermis. Los fibroblastos FJDH en cultivo tienen habitualmente una morfología muy heterogénea. De este modo, se puede observar una  
10 variedad muy amplia de formas en la alfombra celular, que varían desde células tricúspides muy pequeñas hasta células multipolares muy grandes con una red trabecular intracelular fuertemente marcada (visible en microscopía óptica).

#### *Procedimiento de identificación*

15 La etapa (a) en el procedimiento de identificación según la invención incluye proporcionar una muestra biológica que comprende al menos un fibroblasto dérmico, tal como se define en la sección "Fibroblastos" anterior.

En particular, la muestra biológica puede ser un cultivo *in vitro* de fibroblastos dérmicos o una mezcla de fibroblastos dérmicos, una muestra procedente de una biopsia de piel o una muestra procedente de una dermis *in vitro* o un  
20 equivalente de piel.

En particular, la muestra puede proceder de una biopsia de piel humana realizada en sujetos jóvenes, tales como sujetos que tienen entre 15 y 40 años, preferiblemente entre 17 y 31 años.

25 La etapa b) en el procedimiento de identificación según la invención comprende la medición del nivel de un producto de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes UCP2 y FGF9 y opcionalmente los genes COL 11A 1 y ACAN, y opcionalmente el nivel de un producto de expresión del gen KLF9.

30 En esta descripción, "gen UCP2" significa el gen codificante de la "proteína de desacoplamiento mitocondrial 2". El gen UCP2 también se llama gen SLC25A8 y la proteína UCP2 también se llama UCPH o "miembro 8 de la familia de portadores de solutos 25". Pertenece a la familia de proteínas de soporte aniónico mitocondrial (MACP) y controla las especies reactivas de oxígeno derivadas de las mitocondrias. Generalmente se describe en Pecqueur et al. (1999) Biochemical and Biophysical Research Communications 255:40-46. La secuencia de la proteína UCP2 humana normalmente se denomina UniProt número P55851.

35 En esta descripción, "gen ACAN" significa el gen codificante de la "proteína central agregano". El gen ACAN también se denomina gen AGC1, CSPG1 y MSK16 y la proteína ACAN también se denomina "agregano" o "proteína central de proteoglicano específica del cartilago" o CSPCP o "proteína central de proteoglicano de sulfato de condroitina 1" o "proteoglicano de sulfato de condroitina 1". Forma parte de la matriz extracelular del tejido cartilaginoso. Es un  
40 proteoglicano. Se describe habitualmente en Doege et al. (1991) J. Biol. Chem. 15:894-902. La secuencia de la proteína ACAN humana normalmente se denomina UniProt número P16112.

45 En esta descripción, "gen FGF9" significa un gen que codifica el factor de crecimiento de fibroblastos 9. La proteína FGF9 también se denomina "factor activador de Glia" o GAF o "factor de crecimiento de unión a heparina 9" o HBGF-9. Tiene un efecto estimulante del crecimiento de las células gliales en cultivo. Se describe habitualmente en Miyamoto et al. (1993) Molecular and Cellular Biology 13:4251-4259. La secuencia de la proteína FGF9 humana normalmente se denomina UniProt número P31371.

50 En esta descripción "gen COL11A1", significa el gen que codifica la cadena  $\alpha 1$  (XI) de colágeno. El gen COL11A1 también se llama gen COLL6. Esta cadena es una de las dos cadenas alfa del colágeno tipo XI, un colágeno fibrilar menor. Se describe habitualmente en Yoshioka et al. (1990) J. Biol. Chem. 15:6423-6426. La secuencia de la proteína COL11A1 humana normalmente se denomina UniProt número P12107.

55 En esta descripción, "gen KLF9" se refiere a un gen que codifica el factor 9 similar a Krueppel. El gen KLF9 también se denomina gen BTEB o gen BTEB1 y la proteína KLF9 también se denomina factor de transcripción BTEB1 o proteína 1 de unión a caja GC o proteína 1 de unión a elementos de transcripción básica o proteína 1 BTE ("proteína 1 de unión a BTE"). Forma parte de la familia de factores de transcripción con dedos de zinc tipo Sp1 C2H2. Se describe normalmente en Spörl et al. (2012) Proc. Nacional. Acad. Science USA 109:10903-10908. La secuencia de la proteína KLF9 humana normalmente se denomina UniProt número Q13886.

60 En el contexto de la invención, las referencias de UniProt citadas anteriormente son aquellas que estaban disponibles a 31 de julio de 2017.

65 En una realización particular, la etapa (b) comprende la medición del nivel de un producto de expresión de al menos dos genes seleccionados del grupo que consiste en los genes UCP2 y FGF9, y opcionalmente el nivel de un producto de expresión del gen KLF9, preferiblemente al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes UCP2 y FGF9 y al menos un gen elegido del grupo que consiste en los genes ACAN y COL11A1, y opcionalmente el nivel

de un producto de expresión del gen KLF9, preferiblemente al menos 3 genes seleccionados del grupo que consiste en los genes UCP2, ACAN, FGF9 y COL11A1, y opcionalmente el nivel de un producto de expresión del gen KLF9, e incluso más preferiblemente al menos cuatro genes seleccionados del grupo que consiste en los genes UCP2, ACAN, FGF9 y COL11A1, y opcionalmente el nivel de un producto de expresión del gen KLF9.

La etapa (b) comprende la medición del nivel de un producto de expresión de al menos un gen, particularmente al menos 2 genes, seleccionados del grupo que consiste en los genes UCP2 y FGF9. En otra realización particular, la etapa (b) comprende la medición del nivel de un producto de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes UCP2 y FGF9 y al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes COL11A1 y ACAN. En otra realización particular, la etapa (b) comprende la medición del nivel de un producto de expresión de al menos 3 genes, particularmente al menos 4 genes, seleccionados del grupo que consiste en los genes UCP2, ACAN, FGF9 y COL11A1.

En otra realización particular, la etapa (b) comprende la medición del nivel de un producto de expresión de al menos un gen, particularmente al menos 2 genes, 3 genes o 4 genes, seleccionados del grupo que consiste en los genes UCP2, ACAN, FGF9 y COL11A1, y la medición del nivel de un producto de expresión del gen KLF9.

En esta descripción, el término "producto de expresión del gen X" significa el ARNm codificado por dicho gen X o la proteína codificada por dicho gen X. Por tanto, el nivel del producto de expresión del gen X puede medirse cuantificando el ARNm o la proteína correspondiente. En una realización particular, dicho producto de expresión del gen X es el ARNm codificado por dicho gen X.

Preferiblemente, el nivel del producto de expresión corresponde a la concentración o la cantidad del producto de expresión.

El nivel del producto de expresión de un gen X se puede medir en la etapa (b) mediante cualquier técnica conocida por el experto. En particular, cuando el producto de expresión es una proteína, el nivel del producto de expresión se puede medir mediante ensayos inmunológicos, tales como ensayos ELISA, ensayos de inmunofluorescencia (IFA), radioinmunoensayos (RIA), pruebas de unión competitiva o pruebas de transferencia Western. Cuando el producto de expresión es un ARNm, el nivel del producto de expresión se puede medir mediante RT-PCR, qRT-PCR, ddPCR (*Droplet Digital PCR*), mediante secuenciación, por ejemplo mediante secuenciación de tipo NGS (*Next Generation Sequencing*) o mediante secuenciación tipo aislador de célula única ddSEQ™.

Se dice que el nivel del producto de expresión del gen X en la muestra analizada aumenta cuando la relación [nivel de expresión del gen X en la muestra analizada/nivel de control del gen X] es superior o igual a 2.

Se dice que el nivel del producto de expresión del gen X en la muestra analizada disminuye cuando la relación [nivel de control del gen X/nivel de expresión del gen X en la muestra analizada] es superior o igual a 2.

Cuando la relación [nivel de control del gen X/nivel de expresión del gen X en la muestra analizada] es superior o igual a 2, se añade un símbolo (-) antes del valor obtenido.

Esta relación se denomina convencionalmente "factor multiplicador" ("fold change").

La etapa c) en el procedimiento de identificación según la invención comprende la identificación del fibroblasto dérmico como un fibroblasto papilar, un fibroblasto reticular o un fibroblasto de la unión dérmica-hipodérmica (FJDH), en base al nivel o niveles medidos en la etapa (b).

En una realización particular de la invención, la etapa (c) en el procedimiento de identificación según la invención comprende una comparación del nivel o niveles medidos en la etapa b) con uno o más niveles de control.

En esta descripción, "nivel de control" significa un valor de referencia que corresponde preferiblemente al nivel de dicho producto de expresión de dicho gen en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto papilar, reticular o FJDH, y en particular procedente del mismo donante.

En esta descripción, "fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto papilar, reticular o FJDH" significa un fibroblasto dérmico con un tipo (papilar, reticular o FJDH) que ha sido determinado previamente considerando su morfología, su fuente o biomarcadores detectados.

Los fibroblastos dérmicos conocidos como fibroblastos dérmicos papilares se pueden aislar de una piel humana no desgrasada, especialmente en un tejido dermatomado a 300 µm, a continuación se desepidermizan después de la acción de dispasa (Roche - 2,4 U/ml) durante 16 horas a 4 °C.

Los fibroblastos dérmicos conocidos como fibroblastos dérmicos reticulares se pueden aislar de una piel humana no desgrasada a partir de la porción de tejido empobrecida de su unión dérmica-hipodérmica; a continuación, el tejido se dermatoma a 700 µm. Sólo se conserva la parte inferior del tejido.

Los fibroblastos dérmicos conocidos como fibroblastos dérmicos FJDH se pueden recoger de las trabéculas conjuntivas que están presentes en la unión dérmica-hipodérmica. Se pueden recoger con una pinza y unas tijeras.

5 En una realización particular, el nivel de un producto de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes UCP2 y FGF9 se mide preferiblemente en la etapa b), y el fibroblasto dérmico se identifica como un fibroblasto papilar cuando:

(i) el nivel del producto de expresión del gen UCP2 es superior a un nivel de control, y/o

(ii) el nivel del producto de expresión del gen FGF9 es inferior a un nivel de control,

10 siendo preferiblemente los niveles de control en (i) y (ii) los niveles del producto de expresión de los genes UCP2 y FGF9, respectivamente, en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto reticular o fibroblasto FJDH.

En otra realización particular, el nivel de un producto de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes UCP2 y FGF9 y al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes COL11A1 y ACAN se miden preferiblemente en la etapa b), y

15 el fibroblasto dérmico se identifica como fibroblasto papilar cuando:

1)

(i) el nivel del producto de expresión del gen UCP2 es superior a un nivel de control, y/o

(ii) el nivel del producto de expresión del gen FGF9 es inferior a un nivel de control,

20 y

2)

(iii) el nivel de expresión del producto de expresión del gen COL11A1 es inferior a un nivel de control, y/o

(iv) el nivel del producto de expresión del gen ACAN es inferior a un nivel de control, y/o

25 siendo preferiblemente los niveles de control en (i), (ii), (iii) y (iv) los niveles del producto de expresión de los genes UCP2, FGF9, COL11A1 y ACAN en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto reticular o un fibroblasto FJDH.

En otra realización particular, el nivel de un producto de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes UCP2, ACAN, FGF9 y COL11A1, y el nivel de un producto de expresión del gen KLF9 se miden preferiblemente en la etapa b), y

30 el fibroblasto dérmico se identifica como fibroblasto reticular cuando:

1)

(i) el nivel del producto de expresión del gen UCP2 es inferior a un nivel de control,

(ii) el nivel del producto de expresión del gen ACAN es superior a un nivel de control,

(iii) el nivel del producto de expresión del gen FGF9 es superior a un nivel de control, y/o

35 (iv) el nivel del producto de expresión del gen COL11A1 es superior a un nivel de control,

y

2) el nivel del producto de expresión del gen KLF9 es inferior a un nivel de control,

40 siendo preferiblemente los niveles de control en 1(i), 1(ii), 1(iii) y 1(iv) los niveles del producto de expresión de los genes UCP2, ACAN, FGF9 y COL11A1, respectivamente, en un fibroblasto dérmico conocido como un fibroblasto papilar y siendo preferiblemente el nivel de control de 2) el nivel del producto de expresión del gen KLF9 en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto FJDH.

En otra realización particular, el nivel de un producto de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes UCP2, ACAN, FGF9 y COL11A1 y el nivel de un producto de expresión del gen KLF9 se miden preferiblemente en la etapa b), y

45 el fibroblasto dérmico se identifica como un fibroblasto de unión dermo-hipodérmica cuando:

1)

(i) el nivel del producto de expresión del gen UCP2 es inferior a un nivel de control,

(ii) el nivel del producto de expresión del gen ACAN es superior a un nivel de control,

50 (iii) el nivel del producto de expresión del gen FGF9 es superior a un nivel de control, y/o

(iv) el nivel del producto de expresión del gen COL11A1 es superior a un nivel de control,

y

2) el nivel del producto de expresión del gen KLF9 es superior a un nivel de control,

55 siendo preferiblemente los niveles de control en 1(i), 1(ii), 1(iii) y 1(iv) los niveles del producto de expresión de los genes UCP2, ACAN, FGF9 y COL11A1, respectivamente, en un fibroblasto dérmico conocido como un fibroblasto papilar y siendo preferiblemente el nivel de control de 2) el nivel del producto de expresión del gen KLF9 en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto reticular.

En esta descripción "nivel superior", significa un nivel estadísticamente significativamente superior al nivel de control. Preferiblemente, el nivel superior es al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 2,06 veces, al menos 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 3,2 veces, al menos 3,5 veces, al menos 4 veces, al menos 4,2 veces, al menos 4,28 veces, al menos 4,5 veces, al menos 5 veces, al menos 5,5 veces, al menos 5,8 veces, al menos 5,83 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos al menos 28 veces, al menos 28,5 veces o al menos 28,6 veces superior al nivel de control definido anteriormente.

65

En esta descripción "nivel inferior", significa un nivel estadísticamente significativamente más bajo que el control. Preferiblemente el nivel reducido es al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 2,06 veces, al menos 2,5 veces, al menos 3 veces, al menos 3,2 veces, al menos 3,5 veces, al menos 4 veces, al menos 4,2 veces, al menos 4,28 veces, al menos 4,5 veces, al menos 5 veces, al menos 5,5 veces, al menos 5,8 veces, al menos 5,83 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces , al menos 28 veces, al menos 28,5 veces o al menos 28,6 veces inferior a el nivel de control definido anteriormente.

Preferiblemente, el fibroblasto dérmico se identifica como un fibroblasto papilar cuando:

(i) el nivel del producto de expresión del gen UCP2 es al menos 5 veces superior, y particularmente al menos 5,5 veces, al menos 5,8 veces o al menos 5,83 veces superior a un nivel de control como se define anteriormente, particularmente con referencia al nivel del producto de expresión del gen UCP2 en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto reticular, y/o

(ii) el nivel del producto de expresión del gen FGF9 es al menos 4 veces inferior, y particularmente al menos 4,2 veces o al menos 4,28 veces inferior a un nivel de control como se define anteriormente, particularmente con referencia al nivel del producto de expresión del gen FGF9 en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto reticular.

También preferiblemente, el fibroblasto dérmico se identifica como un fibroblasto papilar cuando:

1)

(i) el nivel del producto de expresión del gen UCP2 es al menos 5 veces superior, y en particular al menos 5,5 veces, al menos 5,8 veces o al menos 5,83 veces superior a un nivel de control tal como se definió anteriormente, particularmente con referencia al nivel del producto de expresión del gen UCP2 en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto reticular, y/o

(ii) el nivel del producto de expresión del gen FGF9 es al menos 4 veces inferior, y particularmente al menos 4,2 veces o al menos 4,28 veces inferior a un nivel de control tal como se definió anteriormente, particularmente con referencia al nivel del producto de expresión del gen FGF9 en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto reticular.

y  
2)

(iii) el nivel del producto de expresión del gen COL11A1 es al menos 25 veces inferior, y particularmente al menos 28 veces, al menos 28,5 veces o al menos 28,6 veces inferior a un nivel de control tal como se definió anteriormente, particularmente con referencia al nivel del producto de expresión del gen COL11A1 en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto reticular, y/o

(iv) el nivel del producto de expresión del gen ACAN es al menos 3 veces inferior, y particularmente al menos 3,2 veces inferior a un nivel de control, tal como se definió anteriormente, particularmente con referencia al nivel del producto de expresión del gen ACAN en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto reticular.

Preferiblemente, el fibroblasto dérmico se identifica como un fibroblasto reticular o un fibroblasto FJDH cuando:

1)

(i) el nivel del producto de expresión del gen UCP2 es al menos 5 veces inferior, y en particular al menos 5,5, al menos 5,8 veces o al menos 5,83 veces inferior a un nivel de control tal como se definió anteriormente, particularmente con referencia al nivel del producto de expresión del gen UCP2 en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto papilar,

(ii) el nivel del producto de expresión del gen ACAN es al menos 3 veces superior, y particularmente al menos 3,2 veces superior a un nivel de control tal como se definió anteriormente, particularmente con referencia al nivel del producto de expresión del gen ACAN en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto papilar,

(iii) el nivel del producto de expresión del gen FGF9 es al menos 4 veces superior, y particularmente al menos 4,2 veces o al menos 4,28 veces superior a un nivel de control tal como se definió anteriormente, particularmente con referencia al nivel del producto de expresión del gen FGF9 en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto papilar, y/o,

(iv) el nivel del producto de expresión del gen COL11A1 es al menos 25 veces superior, y en particular al menos 28 veces, al menos 28,5 veces o al menos 28,6 veces superior a un nivel de control tal como se definió anteriormente, particularmente con referencia al nivel del producto de expresión del gen COL11A1 en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto papilar.

Preferiblemente, el fibroblasto dérmico se identifica como un fibroblasto FJDH cuando además:

2) el nivel del producto de expresión del gen KLF9 es al menos 2 veces superior, y particularmente al menos 2,06 veces superior a un nivel de control tal como se definió anteriormente, particularmente con referencia al nivel del producto de expresión del gen KLF9 en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto reticular.

Preferiblemente, el fibroblasto dérmico se identifica como un fibroblasto reticular cuando además:

2) el nivel del producto de expresión del gen KLF9 es al menos 2 veces inferior, y particularmente al menos 2,06 veces inferior a un nivel de control tal como se definió anteriormente, particularmente con referencia al nivel del producto de expresión del gen KLF9 en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto FJDH.

También se describe un kit para identificar un fibroblasto dérmico como un fibroblasto papilar, un fibroblasto reticular o un fibroblasto de la unión dérmica-hipodérmica (FJDH), comprendiendo dicho kit:

- al menos un medio de medición seleccionado del grupo que consiste en un medio para medir el nivel de un producto de expresión del gen UCP2, un medio para medir el nivel de un producto de expresión del gen FGF9, un medio para medir el nivel de un producto de expresión del gen COL11A1 y un medio para medir el nivel de un producto de expresión del gen ACAN,

- al menos un medio para medir el nivel de un producto de expresión del gen KLF9, y

- un control o varios controles a partir de los que se puede obtener el nivel de control.

En particular, el kit también puede comprender también anticuerpos que reconocen proteínas codificadas por dichos genes en una muestra biológica tal como se definió anteriormente, como componentes separados. El kit puede incluir cebadores y/o sondas que se hibridan específicamente con ARNm codificado por dichos genes, como componentes separados.

El kit también puede comprender componentes opcionales adicionales para implementar el procedimiento de identificación según la invención. Dichos componentes opcionales incluyen, por ejemplo, recipientes, mezcladores, tampones, instrucciones para implementar el procedimiento, marcadores o soportes.

También se describe una micromatriz de ADN para identificar un fibroblasto dérmico como un fibroblasto papilar, un fibroblasto reticular o un fibroblasto de unión dérmica-hipodérmica (FJDH), consistiendo dicha micromatriz en :

- al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en una sonda que detecta un producto de expresión del gen UCP2, una sonda que detecta un producto de expresión del gen FGF9, una sonda que detecta un producto de expresión del gen COL11A1 y una sonda que detecta un producto de expresión del gen ACAN

y

- al menos una sonda que detecta un producto de expresión del gen KLF9.

La micromatriz de ADN no comprende ninguna sonda que detecte productos de expresión de genes distintos de UCP2, FGF9, COL11A1, ACAN y KLF9.

En esta descripción, "micromatriz de ADN" se refiere a una disposición ordenada de al menos dos sondas sobre un sustrato. Preferiblemente, la micromatriz de ADN también comprende una sonda de control o estándar.

En esta descripción, "sonda" significa un oligonucleótido o polinucleótido, ARN o ADN, que existe de forma natural como en un producto de digestión purificado de una enzima de restricción o que se produce sintéticamente y que puede hibridarse específicamente con un polinucleótido que porta una secuencia complementaria a la secuencia de la sonda. La sonda puede ser monocatenaria o bicatenaria. Preferiblemente, la sonda comprende o consiste en 10 a 100 nucleótidos, preferiblemente de 15 a 50 nucleótidos o de 15 a 25 nucleótidos.

#### *Dermis y equivalentes de piel.*

Los inventores han identificado por primera vez una subpoblación de fibroblastos dérmicos: los fibroblastos de la unión dérmico-hipodérmica.

Por lo tanto, el uso de estos nuevos fibroblastos en equivalentes dérmicos puede imitar una dermis normal con mayor precisión.

Por lo tanto, otro objetivo descrito en el presente documento es una dermis *in vitro* que comprende una subpoblación de fibroblastos de la unión dérmica-hipodérmica (FJDH), tal como se define en la sección "*Fibroblastos*" anterior, para la cual:

1)

(i) el nivel del producto de expresión del gen UCP2 disminuye en comparación con un nivel de control,

(ii) el nivel del producto de expresión del gen ACAN aumenta en comparación con un nivel de control,

(iii) el nivel del producto de expresión del gen FGF9 aumenta en comparación con un nivel de control, y/o

(iv) el nivel del producto de expresión del gen COL11A1 aumenta en comparación con un nivel de control, y

2) el nivel del producto de expresión del gen KLF9 aumenta en comparación con un nivel de control.

El equivalente dérmico también comprende una subpoblación de fibroblastos papilares y/o una subpoblación de fibroblastos reticulares, tal como se define en la sección "*Fibroblastos*" anterior.

Preferiblemente, el equivalente dérmico también comprende colágeno.

El colágeno en el equivalente dérmico puede ser cualquier tipo de colágeno y de cualquier origen. Preferiblemente, el colágeno se selecciona entre los colágenos fibrilares de tipo I, III o V. Preferiblemente, el colágeno es de tipo I. Preferiblemente, el colágeno es de origen animal, en particular de origen bovino. De manera especialmente preferida,

el colágeno es colágeno bovino de tipo I. Alternativamente, el colágeno puede ser una mezcla de diferentes tipos de colágeno, en cualquier proporción y/o de diversos orígenes.

5 Los fibroblastos en el equivalente dérmico pueden ser de cualquier origen, aunque son preferiblemente fibroblastos humanos.

10 Los fibroblastos presentes en el equivalente dérmico proceden preferiblemente de un cultivo de fibroblastos, parte del cual se utilizó para implementar el procedimiento de identificación según la invención, permitiendo así la identificación del cultivo completo como un cultivo que es un cultivo de fibroblastos papilares, reticulares o FJDH.

15 El equivalente dérmico también puede comprender cualquier otro componente que pueda estar constitutivamente presente en la piel, tal como células endoteliales, macrófagos, monocitos, precursores de macrófagos, precursores de células dendríticas o células nerviosas.

20 La presente invención también se refiere a un procedimiento de preparación de un equivalente dérmico, tal como se define anteriormente, que comprende una etapa inicial de identificación de fibroblastos dérmicos como fibroblastos FJDH, que comprende las siguientes etapas:

A) proporcionar un cultivo homogéneo de fibroblastos dérmicos,

B) tomar muestras de una parte del cultivo de fibroblastos dérmicos proporcionado en la etapa A),

25 C) identificar la parte del cultivo de fibroblastos dérmicos muestreado en la etapa B) como un cultivo de fibroblastos FJDH utilizando el procedimiento de identificación tal como se define en la sección "Procedimiento de identificación" definida anteriormente, y

D) usar la parte del cultivo de fibroblastos dérmicos no muestreada en la etapa B) para preparar un equivalente dérmico.

30 Se puede utilizar cualquier técnica bien conocida por el experto para preparar el equivalente dérmico en la etapa D).

35 La preparación del equivalente dérmico en la etapa D) puede incluir de este modo una etapa para preparar una red que contiene colágeno y una suspensión celular de fibroblastos FJDH, y posiblemente una suspensión celular de fibroblastos papilares y/o reticulares.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el colágeno utilizado puede ser cualquier tipo de colágeno, de cualquier origen, ya sea solo o mezclado.

40 Preferiblemente, la red comprende fibroblastos en una concentración de  $1,1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$  células/ml, preferiblemente en una concentración de  $2 \times 10^5$  a  $2 \times 10^6$  células/ml.

La red se puede preparar mediante cualquier técnica bien conocida por los expertos en la técnica.

45 En particular, se puede preparar y depositar sobre un soporte una solución que comprende colágeno y fibroblastos dérmicos.

Preferiblemente, la solución se incuba para que el colágeno pueda gelificarse, por ejemplo, durante 10 a 30 minutos, y, a continuación, se mantiene en incubación para permitir la contracción de la red.

50 Preferiblemente, la red se mantiene de este modo en incubación durante 1 a 7 días adicionales, e incluso más preferiblemente durante 3 o 4 días.

Dado que el contenido dérmico influye en el compartimento epidérmico, el equivalente dérmico puede actuar como soporte para la formación de un equivalente de piel.

Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere a un equivalente de piel *in vitro* que comprende un equivalente dérmico tal como se define anteriormente.

55 El equivalente de piel comprende, encima del equivalente dérmico, un equivalente epidérmico que comprende al menos queratinocitos.

60 Los queratinocitos pueden obtenerse de cualquier fuente, pero son preferiblemente queratinocitos humanos. Pueden prepararse mediante cualquier procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica. Por tanto, los queratinocitos pueden prepararse cultivando epidermis disociada de muestras de piel normal, o cultivando queratinocitos obtenidos de la vaina de un folículo piloso.

Preferiblemente, los queratinocitos son queratinocitos de piel humana normal.

Aún más preferiblemente, los queratinocitos se preparan a partir de epidermis humana disociada obtenida de una muestra de piel normal recogida según el procedimiento descrito en Régnier et al., *Frontier of Matrix Biology*, vol. 9, 4-35 (Karger, Basilea, 1981).

5 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.

Además, el equivalente epidérmico puede comprender ventajosamente melanocitos y/o células de Langerhans y/o precursores de células de Langerhans.

10 Los melanocitos se pueden aislar de cualquier órgano que los contenga, tal como piel normal o folículos pilosos. Preferiblemente, los melanocitos se aíslan de la piel normal. Se puede utilizar cualquier procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica, tal como el procedimiento descrito en Olsson et al. (1994) *Acta. Derm. Venereol.* 74:226-268.

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

20 También se describe un procedimiento para preparar un equivalente de piel tal como se define anteriormente, que incluye una etapa de preparación de equivalente dérmico usando el proceso de preparación de equivalente dérmico, tal como se define anteriormente.

25 Preferiblemente, el proceso de preparación del equivalente dérmico comprende, después de la etapa de preparación del equivalente dérmico, una etapa que implica la reconstitución de un equivalente epidérmico, que comprende al menos queratinocitos, sobre el equivalente dérmico.

30 Esta etapa de reconstitución epidérmica 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 el descrito en Asselineau et al. (1985) *Exp. Cell. Res.* 159:536-539, en Asselineau et al. (1987), *Models in dermatol.*, col III, Ed. Lowe y Mailbach, 1-7 o en Asselineau et al. (1984) *H. J. Dermatol.* 111 Suplemento 27:219-22.

35 Esta etapa de reconstitución puede estar precedida ventajosamente por una etapa de unión, realizada en una placa de cultivo, del equivalente dérmico preparado, por ejemplo usando una solución de unión que consiste en medio MEM 1,76X, FCS, NaOH 0,1 N y Hepes MEM 25 mM. 10% FCS.

Preferiblemente, la etapa de reconstitución se implementa sembrando queratinocitos sobre el equivalente dérmico, preferiblemente en un asa de siembra.

40 Después de sembrar queratinocitos sobre el equivalente dérmico, el cultivo se puede mantener ventajosamente sumergido en un medio de nutrientes, que puede ser, por ejemplo, el medio descrito por Rheinwaid y Green (1975) *Cell* 6:317-330, medio que permite la proliferación de queratinocitos.

45 Después de un período de incubación, preferiblemente de 3 a 15 días, incluso más preferiblemente de 7 a 9 días, el equivalente de piel se mantiene preferiblemente en la interfaz aire/líquido, por ejemplo depositándolo sobre una malla metálica. Este líquido consiste entonces preferiblemente en el mismo medio de nutrientes como anteriormente.

50 A continuación, se continúa la incubación, preferiblemente hasta que se obtiene un equivalente de piel que muestra las características de una piel, es decir, un equivalente dérmico cubierto por un equivalente epidérmico que muestra los cuatro tipos estándar de capas celulares, es decir, el estrato basal, el estrato suprabasal, el estrato granuloso y el estrato córneo.

55 De esta manera, la incubación se continúa preferiblemente durante una duración de entre 5 y 30 días, incluso más preferiblemente entre 7 y 10 días.

#### Usos

60 También se describe el uso de un equivalente dérmico, tal como se define en la sección "*Equivalente dérmico y de piel*" anterior, o de un equivalente de piel tal como se define en la sección "*Equivalente dérmico y de piel*" anterior, para estudiar las funciones de la piel.

65 También se describe un procedimiento de cribado de un compuesto que muestra una actividad cosmética después de la aplicación tópica sobre la piel, particularmente en el campo del antienvjecimiento, tal como para el tratamiento de arrugas y líneas de expresión 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 proceso de cribado la aplicación de

un compuesto candidato sobre el equivalente dérmico descrito en el presente documento, o sobre el equivalente de piel descrito en el presente documento.

5 En toda la solicitud, el término "que comprende un" o "que incluye un" significa "que comprende al menos uno" o "que incluye al menos uno", en otras palabras, "que comprende uno o más" o "que incluye uno o más", a menos que se especifique lo contrario.

10 A lo largo de la descripción anterior, a menos que se especifique lo contrario, el término "entre x e y" o "que varía de x a y" se refiere a un intervalo inclusivo, es decir, los valores x e y están incluidos en el intervalo.

Esta invención se ilustrará con más detalle mediante el ejemplo siguiente.

**Ejemplo**

15 El siguiente ejemplo muestra el aislamiento de la nueva subpoblación de fibroblastos de la unión dérmica-hipodérmica por parte de los inventores y la identificación de firmas moleculares para subpoblaciones de fibroblastos existentes en la dermis.

Material y procedimientos

20 *Preparación de células*

Se aislaron fibroblastos papilares (Fp), fibroblastos reticulares (Fr) y fibroblastos de la unión dérmica-hipodérmica (FJDH) de piel humana no desgrasada. Estas muestras se recogen después de la reducción mamaria por razones estéticas. Se incluyeron seis mujeres.

Los FJDH se aíslan de las trabéculas conjuntivas presentes en la unión dérmico-hipodérmica. Se toman muestras de estas últimas con una pinza y unas tijeras.

30 El aislamiento de Fr se realiza en la parte del tejido desprovista de su unión dérmica-hipodérmica. A continuación se dermatoma el tejido a 700 µm. Sólo se conserva la parte inferior del tejido.

El aislamiento de Fp se realiza en tejido dermatomado a 300 µm y, a continuación, se desepidermiza después de la acción con dispasa (Roche - 2,4 unidades/ml) durante 16 horas a 4 °C.

35 Después de la dilaceración, los fragmentos de dermis se digieren bajo la acción de colagenasa de tipo II al 0,2 % (Gibco), a 37 °C.

40 A continuación, se amplifican las células en medio MEM: suero fetal de ternera al 10 % suplementado con glutamina, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, penicilina, estreptomycin y fungizona, en atmósfera húmeda, a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

*Análisis de transcriptoma y RT-qPCR.*

45 Después de la expansión de las células (la población se duplicó entre 7 y 10 veces), los ARNm se extraen en una columna QIAgen siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

Las muestras se dividieron en 2: una parte se reservó para el análisis del transcriptoma y la otra parte se utilizó para validar biomarcadores mediante PCR.

50 El análisis del transcriptoma se realizó utilizando el microarray tipo Affymetrix GeneChip HG-U133 Plus 2.0. Los conjuntos de sondas considerados expresados diferencialmente tuvieron un factor multiplicador > 2 para un valor p no ajustado  $\alpha$  0,05.

55 Los cebadores utilizados para validaciones mediante RT-qPCR están disponibles comercialmente en Qiagen (QIAgen - Quantitech Primer Assay) y se enumeran en la tabla 1 a continuación.

**Tabla 1** Cebadores utilizados

| Gen     | Referencia QIAgen del cebador |
|---------|-------------------------------|
| ACAN    | QT00001365                    |
| COL11A1 | QT00088711                    |
| FGF9    | QT00000091                    |
| UCP2    | QT00014140                    |
| GAPDH   | QT01192646                    |

*Pieles reconstruidas*

5 Las pieles reconstruidas se prepararon usando el protocolo descrito en Asselineau et al. (1985) Exp. Cell. Res. 159:536-539.

10 De forma resumida, se incluyeron 10<sup>6</sup> fibroblastos de la unión dérmico-hipodérmica (FJDH) en una solución de colágeno bovino tipo I (Symatèse). Después de 4 días de organización y contracción de la red, se siembran 5 x 10<sup>4</sup> queratinocitos en la superficie de la red. El cultivo se mantiene en inmersión durante 1 semana en un medio MEM, suero fetal de ternera al 10 %, EGF (10 ng/ml), hidrocortisona (0,4 µg/ml) y toxina del cólera (0,1 nM). La estratificación completa de la epidermis se obtiene una semana después de la emersión.

15 Durante todo el proceso de reconstrucción, el cultivo continúa en una incubadora saturada de humedad que contiene 5 % de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Resultados

20 De este modo se aislaron y caracterizaron tres subpoblaciones de fibroblastos dentro de la dermis: fibroblastos papilares (cerca de la epidermis), fibroblastos reticulares (implantados más profundamente en la piel) y fibroblastos de la unión dérmica-hipodérmica (nueva subpoblación de células aislada de la trabécula conjuntiva que la dermis emite hacia la hipodermis).

25 Se aislaron y cultivaron células de estas 3 subpoblaciones a partir de cirugía plástica mamaria recogidas en 6 individuos.

Se realizaron análisis de transcriptoma de estas 3 subpoblaciones y se demostró una expresión diferencial de 5 genes específicos entre estas 3 subpoblaciones con validación mediante análisis RT-qPCR.

30 Los resultados del análisis RT-qPCR se resumen en la tabla 2 a continuación .

**Tabla 2:** Análisis mediante RT-qPCR de las 3 subpoblaciones de fibroblastos dérmicos

|   | Fp vs. Fr (factor multiplicador)   | Conclusión                               |
|---|------------------------------------|--|
|   | ARN                                |  |
| ACAN  | -3,2                               | Regulado en dirección ascendente en Fr   |
| COL11A1   | -28,6                              |  |
| FGF9  | -4,28                              |  |
| UCP2  | 5,83                               | Regulado en dirección ascendente en Fp   |
|   | FR vs. FJDH (factor multiplicador) | Conclusión                               |
|   | ARN                                |  |
| KLF9  | -2,06                              | Regulado en dirección ascendente en FJDH |
| Fp: fibroblasto papilar, Fr: fibroblasto reticular, FJDH: fibroblastos de unión dermo-hipodérmica |                                    |  |

35 De este modo, los inventores han podido demostrar las siguientes firmas moleculares para las 3 subpoblaciones de fibroblastos identificadas en la dermis:

|                              | UCP2                          | COL11A1                      | ACAN                         | FGF9                         | KLF9                         |
|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>Fibroblasto papilar</b>   | Positivo = <b> aumentado</b>  | Débil = <b> disminuido</b>   | Débil = <b> disminuido</b>   | Débil = <b> disminuido</b>   | -                            |
| <b>Fibroblasto reticular</b> | Negativo = <b> disminuido</b> | Positivo = <b> aumentado</b> | Positivo = <b> aumentado</b> | Positivo = <b> aumentado</b> | Débil = <b> disminuido</b>   |
| <b>Fibroblasto FJDH</b>      | Negativo = <b> disminuido</b> | Positivo = <b> aumentado</b> | Positivo = <b> aumentado</b> | Positivo = <b> aumentado</b> | Positivo = <b> aumentado</b> |

40 A continuación, se obtuvo tal como se indicó anteriormente una piel reconstituida que comprendía estas 3 subpoblaciones.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* de identificación de un fibroblasto dérmico como un fibroblasto papilar, un fibroblasto reticular o un fibroblasto de la unión dérmica-hipodérmica (FJDH), en el que el fibroblasto de la unión dérmica-hipodérmica (FJDH) es un fibroblasto de la zona situada en el mismo nivel que la trabécula conjuntiva emitida por la dermis hacia la hipodermis, que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar una muestra biológica que comprende al menos un fibroblasto dérmico,  
 b1) medir el nivel de un producto de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes UCP2 y FGF9 y opcionalmente los genes COL11A1 y ACAN, y opcionalmente el nivel de un producto de expresión del gen KLF9, y

c1) basándose en el nivel o niveles medidos en la etapa b1), identificar el fibroblasto dérmico como un fibroblasto papilar cuando:

- (i) el nivel del producto de expresión del gen UCP2 es superior a un nivel de control, y/o
  - (ii) el nivel del producto de expresión del gen FGF9 es inferior a un nivel de control,
- siendo los niveles de control en (i) y (ii) los niveles del producto de expresión de los genes UCP2 y FGF9, respectivamente, en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto reticular o fibroblasto FJDH;

o  
 b2) medir el nivel de un producto de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes UCP2, FGF9, COL11A y ACAN y el nivel de un producto de expresión del gen KLF9, y

c2) basándose en el nivel o niveles medidos en la etapa b2), identificar el fibroblasto dérmico como un fibroblasto reticular cuando:

- 1)
  - (i) el nivel del producto de expresión del gen UCP2 es inferior a un nivel de control,
  - (ii) el nivel del producto de expresión del gen ACAN es superior a un nivel de control,
  - (iii) el nivel del producto de expresión del gen FGF9 es superior a un nivel de control, y/o
  - (iv) el nivel del producto de expresión del gen COL11A1 es superior a un nivel de control,

y  
 2) el nivel del producto de expresión del gen KLF9 es inferior a un nivel de control, siendo los niveles de control en 1(i), 1(ii), 1(iii) y 1(iv) los niveles del producto de expresión de los genes UCP2, ACAN, FGF9 y COL11A1, respectivamente, en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto papilar y siendo el nivel de control de 2) el nivel del producto de expresión del gen KLF9 en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto FJDH;

o  
 b3) medir el nivel de un producto de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes UCP2, FGF9, COL11A y ACAN y el nivel de un producto de expresión del gen KLF9, y

c3) basándose en el nivel o niveles medidos en la etapa b3), identificar el fibroblasto dérmico como un fibroblasto de la unión dérmica-hipodérmica (FJDH) cuando:

- 1)
  - (i) el nivel del producto de expresión del gen UCP2 es inferior a un nivel de control,
  - (ii) el nivel del producto de expresión del gen ACAN es superior a un nivel de control,
  - (iii) el nivel del producto de expresión del gen FGF9 es superior a un nivel de control, y/o
  - (iv) el nivel del producto de expresión del gen COL11A1 es superior a un nivel de control,

y  
 2) el nivel del producto de expresión del gen KLF9 es superior a un nivel de control, siendo los niveles de control en 1(i), 1(ii), 1(iii) y 1(iv) los niveles del producto de expresión de los genes UCP2, ACAN, FGF9 y COL11A1, respectivamente, en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto papilar y siendo el nivel de control de 2) el nivel del producto de expresión del gen KLF9 en un fibroblasto dérmico conocido como fibroblasto reticular.

2. Procedimiento de preparación de un equivalente dérmico que comprende una etapa inicial de identificar fibroblastos dérmicos como fibroblastos FJDH, que comprende las siguientes etapas:

- A) proporcionar un cultivo homogéneo de fibroblastos dérmicos,
- B) tomar muestras de una parte del cultivo de fibroblastos dérmicos proporcionado en la etapa A),
- C) identificar la parte del cultivo de fibroblastos dérmicos muestreado en la etapa B) como un cultivo de fibroblastos FJDH utilizando el procedimiento de identificación tal como se define en la reivindicación 1, y
- D) usar la parte del cultivo de fibroblastos dérmicos no muestreada en la etapa B) para preparar un equivalente dérmico.