

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 863 375**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2018** **E 18020337 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2021** **EP 3430902**

54 Título: **Dispositivo para mantener la supervivencia de un explante**

30 Prioridad:

20.07.2017 FR 1770780

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.10.2021

73 Titular/es:

**CENTRE DE RECHERCHES BIOLOGIQUES ET
D'EXPÉRIMENTATIONS CUTANÉES (100.0%)
1 chemin de Saulxier
91160 Longjumeau, FR**

72 Inventor/es:

**LATI, ELIAN y
PENO-MAZZARINO, LAURENT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 863 375 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

Dispositivo para mantener la supervivencia de un explante

El campo técnico de la presente invención es el del mantenimiento en supervivencia de un explante de piel, particularmente de piel humana.

Para asegurar el mantenimiento en supervivencia de un explante, es bien conocido depositar éste sobre una rejilla de metal sumergida en un medio de cultivo de manera en que la dermis esté en contacto con él y que la epidermis se mantenga emergida. El medio de cultivo debe por supuesto contener todos los elementos nutritivos necesarios para el mantenimiento de esta supervivencia.

El dispositivo se conserva en una incubadora a una temperatura constante de 37°C y cuya atmósfera está controlada a 5% en CO₂. Este CO₂ permite controlar el pH del medio de cultivo que, para reproducir el de la sangre, debe ser mantenido entre 7,2 y 7,4. La atmósfera se satura de agua ($\pm$ 98%) para limitar la evaporación del medio de cultivo. Este dispositivo permite mantener en vida el explante durante una duración de alrededor de 12 días. Los productos que deseamos probar, los productos cosméticos por ejemplo, son aplicados en tópico según la dosis definida por las pruebas previstas con el fin de evaluar sus efectos sobre el explante.

Sin embargo, esta manera de hacer conlleva ciertos límites que influyen sobre los resultados de las pruebas realizadas de productos cosméticos que son aplicados sobre esos explantes.

Primeramente, el explante en general no está sometido a ninguna tensión y ésta no puede ser controlada. En efecto, la piel de un donante está en estado de pre-tensión participando así a las propiedades visco-elásticas de la piel. Podemos observar fácilmente que un explante de talla pequeña preparado a partir de una muestra más grande de piel se retracta sobre sí mismo. Este efecto testimonia la disminución de la tensión del explante y modifica sus propiedades visco-elásticas. De ello resulta que los resultados de las pruebas de productos reafirmantes están sesgados en relación con pruebas en condiciones reales.

Otro límite reside en el hecho que el explante no está dispuesto en un ambiente real. En efecto, el explante está colocado en una incubadora en las condiciones expuestas anteriormente. Sin embargo, esas condiciones son necesarias para el mantenimiento en vida de la dermis irrigada por la sangre, y en condiciones normales, la epidermis está en contacto con el aire ambiente y está sujeta a las variaciones de temperatura y de higrometría.

Otro límite reside en el empobrecimiento del medio nutritivo en elementos esenciales a la supervivencia del explante. El medio de cultivo se reemplaza regularmente, pero este reemplazo puntual presenta el inconveniente de dejar subsistir los desechos producidos por el explante en el curso de su supervivencia, ya que las células secretan marcadores de degradación que pueden ser captados por otras células, provocando así su apoptosis, proceso a través del cual las células activan su autodestrucción en respuesta a una señal.

El documento O.A. TROWEL del 1/01/1959 publicado en la Revue Experimental Cell Research, Elsevier, describe un método y compuestos para la cultura de órganos de rata. Las culturas se colocan en depósitos que contienen diversos medios nutritivos. Cada depósito está cerrado y aislado. No hay circulación de fluido dispuesto para renovar el medio nutritivo. Este documento propone efectivamente renovar el medio nutritivo, pero de manera manual y por pequeñas cantidades y no en una instalación de forma continua.

Resulta entonces necesario disponer explantes reproduciendo lo más posible las condiciones normales de exposición de la piel.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo de mantenimiento en supervivencia de la piel y superando los límites evocados anteriormente y asegurando la pre-tensión de la piel, la exposición de la epidermis a una atmósfera normal y la renovación del medio de cultivo.

La invención tiene entonces por objetivo un dispositivo de mantenimiento en supervivencia de un explante de piel, caracterizado por estar constituido de un primer depósito de recepción del explante y conteniendo una primera fracción de

un medio de cultivo, un segundo depósito que contiene una segunda fracción de dicho medio de cultivo y un circuito de conexión que conecta el primer depósito al segundo depósito para asegurar con la ayuda de una bomba una circulación continua del medio de cultivo entre los dos depósitos, el primer depósito estando constituido por un cuerpo tubular cerrado por el explante y el débito de la bomba estando comprendido entre 0,01 y 10 ml/mn, de manera que la presión provocada por la bomba corresponda a la presión de la puesta en tensión natural de la piel.

Según una característica del dispositivo según la invención, el primer depósito está cerrado de manera hermética.

Según otra característica del dispositivo según la invención, el circuito de relación está constituido por dos tubos conectando el primer depósito al segundo depósito, la bomba susodicha estando conectada a uno de los tubos.

Según otra característica del dispositivo según la invención, la bomba inyecta o aspira el contenido del segundo depósito en el primer depósito.

La bomba es una bomba peristáltica.

Ventajosamente, una rejilla de metal, en materia plástica o en material biocompatible se interpone entre el explante y la primera fracción del medio nutritivo.

Según otra característica del dispositivo según la invención, la segunda fracción del medio nutritivo está mantenida a una temperatura de 37°C y a 5% de CO₂ bajo atmósfera saturada en vapor de agua.

Una primera ventaja del dispositivo según la invención reside en la conservación de un explante de piel en condiciones casi idénticas a aquellas a las que la piel está sometida en condiciones reales.

Otra ventaja del dispositivo según la invención reside en la eliminación de los desechos producidos por el explante durante su duración de vida.

Otra ventaja aún del dispositivo según la invención reside en la conducción de pruebas de productos cosméticos en las condiciones normales de aplicación.

La superficie de la piel y más precisamente el stratum corneum no está hiperhidratado como puede estarlo en una incubadora en atmósfera saturada en agua. El stratum corneum está mantenido fuera de la incubadora con un estado de hidratación normal.

Otras características, detalles y ventajas de la invención serán mejor comprendidas a la lectura del complemento de descripción que sigue de los modos de realización dados a manera de ejemplo en relación con dibujos según los cuales:

- La figura 1 es una representación esquemática del dispositivo según la invención, y

- La figura 2 es un corte de un ejemplo de realización del depósito de recepción del explante.

Como se indicó anteriormente, se trata de elaborar un dispositivo de mantenimiento en supervivencia de explante de piel, humana por ejemplo, asegurando su viabilidad durante una duración mínima por ejemplo del orden de 12 días reproduciendo las condiciones de vida real de la piel de un paciente. Se trata entonces de responder a las necesidades de los fabricantes de productos cosméticos por ejemplo fiabilizando las pruebas realizadas y permitiendo su repetibilidad.

La invención va ahora a ser descrita con más detalles.

En la figura 1, hemos representado el dispositivo 1 según la invención permitiendo el mantenimiento en supervivencia de un explante 2 de la piel. Este dispositivo está constituido de un primer depósito 3 de recepción del explante 2 que contiene una primera fracción 4 del medio de cultivo, un segundo depósito 5 que contiene una segunda fracción 6 de dicho medio de cultivo. Estos dos depósitos están conectados con un circuito de conexión 7 que permite su comunicación para asegurar con la ayuda de una bomba 8 una circulación de forma continua del medio de cultivo entre esos dos depósitos.

Naturalmente, el depósito 3 está cerrado de manera hermética, el depósito 3 por el explante 2 mismo mientras que el depósito 5 está dispuesto en el área confinada 11. El depósito 3 constituye un medio incubador para el explante y el depósito 5 un medio de renovación de los elementos nutritivos del conjunto del dispositivo. Huelga decir que el volumen de

los dos depósitos 3 y 5 no es representativo en la figura. A modo indicativo, la fracción 4 contenida en el depósito 3 puede ser del orden de algunos mililitros, por ejemplo de 3 a 5 ml, mientras que la fracción 6 contenida en el depósito 5 puede ser de varios mililitros, por ejemplo de 5 a 50 mililitros. El depósito 5 en la incubadora no está cerrado de forma hermética. El medio de cultivo debe poder oxigenarse disolviendo el O₂ del aire ambiente y regular el pH disolviendo el CO₂ liberado por la incubadora.

El circuito de conexión 7 está constituido de dos tubos 9 y 10 conectando el primer depósito 3 al segundo depósito 5. En la figura, vemos que la bomba 8 está conectada al tubo 9. Durante su funcionamiento, la bomba 8 inyecta el contenido del segundo depósito 5 en el primer depósito 3 por el tubo 9. Las flechas que figuran en la figura materializan el sentido de la circulación del medio nutritivo. El circuito 7 estando en anillo cerrado y el depósito 3 siendo hermético, resulta que la fracción 4 del medio nutritivo presente en ese depósito es extraída y dirigida de forma continua por el tubo 10 hacia el depósito 5. Así, la bomba 8 asegura la renovación continua y constante de la fracción 4 del medio nutritivo eliminando una parte de los desechos producidos por el explante.

Huelga decir que la bomba 8 puede ser utilizada en aspiración y la circulación del fluido se efectúa en sentido inverso al indicado por las flechas de la figura.

Como ya fue expuesto anteriormente, el dispositivo según el invento reproduce las condiciones de tensión de la piel al nivel del explante 2. Esta tensión es función del débito de la bomba 8. De esta manera, con un débito comprendido entre 0,01 y 10 ml/mn, reproducimos lo más cerca posible las condiciones de tensión de la piel en condiciones reales y se evita toda deformación del explante. Este débito presenta la ventaja de no ejercer una presión sobre la piel que podría hacerla hincharse bombeándose.

Ventajosamente, la bomba 8 es de tipo peristáltico.

El dispositivo según la invención permite eliminar una gran parte de los desechos producidos por el explante 2 diluyéndoles en la fracción contenida en el depósito 5. Además,

la fracción 6 del medio nutritivo contendida en el depósito 5 dispuesta en el área 11 está sometida a una atmósfera que reproduce las condiciones normales en las que se encuentra la piel, a saber una temperatura de 37°C, 5% de CO₂ y saturación en vapor de agua. En consecuencia, el explante 2 está sometido a esas mismas condiciones.

Huelga decir que la fracción 6 del medio nutritivo está controlado con el objetivo de evitar una acumulación excesiva de desechos. Es por ello que la fracción 6 es renovada con una frecuencia definida dejando al explante de piel modificar según sus necesidades el medio nutritivo y evitando la acumulación de desechos que pueden ser tóxicos. La renovación de esta fracción 6 no presenta ninguna dificultad porque basta intervenir al nivel del área 11 sin efecto prolongado sobre la fracción 4 del depósito 3.

Señalaremos que la circulación continua del medio nutritivo de cultivo permite la oxigenación del explante de piel 2, el aporte en nutrientes y participa a la regulación térmica. Por último, las células muertas no suponen ningún problema.

En la figura 2 hemos representado un ejemplo de realización del primer depósito 3 de recepción de la muestra que permite la puesta en tensión del explante.

Podemos ver que ese depósito 3 está constituido por un cuerpo tubular cerrado por el explante 2 y que una rejilla 12 de metal en materia plástica o en material biocompatible está interpuesta entre el explante 2 y la primera fracción 4 del medio nutritivo. La dermis está así en contacto permanente con el medio nutritivo. El explante 2 está pretensado manualmente aplicándolo sobre el borde libre del depósito y estando replegado sobre la pared lateral donde está mantenido con la ayuda de un empaque anular 13.

En esta configuración, el explante 2 presenta una superficie perfectamente plana de recepción del producto a probar y presenta las cualidades requeridas en firmeza y en elasticidad.

Podemos notar que la invención permite la aplicación de productos cosméticos según la posología definida por el cliente

para evaluar sus efectos sobre el explante, cuyas características son las del medio real. Los explantes pueden ser preparados en función de las necesidades del estudio: Tamaño, fototipo, edad, sexo o incluso la estructura conservada (epidermis y dermis o epidermis, dermis e hipodermis) reproduciendo las condiciones del medio real.

El control de los parámetros cutométricos del explante por un cutómetro no presenta ninguna dificultad debido a la accesibilidad del explante.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de mantenimiento en supervivencia (1) de un explante de piel (2), caracterizado porque está constituido por un primer depósito (3) de recepción del explante (2) que contiene una primera fracción (4) de un medio de cultivo, un segundo depósito (5) que contiene una segunda fracción (6) de dicho medio de cultivo, y un circuito de conexión (7) que conecta el primer depósito (3) al segundo depósito (5) para permitir con la ayuda de una bomba (8) una circulación de forma continua del medio de cultura entre los dos depósitos, el primer depósito (3) está constituido por un cuerpo tubular cerrado por el explante (2) y el débito de la bomba (8) estando comprendido entre 0,01 y 10 ml/mn, de manera que la presión engendrada por la bomba (8) corresponda a la presión de puesta en tensión natural de la piel.

2. Dispositivo de mantenimiento en supervivencia (1) según la reivindicación 1, caracterizado porque el primer depósito (3) está cerrado de manera hermética.

3. Dispositivo de mantenimiento en supervivencia (1) según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el circuito de conexión (7) está constituido por dos tubos (9,10) que conecta el primer depósito (3) al segundo depósito (5), dicha bomba (8) estando conectada a uno de los dos tubos (9).

4. Dispositivo de mantenimiento en supervivencia (1) según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la bomba (8) inyecta o aspira el contenido del segundo depósito (5) en el primer depósito (3).

5. Dispositivo de mantenimiento en supervivencia (1) según la reivindicación 4, caracterizado porque la bomba (8) es una bomba peristáltica.

6. Dispositivo de mantenimiento en supervivencia (1) según la reivindicación 1, caracterizado porque una rejilla (12) de metal, en materia plástica o en un material biocompatible, está interpuesta entre el explante (2) y la primera fracción del medio nutritivo.

7. Dispositivo de mantenimiento en supervivencia (1) según la reivindicación 1, caracterizado porque la segunda

fracción (6) del medio nutritivo está mantenida a una temperatura de 37°C y a 5% de CO₂ bajo atmósfera saturada en vapor de agua.