

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale

WO 2019/170281 A1

(43) Date de la publication internationale
12 septembre 2019 (12.09.2019)

WIPO | PCT

- (51) Classification internationale des brevets :
C12N 5/071 (2010.01) *A01N 1/02* (2006.01)
A61K 35/36 (2015.01) *G01N 33/50* (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2019/000061
- (22) Date de dépôt international :
03 mars 2019 (03.03.2019)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
1870232 05 mars 2018 (05.03.2018) FR
- (71) Déposant : GENOSKIN [FR/FR] ; Centre Pierre Potier, 1
Place Pierre Potier, 31000 Toulouse (FR).
- (72) Inventeurs : DESCARGUES, Pascal ; 29 Otis street,
F603, Cambridge, MA 02141 (US). PAGÈS, Emeline ; 35
rue Nelly Roussel, 31320 Castanet Tolosan (FR). JARDET,
Claire ; 1 impasse des Corps Francs, 31270 Cugnaux (FR).
- (74) Mandataire : BARDOT, Willy ; SIMODORO-IP, 82 Rue
Sylvabelle, 13006 Marseille (FR).
- (81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR,
KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,

(54) Title: EX VIVO SUBCUTANEOUS INJECTION MODEL

(54) Titre : MODELE D'INJECTION SOUS CUTANEE EX VIVO

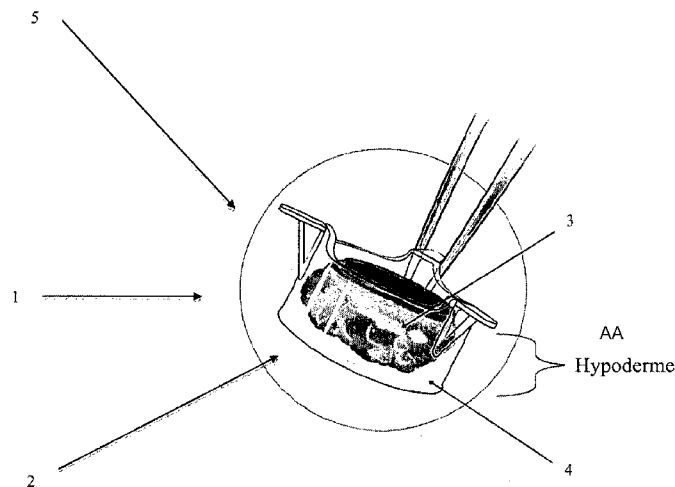


Figure 1

AA Hypodermis

(57) Abstract: The invention relates to an ex vivo model for subcutaneous injection and is directed towards an in vitro method comprising the steps of (i) immersing a skin explant in a liquid matrix capable of solidifying such that the upper face of the epidermis is not covered, which matrix is itself contained in a cell culture insert, the base of which consists of a porous membrane, and of (ii) solidifying this matrix so as to trap the immersed part of this skin explant, wherein the upper face of the epidermis is not covered, and to cause this same matrix to adhere to the side walls and to the porous membrane of the insert, wherein the skin explant comprises a thickness of at least 5 mm of hypodermis.

(57) Abrégé : L'invention est relative à un modèle ex vivo pour l'injection sous-cutanée et vise un procédé in vitro comprenant les



WO 2019/170281 A1

SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasienn (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

étapes de i) immersion d'un explant de peau dans une matrice liquide apte à se solidifier de sorte que la face supérieure de l'épiderme ne soit pas recouverte, laquelle matrice est elle-même contenue dans un insert pour culture cellulaire dont le fond est constitué d'une membrane poreuse, et de (ii) solidification de cette matrice de sorte d'emprisonner la partie immergée de cet explant de peau, où la face supérieure de l'épiderme n'est pas recouverte, et de faire adhérer cette même matrice aux parois latérales et à la membrane poreuse de l'insert, où l'explant de peau comprend une épaisseur d'au moins 5 mm d'hypoderme.

Modèle d'injection sous cutanée *ex vivo*

La présente demande internationale revendique la priorité de la demande de brevet français FR18/70232 déposée en date du 5 mars 2018.

Domaine de l'invention

5 La présente invention est relative au domaine de l'injection sous-cutanée et propose, plus spécifiquement, le premier modèle *ex vivo* pour ce type d'injection.

Art antérieur

La seringuabilité et l'injectabilité sont deux caractéristiques critiques de toute formulation destinée à une injection parentérale. La première se réfère à la capacité
10 d'une formulation à passer facilement à travers une aiguille hypodermique et la seconde se réfère à la performance de cette formulation durant l'injection (GROVES, Parenteral Technology Manual. Interpharm Press. Vol.9, p:99–100, 1988).

La seringuabilité repose sur divers facteurs tels que la facilité à colmater, à mousser ou encore la mesure de la dose à injecter. Pour ce qui est de l'injectabilité,
15 celle-ci repose sur la pression ou la force d'injection requise, l'uniformité d'écoulement et l'absence de colmatage.

Ces deux paramètres peuvent être affectés aussi bien par la formulation en tant que telle que par la géométrie de l'aiguille, notamment par son diamètre interne, par sa longueur, par la forme de son ouverture ou par l'extrémité de la seringue. Ces deux
20 paramètres sont en tout cas d'une importance critique dès lors que l'on s'adresse aux dispositifs d'auto-injection, tels que les stylos ou les auto-injecteurs, lesquels sont équipés d'aiguilles très fines avec des aiguilles de l'ordre de 29 à 31G. Si de telles aiguilles permettent de réduire la douleur à l'injection, elles requièrent néanmoins d'augmenter la force d'injection et nécessitent donc de déterminer rapidement, au cours

du développement, la seringuabilité et l'injectabilité de la composition de sorte de les modifier si nécessaire.

Selon la note d'orientation Q6A de l'ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE), les formulations parentérales conditionnées dans des seringues préremplies ou dans des cartouches d'auto-injecteurs doivent être soumises à des procédures d'essai et à des critères d'acceptation liés à la fonctionnalité du système d'administration. De même, dans les conseils pour l'industrie de la FDA sur les systèmes de fermeture des récipients pour l'emballage des médicaments à usage humain et des produits biologiques, l'évaluation de la performance de la seringue est requise. Ces prérequis doivent être adressés en déterminant la force nécessaire pour initier et maintenir le mouvement du piston dans la chambre, et la capacité de la seringue à délivrer la quantité de produit médicamenteux.

En dépit de ces exigences réglementaires, aucune procédure de test officielle n'est spécifiée dans les pharmacopées. Maintenant, si une mauvaise seringuabilité peut être solutionnée facilement en faisant varier la taille de l'aiguille, il n'en va pas de même pour l'injectabilité. Aussi, et dans la mesure où l'injectabilité a potentiellement un impact important sur l'observance du patient, il importe d'étudier très tôt ce paramètre.

Des méthodes de détermination de l'injectabilité d'une composition ont donc été déterminées dans l'art antérieur. RITSCHER & SUZUKI (1979) ont ainsi proposé une méthode pour déterminer l'injectabilité de compositions parentérales basée sur la détermination du temps nécessaire à l'injection en douceur, avec une pression donnée et pour un système à aiguille-seringue donné, d'une solution ou suspension donnée dans un échantillon de viande. La détermination de la force nécessaire pour injecter un liquide à travers une aiguille a également utilisé par le passé un dynamomètre ou un rhéomètre micro-capillaire relié à un dynamomètre. Finalement, il résulte des études menées avec ces dispositifs que l'injectabilité d'une composition est liée d'un côté à la vitesse de son injection et à sa viscosité et, de l'autre côté, à la nature du milieu dans lequel elle est injecté. Il en résulte que la détermination et l'adaptation de l'injectabilité *in vivo* (dans la peau) d'une composition donnée ne sont pas simples d'accès et nécessitent le plus souvent de passer par une dernière étape d'essai chez l'homme.

Il existe donc un besoin existant pour déterminer facilement et rapidement l'injectabilité *in vivo* d'une composition, notamment par voie sous cutanée, en limitant, autant que possible, le passage par une mise au point (reformulation) chez l'homme, mais aussi par l'animal sachant que son utilisation tend à se limiter de plus en plus.

5 Résumé de l'invention

Les inventeurs ont en effet mis en évidence que malgré la structure « molle » de l'hypoderme, l'utilisation d'un explant de peau comprenant au moins 5mm d'hypoderme dans un procédé de culture spécifique n'entraîne pas, comme on aurait pu s'y attendre, un avachissement de l'hypoderme avec le temps. Il est en outre courant
10 que la perte de la structure tridimensionnelle entraîne des modifications fonctionnelles et la modification de la structure cellulaire avec notamment des phénomènes de dédifférenciation ou alors de différenciation inappropriée. Au contraire, les inventeurs ont pu mettre en évidence qu'un tel explant de peau mis en œuvre dans ce procédé de culture garde sa structure tridimensionnelle native où le tissu conjonctif tout autant que
15 le tissu adipocytaire formant l'hypoderme ne montrent pas de changement avec le temps, notamment au niveau cellulaire. Il est ainsi possible, après 5 à 7 jours, d'effectuer un pli cutané sur ce dernier de sorte de réaliser une injection sous-cutanée.

Cette découverte permet de bénéficier d'un explant de peau en culture reproduisant fidèlement *ex vivo* la structure tridimensionnelle de la peau avec ses
20 différentes couches de peau et, surtout, son hypoderme. Dès lors, l'existence d'un tel explant rend possible, pour la première fois, le fait de tester *ex vivo* une injection sous-cutanée et ses différents paramètres. Cette découverte des inventeurs a donc permis la réalisation du premier modèle *ex vivo* d'injection sous-cutanée, lequel modèle reproduit fidèlement la structure tridimensionnelle de la peau, même après plusieurs jours de
25 culture.

En conséquence, un premier objet de l'invention concerne un procédé *in vitro* comprenant les étapes de :

- i) immersion d'un explant de peau dans une matrice liquide apte à se solidifier de sorte que la face supérieure de l'épiderme ne soit pas recouverte, laquelle

matrice est elle-même contenue dans un insert pour culture cellulaire dont le fond est constitué d'une membrane poreuse, et

- 5 ii) solidification de cette matrice de sorte d'emprisonner la partie immergée de cet explant de peau, où la face supérieure de l'épiderme n'est pas recouverte, et de faire adhérer cette même matrice aux parois latérales et à la membrane poreuse de l'insert ;

Caractérisé en ce que l'explant de peau comprend une épaisseur d'au moins 5 mm d'hypoderme et en ce que le procédé vise à l'obtention d'un modèle *ex vivo* pour l'injection sous-cutanée.

- 10 Avantageusement, le procédé selon l'invention comprend en outre les étapes de :

- iii) mise en place de l'insert dans un container ou un puits de culture, et
 iv) mise en culture de l'explant de peau dans un milieu approprié.

15 Un deuxième objet de l'invention concerne un insert pour culture cellulaire susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'invention, qui peut être mis en place dans un container ou un puits de culture qui présente un fond constitué d'une membrane poreuse et qui contient l'explant de peau emprisonné dans une matrice solidifiée qui est en contact avec le bord interne de l'insert et la membrane poreuse et où l'épiderme de l'explant de peau est en contact avec l'atmosphère, et le derme, les annexes épidermiques et l'hypoderme de cet explant de peau sont emprisonnés dans la matrice
20 solidifiée.

A noter que cet insert constitue le modèle d'injection sous-cutanée *ex vivo* obtenu par le procédé selon l'invention.

Un troisième objet de l'invention concerne l'utilisation d'un tel insert en tant que modèle *ex vivo* d'injection sous cutanée.

- 25 Avantageusement, pour la détermination de l'injectabilité d'une composition, du bolus d'injection de la composition, de la toxicité locale résultant de l'injection de la composition et/ou encore de l'efficacité de la composition

Un quatrième objet de l'invention concerne un kit comprenant un tel insert et un dispositif d'injection automatique, lequel est de préférence couplé à un dynamomètre, de sorte de pouvoir déterminer les caractéristiques d'injectabilité d'une composition.

Description des dessins

5 La figure 1 est une représentation de l'insert pour culture cellulaire (1) avec des ergots (5) dont le fond est constitué d'une membrane poreuse (2) et qui contient l'explant de peau (3) emprisonné dans une matrice solidifiée (4).

Les figures 2A et 2B montrent des coupes d'explants de peau de deux donneurs distincts mis en œuvre dans le procédé selon l'invention à 0, 3 et 7 jours de culture.

10 La figure 3 illustre la stabilité dans le temps de la taille des adipocytes au sein de l'explant de peau du modèle *ex vivo* d'injection sous-cutanée.

La figure 4 montre des coupes d'explants de peau 6h, 12h et 24h après l'injection dans le tissu adipeux d'un cocktail pro-inflammatoire.

Description détaillée de l'invention

15 En ce qui concerne le premier objet de l'invention, on entend par « injection sous-cutanée », une injection qui est réalisée dans l'hypoderme, ce qui lui vaut également l'appellation d'injection « hypodermique ». Ce type d'injection, qui est bien connue de l'homme du métier, nécessite généralement de pratiquer un pli cutané à l'aide des doigts et l'injection sous-cutanée est alors réalisée dans le pli cutané.

20 Par « explant de peau », on désigne un fragment de peau qui comprend, outre l'épiderme, le derme et les annexes épidermiques, une épaisseur d'au moins 5 mm d'hypoderme. Les annexes épidermiques correspondent aux follicules pileux, aux glandes sébacées et aux glandes sudoripares. L'hypoderme est la couche de tissu qui est située immédiatement sous le derme de la peau. L'hypoderme un tissu conjonctif lâche
25 qui est richement vascularisé et qui contient en outre du tissu adipeux.

Idéalement, l'explant de peau comprend entre 5 et 15 mm d'hypoderme et, préférentiellement, entre 5 et 10 mm d'hypoderme.

En lien avec l'étape i), l'immersion de l'explant de peau est telle que l'hypoderme est immergé en totalité dans la matrice liquide apte à se solidifier et la couche supérieure de derme est quant à elle immergée à au moins 90% (dans le sens de l'épaisseur), de préférence à au moins 95% et, idéalement, en totalité. Parallèlement, la couche d'épiderme, en surface de l'explant de peau, émerge d'au moins 90% (dans le sens de l'épaisseur), de préférence d'au moins 95% et, idéalement là encore, en totalité.

Pour ce qui est de la phase de solidification, elle est réalisée de sorte que l'exposition de l'hypoderme, du derme et de l'épiderme soit la même que suite à la phase d'immersion de l'explant de peau dans la matrice liquide apte à se solidifier.

Si l'explant de peau est avantageusement de forme cylindrique, d'autres formes géométriques peuvent parfaitement convenir pour la mise en œuvre du procédé selon l'invention. Ainsi, on peut tout aussi bien envisager des explants de peau présentant des formes carrées, rectangulaires, ovales, voire triangulaires ou autres.

On choisira les dimensions de l'explant de peau de sorte de pouvoir réaliser un pli cutané, lequel est typiquement réalisé au moyen d'une pince fine. Maintenant, le fait de pratiquer un pli cutané pour réaliser l'injection sous-cutané n'est nullement nécessaire. Dans le cas d'un dispositif d'injection sous-cutané automatisé par exemple, la pratique d'un tel pli cutané n'est nullement nécessaire et cette injection peut être effectuée en paramétrant le dispositif d'injection sous-cutané de sorte qu'il effectue une injection à une profondeur de pénétration de l'aiguille dans l'explant qui est préalablement paramétrée.

Dans le cas d'un explant de peau de forme cylindrique, on optera ainsi plutôt pour un explant de peau présentant un diamètre compris entre 10 mm et 50 mm, de préférence entre 15 mm et 40 mm, voir même entre 15 mm et 30mm avec des valeurs qui pourront être comprises typiquement entre 17 et 23 mm.

Si cet explant de peau est prélevé chez un mammifère, on pourra opter pour l'humain ou le porc. Maintenant, eu égard à la destination privilégiée du procédé selon l'invention, on optera plutôt pour un explant de peau humaine.

En lien avec l'origine de l'explant de peau, celui-ci peut provenir d'une plastie
5 provenant de n'importe quelle partie du corps, avec notamment des plasties de l'abdomen, de la poitrine, des fesses, du dos, voire, pourquoi pas, du cuir chevelu ou de tout autre partie du corps comprenant de la peau.

Dans le but de bénéficier d'une bonne survie de l'explant de peau *in vitro*, il est préférable que celui-ci ait été prélevé moins de 72h avant sa mise en œuvre dans le
10 procédé selon l'invention. Maintenant, on préférera utiliser un explant de qui a été prélevé il y a moins de 48 heures. Typiquement, une fois l'explant de peau prélevé, il faut au moins une heure avant que celui-ci ne puisse être mis en œuvre dans le procédé selon l'invention.

Par rapport au procédé décrit dans la demande internationale WO 2013/164436
15 dont le procédé selon l'invention constitue, d'une certaine manière, un perfectionnement, la nature distincte de l'explant de peau utilisé permet également de se passer de l'association de l'explant de peau avec un anneau (ou disque perforé) constitué par un matériau hydrophobe et qui va conférer une flottabilité suffisante à l'explant au sein de la matrice liquide.

20 En effet, les inventeurs ont constaté que la présence d'une épaisseur d'au moins 5 mm permet de conférer une flottabilité suffisante à l'explant de peau sur la matrice liquide de sorte qu'il est possible de n'utiliser aucun moyen complémentaire pour améliorer la flottabilité de l'explant de peau.

En conséquence, et selon un mode de réalisation que l'on pourra considérer
25 comme préféré, le procédé selon l'invention ne comprendra aucune étape, préalable à l'étape i), de fixation à l'explant de peau, notamment sur la surface épidermique, d'un matériau hydrophobe ; lequel matériau hydrophobe étant normalement utilisé pour améliorer la flottabilité de l'explant de peau.

Maintenant, il est également possible de faire le choix d'une telle étape préalable et ceci même si elle n'est pas nécessaire. En effet, la fixation de cet anneau permet de délimiter la zone d'application topique pour des composés à tester. Dans ce cas, le procédé selon l'invention comprendra alors, préalablement à l'immersion de l'explant de peau dans la matrice liquide apte à se solidifier, une étape i) de fixation à la surface de l'épiderme de l'explant de peau d'un anneau, ou disque perforé, constitué par un matériau hydrophobe, dont le diamètre extérieur est supérieur à celui de la surface épidermique de l'explant de peau, et le diamètre intérieur est celui de cette même surface épidermique de l'explant de peau.

10 A titre de matériau hydrophobe utilisable pour réaliser cet anneau, on préférera des matériaux ne présentant aucune toxicité pour la peau comme, par exemple, un polymère de paraffine, de type PARAFILM® (SIGMA), ou un polymère de silicone.

Pour ce qui est de la fixation de cet anneau à la surface de l'épiderme de l'explant de peau, elle est réalisée de préférence à l'aide d'une colle, laquelle colle est de préférence ajoutée à la surface inférieure de l'anneau. Cette colle peut être choisie parmi tout type de matériau non toxique pour la peau et ayant pour effet l'adhésion de l'anneau à la surface épidermique de l'explant de peau. Typiquement, on pourra choisir une colle hydrophobe comme, par exemple, une colle à base de silicone.

Par « matrice liquide apte à se solidifier », on désigne toute solution liquide dont la composition spécifique (que ce soit en termes de composé(s) et de concentration) est telle que, lors de la mise en œuvre de conditions appropriées, notamment des conditions particulières de température, la solution liquide prend une consistance de type solide ou de type gel. Maintenant, la nature de cette matrice apte à se solidifier doit permettre le maintien en vie des cellules de la biopsie de peau, c'est-à-dire n'avoir aucun effet cytotoxique et posséder une température de solidification/polymérisation à température ambiante (i.e. de 15°C à 25°C). Sa composition spécifique peut avoir une origine animale, végétale, synthétique, voire mixte. En outre, la nature et la ou les concentrations de ces composants sont choisis en fonction des caractéristiques physico-chimiques souhaitées de la matrice lorsqu'elle est solidifiée, notamment en termes de souplesse et de résistance. Pour ce qui est du volume de la matrice liquide, il sera de 1/3 à 2/3 du volume total de l'insert, de préférence de 2/5 à 3/5 du volume total ; la moitié

du volume total de l'insert étant le volume préféré. Pour ce qui est du choix de cette matrice liquide apte à se solidifier, on la choisira parmi les solutions liquides, de préférence nutritives, capable de prendre la forme d'un solide ou d'un gel dans des conditions particulières compatibles avec la survie et la culture des cellules qui composent l'explant de peau. A titre d'exemple de telle matrice liquide apte à se solidifier, on pourra citer le plasma sanguin, une solution dérivée de plasma sanguin (ex. une dilution de plasma sanguin dans du tampon physiologique, notamment une dilution de plasma sanguin à au moins 10%, 20%, 30%, voire à au moins 40% (poids/poids total de la matrice)), une solution de fibrinogène, une solution de collagène, une solution de gélatine, des solutions de polymères synthétiques, des solutions de polymères naturels (ex. agarose (agarose ou agar-agar à faible/bas points de fusion), amidon, polysaccharides), et leurs mélanges. Idéalement, cette matrice liquide apte à se solidifier ne contient aucun facteur de croissance, et mieux encore pas de sérum.

Selon un mode de réalisation préféré, la matrice liquide apte à se solidifier est composée de deux solutions qui sont mélangées ensemble dans l'insert en préalable à l'étape i) d'immersion de l'explant de peau. Cette matrice est alors composée d'une première solution choisie parmi une solution de plasma sanguin, une solution dérivée de plasma sanguin, une solution de fibrinogène, une solution de collagène, et leurs mélanges, et d'une deuxième solution d'agar-agar ou d'agarose à bas point de fusion.

La première solution, choisie parmi une solution de plasma sanguin, une solution dérivée de plasma sanguin, une solution de fibrinogène, une solution de collagène, ou leurs mélanges, est avantageusement une solution nutritive. Maintenant, cette première solution est surtout apte à se solidifier sous l'action d'une augmentation ou d'une diminution de la température et/ou par l'addition d'un composé ou d'une composition spécifique. De préférence, le composé permettant à cette première solution de se solidifier est l'ion Ca^{2+} . Ainsi, la matrice liquide présente une concentration en Ca^{2+} comprise entre 1 mM et 5 mM, de préférence entre 1,5 mM et 4,5 mM ; laquelle concentration va entraîner sa solidification.

Selon un premier mode de réalisation particulier, la matrice liquide présente une concentration en Ca^{2+} comprise 1 mM et 2 mM, de préférence entre 1,2 mM et 1,4 mM.

Selon un deuxième mode de réalisation particulier, la matrice liquide présente une concentration en Ca^{2+} comprise 2 mM et 3 mM, de préférence entre 2,5 mM et 2,9 mM et plus préférentiellement 2,8 mM de Ca^{2+} .

A noter que, dans le cas d'une solution de plasma sanguin ou d'une solution
5 dérivée de plasma sanguin, celle-ci est préalablement traitée par un agent anticoagulant aux propriétés réversibles. Pour se faire, cette solution comprend au moins un agent anti-fibrinolytique, comme le citrate de sodium, l'acide tranexamique ou de l'aprotinine, et en concentration suffisante pour obtenir l'activité anti-fibrinolytique recherchée. De préférence la matrice liquide présente une concentration finale (poids/poids total
10 matrice) comprise entre 2 et 5 % de cet au moins un agent anti-fibrinolytique.

Maintenant, la première solution sera de préférence une solution de fibrinogène.

La deuxième solution d'agar-agar ou d'agarose à bas point de fusion est préalablement chauffée pendant une durée et à une température suffisante pour être liquide et pour rester liquide à environ 37°C pendant le temps suffisant pour être
15 mélangée à la première solution dans ledit insert et jusqu'au moment de l'immersion de l'explant de peau. Typiquement, cette deuxième solution est préalablement chauffée à sa température de fusion ou à une température légèrement supérieure, de préférence à une température comprise entre 65°C et 70 °C. Le choix de l'agar-agar ou de l'agarose à bas point de fusion est fait de sorte à bénéficier, pour une solution à 1,5% (poids/poids
20 total composition) d'une température de gélification comprise entre 24°C et 28°C, et d'une température de fusion supérieure à 65,5°C. A titre d'exemple, on pourra insi citer l'agarose nommé LMP Agarose Low melting point (GIBCOBRL, LIFE TECHNOLOGIES). Toujours en lien avec cette deuxième solution, sa concentration en agar-agar ou en agarose à bas point de fusion est comprise entre 1% et 5% (de
25 préférence dans une solution physiologique), de manière plus préférée comprise entre 2% et 5%, entre 3% et 4,5%, entre 3,5% et 4, 5% ou encore entre 3,8% et 4,2% ou entre 3,9% et 4,1%, 4% étant la concentration la plus préférée (en poids rapportée au poids total de la composition). A cette concentration et une fois chauffée à sa température de
30 fusion ou à une température légèrement supérieure, cette deuxième solution en agar-agar ou en agarose à bas point de fusion peut être conservée sous une forme liquide pendant au moins 1 heure à 37 ° voire, idéalement, au moins 4 heures, 10 heures ou 16

heures. De préférence, la matrice liquide apte à se solidifier comprenant ladite première et ladite deuxième solution d'agar-agar ou d'agarose à bas point de fusion, présente une concentration finale en agar-agar ou en agarose à bas point de fusion comprise entre 0,1% et 2%, de préférence entre 0,2% et 1,8% (poids/poids totale de la matrice). Une telle concentration permet d'obtenir non seulement une matrice qui une fois solidifiée permet de conserver la structure tridimensionnelle et de maintenir en survie ledit fragment ou biopsie de peau, mais également d'obtenir une matrice solide mais suffisamment souple pour être non cassante et résistante à des chocs ponctuels. La solidification de cette matrice liquide se faisant après dépôt du fragment ou biopsie de peau en laissant le dispositif ainsi obtenu à température comprise entre 37 °C et la température ambiante, de préférence à 20 °C.

Selon un premier mode de réalisation particulier, la concentration finale en agar-agar ou en agarose à bas point de fusion dans la matrice liquide (comprenant la première et ladite deuxième solution) est comprise entre 0,5% et 2%, de préférence entre 0,5% et 1,25%, de préférence encore entre 0,5% et 1,0%, avec une concentration de 0,7% (poids/poids total de la matrice) étant la concentration la plus préférée.

Selon un deuxième mode de réalisation particulier, la concentration finale en agar-agar ou en agarose à bas point de fusion dans la matrice liquide (comprenant la première et ladite deuxième solution) est comprise entre 0,1% et 2%, de préférence entre 0,2% et 1,75%, 0,25% étant la concentration la plus préférée. Une telle concentration permet d'obtenir une matrice qui, une fois solidifiée, permet tout à la fois de conserver la structure tridimensionnelle et de maintenir en survie l'explant de peau, et simultanément d'obtenir une matrice suffisamment souple pour être non cassante et résistante à des effets mécaniques appliqués sur l'explant de peau. La solidification de cette matrice liquide se fait après immersion de l'explant de peau en laissant refroidir l'ensemble.

Selon un autre mode de réalisation préféré, la matrice liquide apte à se solidifier comprend en outre des cellules autres que les cellules qui composent l'explants de peau, lesquelles cellules sont choisies dans le groupe consistant en les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules nerveuses. De préférence, ces cellules sont des fibroblastes et, idéalement, des fibroblastes primaires (par opposition aux lignées cellulaires de

fibroblastes), tels que des fibroblastes dermiques obtenus à partir de prépuce humain. Ces fibroblastes primaires, notamment dermiques, peuvent être préparés et obtenus à partir de méthodes standards bien connues de l'homme de l'art (voir par exemple le document HOWARD BV *et al.*, *A new method for the establishment of diploid fibroblast cell cultures from human foreskins*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol.153(2), p:280-3, 1976). De préférence, ces cellules, et notamment les fibroblastes, sont contenues dans la matrice à une concentration entre 5.10^3 et 5.10^5 cellules/ml, de préférence encore entre 10^4 et 10^5 cellules/ml, l'intervalle allant de 3.10^4 à 5.10^4 cellules/ml étant la gamme de concentration la plus préférée.

10 La matrice liquide pourra en outre comprendre différents composés tels que conservateurs, agents de pH, etc... A titre d'exemple, la matrice liquide contiendra entre 5 et 500 mg/mL d'acide ascorbique, de préférence entre 25 et 75 mg/mL, avec une concentration préférée d'acide ascorbique de 50 mg/mL.

Selon un troisième mode de réalisation également préféré, la matrice liquide apte à pouvoir se solidifier est une solution dérivée de plasma sanguin et comprend :

- a) de 25 à 75 % (volume/volume total^{^*}) de fibrinogène, de préférence de 35 % à 45 % (v/v),
- b) de 5 % à 12 % (volume/volume total) d'une solution saline de CaCl_2 à 1 %, de préférence 8 %,
- 20 c) de 5 % à 2 %, de préférence l'agent anti-fibrinolytique étant choisi parmi l'acide tranexamique ou de l'aprotinine
- d) de 0,5% à 4% d'agarose à bas point de fusion, de préférence de 1 % à 2 %, et
- e) une solution physiologique comme une solution de NaCl à 0,9 %, qsp à 100%.

25 Pour plus de détail en lien avec les matrices aptes à se solidifier et les méthodes pour y placer les explants de peau, on pourra consulter la demande de brevet Européen n° EP 2 882 290 A1. Maintenant, ces matrices et ces méthodes sont incorporées à la présente demande de brevet par référence.

Pour ce qui est de l'insert, il peut prendre des formes multiples et notamment correspondre à un insert suspendu ou à un insert sur pilotis. Maintenant, on optera de préférence pour un insert suspendu. Le fond de cet insert est constitué d'une membrane poreuse dont le diamètre est compris entre 5 et 40 mm et de manière plus préférée entre 9,5 et 30 mm. Pour ce qui est de la porosité de cette membrane, elle doit permettre d'empêcher à la matrice liquide de la traverser avant sa solidification. Typiquement, cette membrane poreuse présentera une porosité comprise entre 0,4 et 8 μm , de manière préférée entre 0,4 μm et 1,5 μm , avec l'intervalle allant de 0,8 μm et 1,2 μm comme intervalle de porosité préféré. En termes de matière, on pourra ainsi choisir une membrane poreuse choisie parmi les membranes en polyéthylène téréphtalate (PET), en nitrocellulose et en polycarbonate. Finalement, et à titre d'exemple de tels inserts, on pourra citer ceux fournis par les sociétés NUNC, CORNING, BECTON DICKINSON (BD FALCON), MILLIPORE (MILLICELL), qui peuvent prendre la forme d'inserts avec membrane en polycarbonate, en PET ou en nitrocellulose, lesquels sont pré-emballés dans des plaques multi-puits pour plaque de culture 6, 8, 12 ou 24 puits, et dont la porosité de la membrane peut varier de 0,4 et 8 μm . Typiquement, les inserts utilisés présentent une membrane en PET de porosité comprise entre 0,8 μm et 1 μm , et sont adaptés pour les puits des plaques de culture à 8 puits.

L'étape de solidification de la matrice liquide est obtenue en présence d'ions calcium, de préférence également en présence de thrombine. Lorsque la matrice liquide est une matrice liquide contenant une solution de plasma sanguin, une solution dérivée de plasma sanguin, une solution de fibrinogène ou une solution de collagène, la solidification de cette matrice à l'étape ii) est obtenue pour cette solution suite à l'ajout de thrombine et/ou suite à une augmentation de la température et/ou en présence de facteurs sécrétés par les cellules telles que les fibroblastes primaires intégrées à la matrice. Avantagusement, cette matrice liquide se solidifie après un maximum de 8 heures, de préférence moins d'une heure, avec une durée préférée de l'étape de solidification de moins de 10 min après immersion de l'explant de peau dans la matrice liquide apte à se solidifier à l'étape i).

Avantagusement, le procédé selon l'invention comprend en outre les étapes de :

iii) mise en place de l'insert dans un container ou un puits de culture, et

iv) mise en culture de l'explant de peau dans un milieu approprié.

Typiquement, le container ou le puits dans lequel est déposé cet insert est un puits d'une plaque de culture cellulaire à 6, 8, 12, 24 ou 48 puits. Parmi les plaques de cultures utilisables dans le procédé selon l'invention, on pourra citer celles fournies en particulier par les sociétés NUNC, CORNING, BECTON DICKINSON (BD FALCON), MILLIPORE (MILLICELL),

Selon un autre mode de réalisation préférée, le fond de l'insert est situé à une distance comprise entre 1 et 2,5 mm du fond du container/puits le contenant.

Le procédé selon l'invention pourra en outre comprendre une étape iii'),
10 consécutive à l'étape iii), laquelle consiste en apposer un couvercle ou un film sur le container ou le puits dans lequel a été mis en place l'insert à l'étape iii), ceci en vue de rendre ce container ou ce puits étanche. De la sorte, le container ou le puits obtenu peut être transporté sans difficultés, que ce soit par voie terrestre, maritime ou aérienne. En effet, l'explant de peau est non seulement emprisonné et donc maintenu fermement par
15 la matrice solide dans l'insert à membrane poreuse, mais également nourri, pouvant ainsi voyager sans milieu de culture lors de son transport tout en étant maintenu en survie.

Par « culture » ou « mise en culture », on entend désigner ici en particulier la maintenance de l'état physiologique et, le cas échéant, morphologique de l'explant de
20 peau, et donc desdites cellules qui le compose. Ainsi, on vise par cette étape à limiter les phénomènes de mort cellulaire et à maintenir l'état de différenciation des cellules (en fait limiter les phénomènes de dédifférenciation ou de différenciation inappropriés).

Par « milieu » ou « milieu de culture » on entend une composition liquide comprenant tous les éléments nécessaires à la culture des cellules de l'explant de
25 (ex. milieu William's E, KBM, DMEM, etc.). Ce milieu de culture, par sa nature tout autant que par son volume dans le container, permet de favoriser la survie de l'explant de peau et des cellules le constituant dans le temps. Outre la survie des cellules de l'explant de peau, le milieu de culture en question permet, notamment en limitant le

stress sur celles-ci, de maintenir les cellules de l'explant de peau dans leur état initial que ce soit en terme structurel ou fonctionnel.

Dans le cas où le procédé selon l'invention ne comprendrait pas l'étape iii') décrite précédemment, il pourrait comprendre une étape iv'), consécutive à l'étape iii),
5 laquelle consiste en apposer un couvercle ou un film sur le container ou le puit dans lequel a été mis en place l'insert à l'étape iii), ceci en vue de rendre ce container ou ce puit étanche. De la sorte, le container ou le puit obtenu peut être transporté sans difficultés, que ce soit par voie terrestre, maritime ou aérienne.

Selon un mode de réalisation préférée, le procédé selon l'invention comprend en
10 outre l'étape de :

v) injection, en sous-cutané et dans l'explant de peau, d'une composition.

La composition en question est une composition à tester qui est sous forme liquide. Avantagement, le volume de cette composition est compris entre 10 μ l et 1 ml, de préférence entre 10 μ l et 500 μ l et, de manière particulièrement préférée, entre 10
15 μ l et 200 μ l.

L'aiguille pour l'injection de la composition présente typiquement une longueur suffisante pour atteindre l'hypoderme. Ainsi, on utilisera de préférence des aiguilles présentant une longueur supérieure ou égale à 10 mm. A titre d'exemple de telles
20 aiguilles, on pourra utiliser des aiguilles présentant une longueur de 12, 16, 20, 25, 30, 35, 40 ou encore 45 mm. Avantagement donc, l'aiguille présente une longueur comprise entre 16 et 45 mm, de préférence une longueur allant de 20 à 40 mm. Pour ce qui est du diamètre de l'aiguille à utiliser, il peut être identifié simplement par l'homme de l'art au regard de ses connaissances générales. Typiquement, de telles aiguilles hypodermiques sont du type 18G, 19G, 20G, 21G, 22G, 23G, 25G, 26G, 27G, 28G,
25 29G, 30G voire 31G.

Dans un mode de réalisation particulier, l'étape v) est réalisée par un expérimentateur. Dans un tel cas, l'étape d'injection v) peut être directement précédée d'une étape v°) de pincement de l'explant de peau par l'expérimentateur de sorte de

permettre la formation d'un pli cutané et de faciliter, pour l'expérimentateur, l'étape v) d'injection sous-cutanée.

Dans un autre mode de réalisation particulier, cette étape v) est réalisée par un dispositif d'injection automatique. Typiquement, le dispositif permet une injection à une
5 profondeur déterminée, par rapport à la surface de l'épiderme, de sorte d'obtenir une injection sous-cutanée.

Selon un autre mode de réalisation préférée, le procédé selon l'invention comprend en outre l'étape de :

vi) détermination de l'injectabilité de la composition.

10 Lorsque l'étape v) d'injection est réalisée par un expérimentateur, c'est lui qui va déterminer l'injectabilité de cette composition. Pour se faire, il est possible d'associer à cette injectabilité des valeurs arbitraires associées à des caractéristiques spécifiques de cette injection. A titre d'exemple, l'expérimentateur pourra utiliser l'échelle ci-dessous :

Score 1 : injection impossible ou très difficile ; écoulement : nul ou lent (à-coups)

15 Score 2 : injection difficile ; écoulement : lent au départ (à-coups) puis continu

Score 3 : injection correcte ; écoulement : continu

Score 4 : injection facile ; écoulement : continu

L'expérimentateur, en effectuant, à plusieurs reprises, une injection de la composition donnée, pourra lui attribuer une valeur moyenne d'injectabilité.

20 Lorsque maintenant l'étape v) d'injection est réalisée par un dispositif d'injection automatique, l'injectabilité est déterminée par celui-ci. Pour se faire, le dispositif d'injection automatique est couplé à un dynamomètre. Ainsi, le dispositif d'injection automatique est capable de déterminer la force nécessaire (mPa) à l'injection sous-cutanée de la composition.

25 Plus spécifiquement, le dynamomètre permet de déterminer :

- 1) la force de décollage (“initial glide force” ou PBF), qui correspond à la force requise pour mettre en mouvement le piston de la seringue ;
- 2) la force maximale (Fmax) qui correspond à la valeur de force mesurée la plus importante pour mettre en mouvement le piston de la seringue avant que ce
5 dernier ne finisse sa course à l’extrémité de la seringue ; et/ou
- 3) la force de glissement dynamique (« dynamic glide force” ou DGF) qui correspond à la force requise pour maintenir le piston de la seringue en mouvement de sorte qu’il expulse le contenu de celle-ci.

Ces trois valeurs sont caractéristiques de l’injectabilité d’une composition.

10 Maintenant, et selon un autre mode de réalisation préférée, le procédé selon l’invention pourra comprendre une étape de :

vi) détermination du bolus d’injection de la composition, de la toxicité locale résultant de l’injection de la composition et/ou de l’efficacité de la composition.

15 En lien avec la connaissance de la dose thérapeutique à administrer, le procédé selon l’invention permet de déterminer véritablement le bolus d’injection en sélectionnant un volume d’une composition qui comprend une concentration donnée d’un principe actif.

20 De même, le procédé selon l’invention permet d’accéder à la toxicité locale résultant de l’injection. Il suffit pour cela de procéder à l’analyse morphologique et/ou moléculaire au niveau site d’injection. Une telle analyse peut être effectuée par l’inclusion du modèle de peau *ex vivo* à la suite de l’injection, la préparation de coupes à partir du bloc obtenu et enfin l’analyse visuelle et/ou immunohistochimique des coupes localisées au niveau du site d’injection.

25 Enfin, en ce qui concerne la détermination de l’efficacité de la composition, celle-ci n’est possible que si l’effet thérapeutique résultant de la composition peut être déterminée au niveau du modèle d’injection *ex vivo*.

Pour ce qui est du deuxième objet de l'invention, il s'agit d'un insert pour culture cellulaire susceptible d'être obtenu à l'issue de l'étape ii) du procédé selon l'invention.

Maintenant, il peut s'agir de l'insert tel qu'obtenu à l'issue de l'étape iii') du procédé selon l'invention.

5 L'ensemble des spécificités de cet insert sont décrites précédemment et notamment le fait qu'il puisse prendre des formes multiples comme un insert suspendu ou sur pilotis avec une préférence pour un insert suspendu grâce à la présence d'ergots (60). Cet insert pourra notamment d'une membrane poreuse dont le diamètre est
10 entre 5 et 40 mm, notamment entre 9,5 et 30 mm, dont la porosité est comprise entre 0,4 et 8 μm , voire entre 0,4 μm et 1,5 μm et qui est choisie parmi les membranes en polyéthylène téréphtalate (PET), en nitrocellulose et en polycarbonate.

En lien avec le troisième objet de l'invention, c'est plus spécifiquement la détermination de l'injectabilité d'une composition donnée qui est visée. Naturellement, cette injectabilité est fonction, non seulement de la composition, mais également de la
15 seringue et surtout de l'aiguille utilisée.

Enfin, un kit comprenant un insert tel que défini précédemment et un dispositif d'injection automatique, lequel est de préférence couplé à un dynamomètre, de sorte de pouvoir déterminer les caractéristiques d'injectabilité d'une composition. De préférence, le dispositif d'injection automatique est à même de déterminer la force de
20 décollage (PBF), la force maximale (F_{max}), et la force de glissement dynamique (« dynamic glide force » ou de la composition.

Les exemples suivants sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de la présente invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLES

1) Stabilité de l'explant dans le temps

Des explants de peau sont préparés à partir de deux prélèvements complets de peau issus de deux donneurs distincts, lesquels prélèvements comprenant l'épiderme, le derme et l'hypoderme (1,5 à 2cm). Les explants (épiderme, derme et hypoderme) sont ensuite découpés à l'aide d'un emporte-pièce métallique pour obtenir des cylindres de 11 à 20 mm de diamètre dans lesquels l'épaisseur d'hypoderme est ajustée à la valeur voulue (0,5 à 1cm). Puis, ils sont maintenus en flottaison dans une solution saline tamponnée jusqu'à l'étape de « inclusion » dans la matrice solidifiée.

Chaque explant de peau est alors inclus avec un procédé similaire à celui utilisé pour le modèle NATIVESKIN™. Brièvement, l'explant de peau est délicatement déposé sur un insert (cupule MILLICELL™ 8 puits) disposant au fond d'une membrane poreuse (en PET, porosité 1 µm) et contenant une solution dérivée de plasma sanguin traité avec un agent anticoagulant aux propriétés réversibles en présence d'ions calcium (citrate de sodium). Cette solution contient 42 % de plasma sanguin, 50 % d'une solution de NaCl à 0,9 %, 8 % d'une solution saline de CaCl₂ à 1%, un agent anti-fibrinolytique (acide tranexamique ou aprotinine), et de l'agarose fondu à bas point de fusion à 0,7% (Agarose LMP GIBCOBRL, LIFE TECHNOLOGIES) (fondu à l'étuve à 65,5 °C).

En coagulant, le plasma fait office de support dermique sur lequel adhère l'explant de peau. La coagulation consiste essentiellement en la transformation, en présence d'ions calcium et de thrombine, du fibrinogène présent dans le plasma en un échafaudage de molécules de fibrine reliées entre elles par des liaisons covalentes. L'agent anti-fibrinolytique a pour fonction d'inhiber les enzymes susceptibles de dégrader la matrice de plasma, ces enzymes étant sécrétées par l'explant de peau, et ainsi de maintenir l'intégrité de l'explant.

La solution d'agarose à 0,7% contenue dans la solution de plasma gélifie progressivement à 37°C permettant ainsi le maintien ferme de l'explant de peau dans l'insert.

La figure 1 illustre représente un tel insert pour culture cellulaire (1) avec des ergots (5) dont le fond est constitué d'une membrane poreuse (2) et qui contient l'explant de peau (3) après qu'il ait été emprisonné dans la matrice solidifiée (4).

L'ensemble constitué par l'explant de peau est maintenu en culture pendant 7
5 jours dans un incubateur à CO₂ à 37°C avec l'épiderme au contact de l'air. Le milieu de culture DMEM supplémenté avec du calcium et de la vitamine C contenu dans l'insert disposé (suspendu) sur le puits de la plaque de culture cellulaire est changé quotidiennement.

Pour les deux donneurs, des explants de peau sont prélevés à J0, J3 et J7 jours de
10 culture avant d'être fixés et inclus dans un bloc de paraffine en vue d'effectuer une analyse histologique.

Dans le détail, les explants de peau sont déshydratés par un premier bain d'alcool puis par un second bain de xylène. Enfin, un premier bain dans la paraffine permet de remplacer l'eau préalablement contenue dans l'explant de peau par la paraffine. Les
15 échantillons imprégnés de paraffine sont sortis de leur bain et transférés dans un récipient dont le fond est tapissé de papier absorbant, afin d'être apportés à proximité de la station d'inclusion.

Les échantillons, enfermés dans des cassettes d'histologie, sont plongés dans la paraffine liquide à 56°C pour faire fondre la paraffine qui les imprègne.

Pour chaque échantillon, la cassette d'histologie est ouverte, l'échantillon est éventuellement coupé en deux. Un moule d'inclusion est rempli de paraffine liquide et l'échantillon (ou les 2 morceaux d'échantillon) est placé dans le moule et orienté dans le sens désiré pour la coupe. Le moule est en même temps transféré sur un support réfrigéré afin de solidifier la paraffine du fond du moule et d'y maintenir l'échantillon.
20 Le couvercle de la cassette d'histologie sur lequel figure la référence de l'échantillon est placé par-dessus, de telle façon que la paraffine le traverse (possibilité d'ajouter de la paraffine si besoin), puis le tout est placé au froid (réfrigérateur, freezer, chambre froide...) plusieurs minutes (5 à 6), afin de solidifier la paraffine en bloc, emprisonnant

de fait l'échantillon dans la bonne orientation avec le couvercle de la cassette d'histologie qui deviendra le support du bloc.

Une fois le bloc de paraffine bien solidifié, il est démoulé. L'excès de paraffine est éventuellement gratté à l'aide d'une spatule sur les côtés du couvercle de la cassette
5 d'inclusion.

Des coupes sériées d'épaisseur variant de 4 à 5 μm sont alors réalisées sur toute la longueur du bloc de paraffine contenant l'échantillon.

Les figures 2A et 2B illustrent les résultats d'une coloration réalisée (Hématoxyline et Eosine) sur les explants de peau de deux donneurs distincts mis en
10 œuvre dans le procédé selon l'invention après 0, 3 ou 7 jours de culture.

Les résultats montrent une stabilité remarquable des explants dans le temps tant en terme de structure (les différents couches de la peau, dont celle de l'hypoderme ne montrent aucun changement notable) que de viabilité (on n'observe aucune mort cellulaire significative).

15 Pour affiner cette analyse, l'évolution des adipocytes a été suivie dans le temps par analyse d'images (PLUGIN ADIPOSOFIT du freeware IMAGEJ).

La figure 3 montre la répartition des adipocytes en fonction de leur surface dans les différents explants à 0 et 7 jours de culture.

Là encore, les résultats établissent la grande stabilité dans le temps des adipocytes
20 au sein de l'explant de peau du modèle *ex vivo* d'injection sous-cutanée.

Finalement, ces résultats démontrent que l'explant de peau présente une structure stable de son hypoderme (de même que de son derme et de son épiderme) avec le temps, ce qui en fait un modèle *ex vivo* de peau complète.

2) Injection sous-cutanée

25 Des explants de peau sont préparés comme précédemment.

Différents essais réalisés sur des explants mis en culture montrent qu'il est possible d'effectuer, sans difficulté, des injections sous-cutanées sur ces explants de peau. En outre, et dès lors que l'explant a un diamètre adapté (de l'ordre de ... mm), il est aisé de pratiquer un pli cutané avec une pince fine, de sorte d'effectuer cette
5 injection. Dans ces conditions, l'explant se maintient parfaitement et se comporte très exactement comme la peau d'un individu.

En vue d'établir que l'explant de peau constitue bien un modèle *ex vivo* d'injection sous-cutanée, nous avons cherché à savoir si celui-ci réagissait de la même manière qu'*in vivo*.

10 Pour ce faire, 100 µL d'une solution pro-inflammatoire composée de TNF-alpha (500 ng/mL) et LPS (0.2 mg/mL) ont été injectés dans le tissu adipeux des modèles à l'aide d'une seringue et d'une aiguille 27G de 12 mm de longueur. Les modèles ont ensuite été cultivés dans des conditions de culture cellulaire (incubateur à 37°C, 5% de CO2 et atmosphère saturée en eau pendant 6h, 12h ou 24h.

15 La figure 4 montre une coloration H&E réalisée sur des coupes en paraffine de 5 µm d'épaisseur afin d'évaluer l'effet de la solution injectée sur la viabilité et la structure du tissu.

Les résultats montrent l'apparition de cellules vacuolisées et pycnotiques dans l'épiderme des modèles, ainsi qu'une dégradation partielle des fibres de collagène du
20 derme, suggérant une dégénérescence liée à l'effet de la solution pro-inflammatoire.

En conséquence, ces résultats confirment que la pertinence de ce modèle d'injection sous cutané, lequel se comporte bien comme la peau *in vivo*.

REVENDICATIONS

1. Un procédé *in vitro* comprenant les étapes de :
- 5 i) immersion d'un explant de peau dans une matrice liquide apte à se solidifier de sorte que la face supérieure de l'épiderme ne soit pas recouverte, laquelle matrice est elle-même contenue dans un insert pour culture cellulaire dont le fond est constitué d'une membrane poreuse, et
- 10 ii) solidification de cette matrice de sorte d'emprisonner la partie immergée de cet explant de peau, où la face supérieure de l'épiderme n'est pas recouverte, et de faire adhérer cette même matrice aux parois latérales et à la membrane poreuse de l'insert,
- Caractérisé en ce que l'explant de peau comprend une épaisseur d'au moins 5 mm d'hypoderme et en ce que le procédé vise à l'obtention d'un modèle *ex vivo* pour l'injection sous-cutanée.
- 15 2. Le procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en outre les étapes de :
- iii) mise en place de l'insert dans un container ou un puits de culture, et
- iv) mise en culture de l'explant de peau dans un milieu approprié.
- 20 3. Le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape de :
- v) injection, en sous-cutané et dans l'explant de peau, d'une composition.
- 25 4. Le procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape de :
- vi) détermination de l'injectabilité de la composition.

5. Le procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape de :
- 5 vi) détermination du bolus d'injection de la composition, de la toxicité locale résultant de l'injection de la composition et/ou de l'efficacité de la composition.
6. Un insert pour culture cellulaire susceptible d'être obtenu par le procédé selon la revendication 1, qui peut être mis en place dans un container ou un puit de culture, qui présente un fond constitué d'une membrane poreuse et qui contient l'explant de peau emprisonné dans une matrice solidifiée qui est en contact avec le bord interne de l'insert et la membrane poreuse, et où l'épiderme de l'explant de peau est en contact avec l'atmosphère, et le derme, les annexes épidermiques et l'hypoderme de cet explant de peau sont immergés dans la matrice solidifiée.
- 15 7. Une utilisation d'un insert tel que défini à la revendication précédente en tant que modèle *ex vivo* d'injection sous cutanée.
8. L'utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que le modèle *ex vivo* d'injection sous cutanée vise à déterminer l'injectabilité d'une composition.
- 20 9. L'utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que le modèle *ex vivo* d'injection sous cutanée vise à déterminer le bolus d'injection d'une composition, la toxicité locale résultant de l'injection d'une composition et/ou l'efficacité de la composition.
- 25 10. Un kit comprenant un insert tel que défini à la revendication 6 et un dispositif d'injection automatique.
- 30

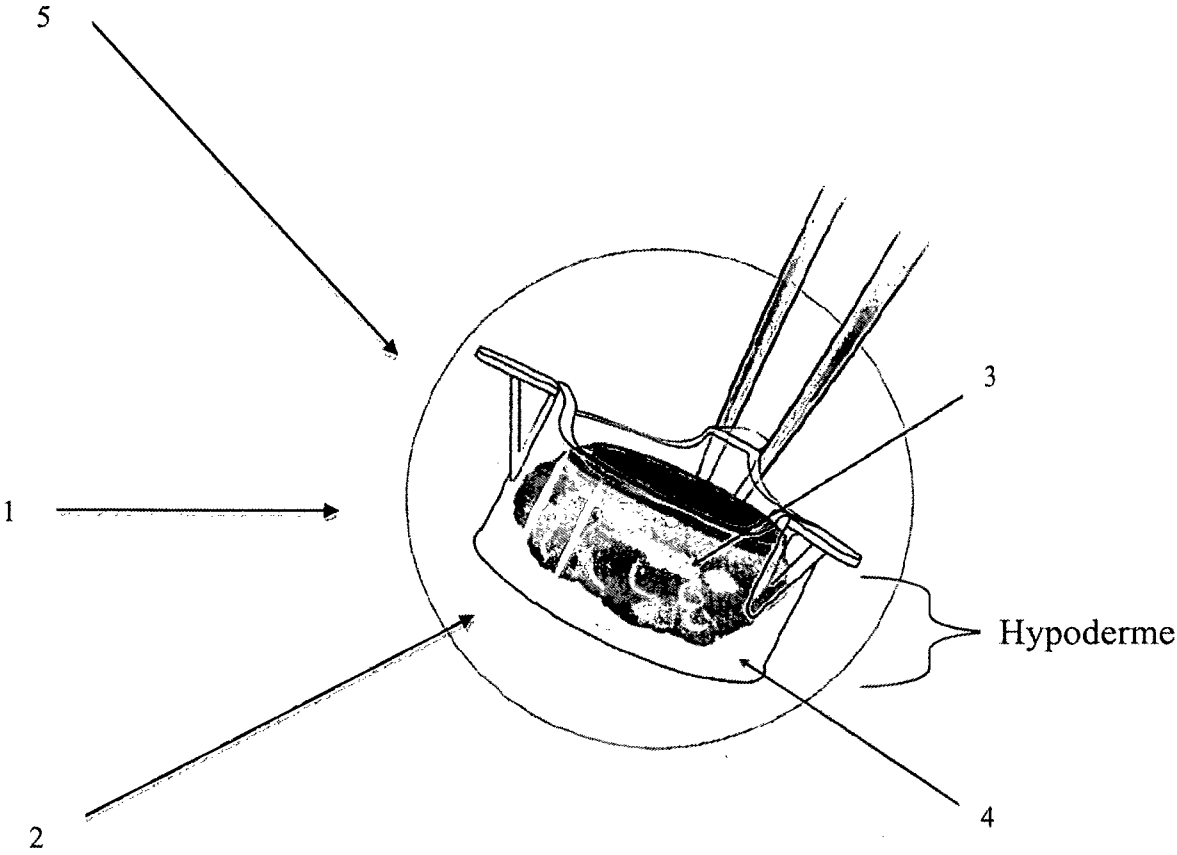


Figure 1

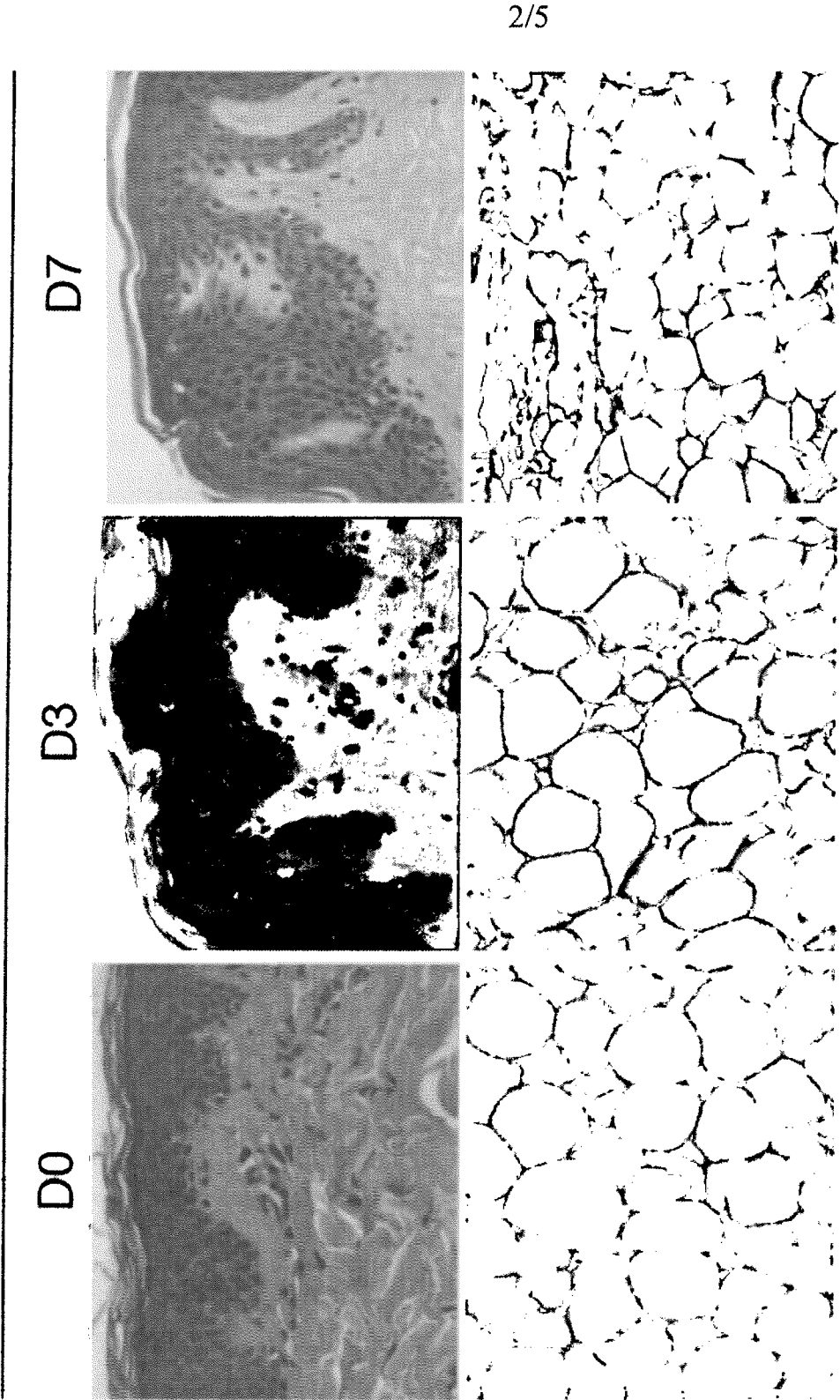


Figure 2A

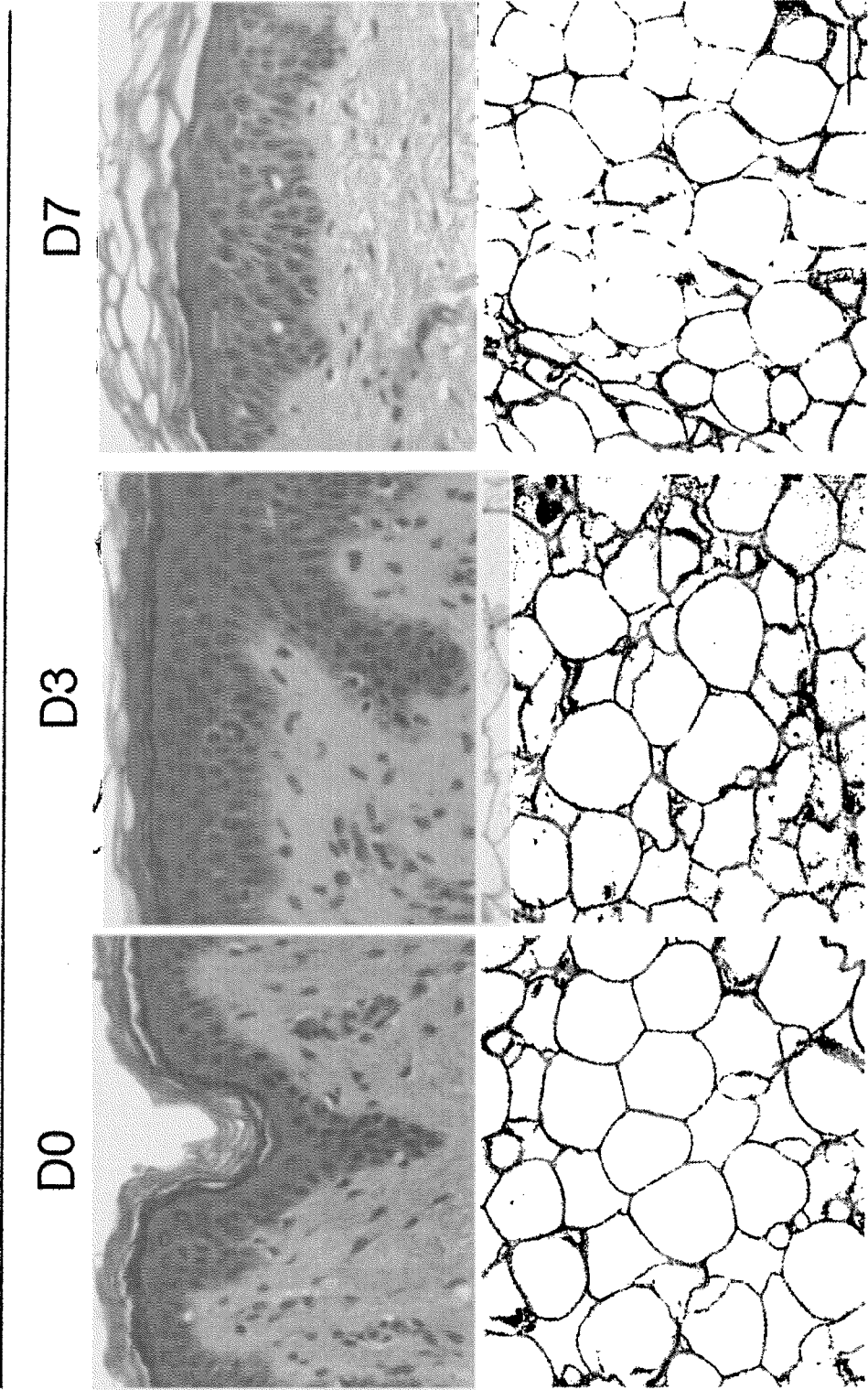


Figure 2B

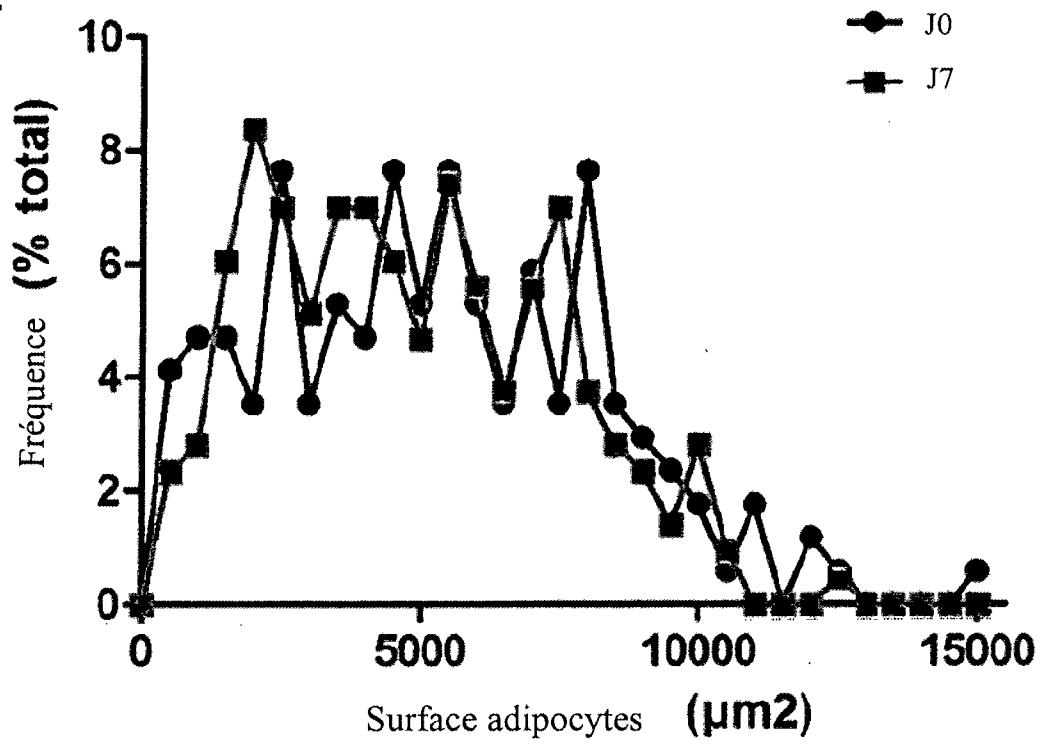


Figure 3

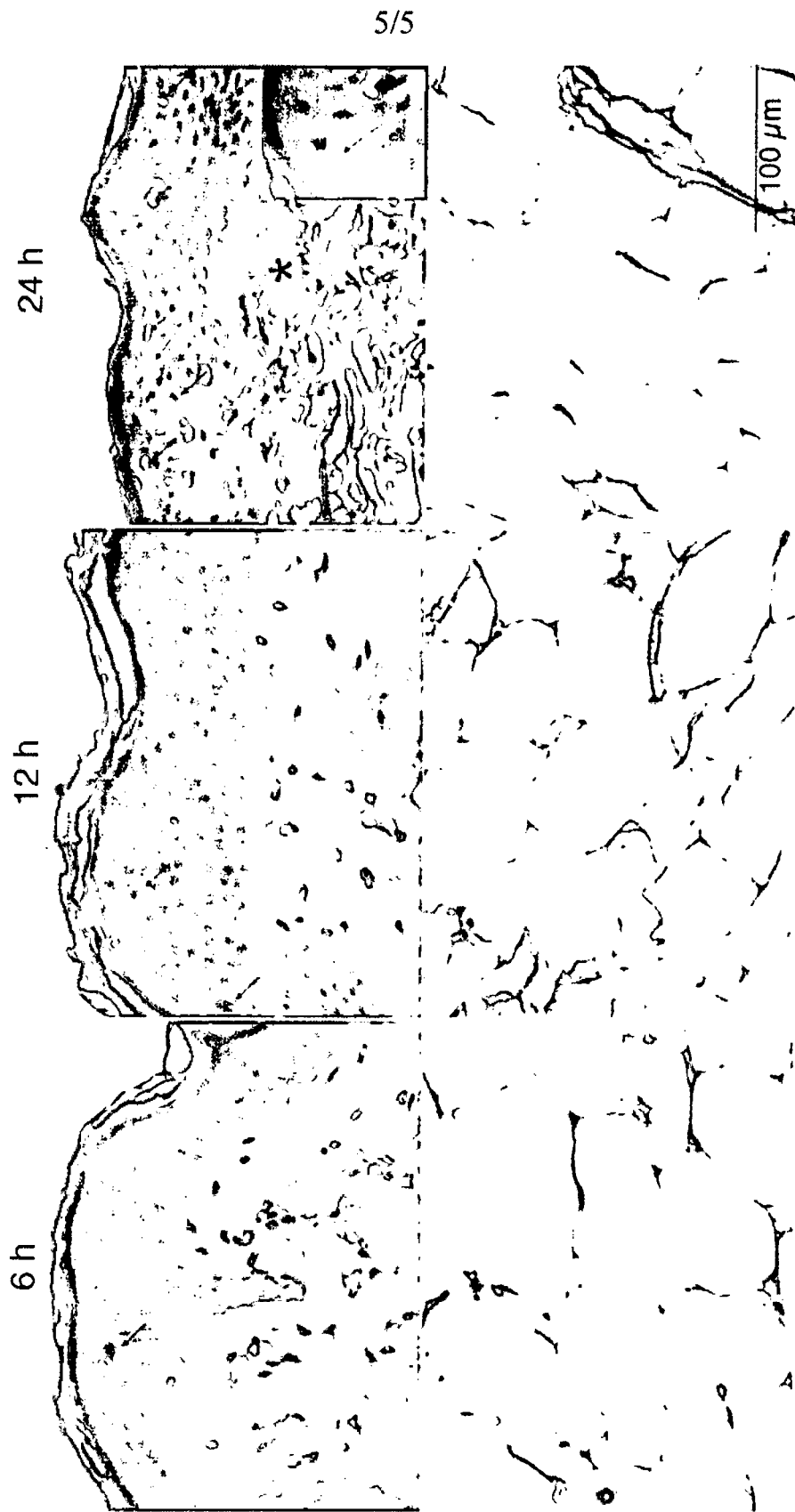


Figure 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/000061

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 5/071</i> (2010.01)i; <i>A61K 35/36</i> (2015.01)i; <i>A01N 1/02</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/50</i> (2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N; A61K; G01N; A01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013164436 A1 (GENOSKIN [FR]) 07 November 2013 (2013-11-07) cited in the application example 1	6
X	WO 2012059703 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; DESCARGUES PASCAL [FR]; SERRE GUY [FR]; S) 10 May 2012 (2012-05-10) the whole document	6
X	BART DE WEVER ET AL. "Human Skin Models for Research Applications in Pharmacology and Toxicology: Introducing NativeSkin , the "Missing Link" Bridging Cell Culture and/or Reconstructed Skin Models and Human Clinical Testing" <i>APPLIED IN VITRO TOXICOLOGY</i> , Vol. 1, No. 1, 01 March 2015 (2015-03-01), pages 26-32 DOI: 10.1089/aivt.2014.0010 ISSN: 2332-1512, XP055538973 figures 1, 2	6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 April 2019		Date of mailing of the international search report 23 April 2019
Name and mailing address of the ISA/EP European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Authorized officer Trommsdorff, Marion Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/000061

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GYEONG-HUN PARK ET AL. "Usefulness of Skin Explants for Histologic Analysis after Fractional Photothermolysis" <i>ANNALS OF DERMATOLOGY</i> , KR, Vol. 27, No. 3, 01 January 2015 (2015-01-01), page 283 DOI: 10.5021/ad.2015.27.3.283 ISSN: 1013-9087, XP055392804 figure 1	6
A	EP 3256568 A1 (GENOSKIN [FR]; CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENT [FR]; UNIVERSIT) 20 December 2017 (2017-12-20) cited in the application the whole document	1-10
A	LEBONVALLET N ET AL. "The evolution and use of skin explants: potential and limitations for dermatological research" <i>EUROPEAN JOURNAL OF DERMATOL.</i> , Vol. 20, No. 6, 01 November 2010 (2010-11-01), pages 1-14, [retrieved on 2010-09-07] ISSN: 1167-1122, XP009141240 the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2019/000061

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2013164436	A1	07 November 2013	CA	2872313	A1	07 November 2013
				EP	2882290	A1	17 June 2015
				FR	2990106	A1	08 November 2013
				US	2015132737	A1	14 May 2015
				WO	2013164436	A1	07 November 2013
WO	2012059703	A1	10 May 2012	FR	2967163	A1	11 May 2012
				WO	2012059703	A1	10 May 2012
EP	3256568	A1	20 December 2017	EP	3256568	A1	20 December 2017
				FR	3032446	A1	12 August 2016
				WO	2016128135	A1	18 August 2016

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2019/000061

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N5/071 A61K35/36 A01N1/02 G01N33/50 ADD.				
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB				
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N A61K G01N A01N				
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche				
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data				
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS				
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées		
X	WO 2013/164436 A1 (GENOSKIN [FR]) 7 novembre 2013 (2013-11-07) cité dans la demande exemple 1 -----	6		
X	WO 2012/059703 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; DESCARGUES PASCAL [FR]; SERRE GUY [FR]; S) 10 mai 2012 (2012-05-10) le document en entier ----- -/--	6		
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe			
* Catégories spéciales de documents cités:				
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets </td> </tr> </table>			"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets			
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <p style="text-align: center;">9 avril 2019</p>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <p style="text-align: center;">23/04/2019</p>		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <p style="text-align: center;">Trommsdorff, Marion</p>		

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>BART DE WEVER ET AL: "Human Skin Models for Research Applications in Pharmacology and Toxicology: Introducing NativeSkin , the "Missing Link" Bridging Cell Culture and/or Reconstructed Skin Models and Human Clinical Testing", APPLIED IN VITRO TOXICOLOGY, vol. 1, no. 1, 1 mars 2015 (2015-03-01), pages 26-32, XP055538973, ISSN: 2332-1512, DOI: 10.1089/aivt.2014.0010 figures 1, 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	6
X	<p>GYEONG-HUN PARK ET AL: "Usefulness of Skin Explants for Histologic Analysis after Fractional Photothermolysis", ANNALS OF DERMATOLOGY, vol. 27, no. 3, 1 janvier 2015 (2015-01-01), page 283, XP055392804, KR ISSN: 1013-9087, DOI: 10.5021/ad.2015.27.3.283 figure 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	6
A	<p>EP 3 256 568 A1 (GENOSKIN [FR]; CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENT [FR]; UNIVERSIT) 20 décembre 2017 (2017-12-20) cité dans la demande le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-10
A	<p>LEBONVALLET N ET AL: "The evolution and use of skin explants: potential and limitations for dermatological research", EUROPEAN JOURNAL OF DERMATOL., vol. 20, no. 6, 1 novembre 2010 (2010-11-01), pages 1-14, XP009141240, ISSN: 1167-1122 [extrait le 2010-09-07] le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2019/000061

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2013164436 A1	07-11-2013	CA 2872313 A1	07-11-2013
		EP 2882290 A1	17-06-2015
		FR 2990106 A1	08-11-2013
		US 2015132737 A1	14-05-2015
		WO 2013164436 A1	07-11-2013

WO 2012059703 A1	10-05-2012	FR 2967163 A1	11-05-2012
		WO 2012059703 A1	10-05-2012

EP 3256568 A1	20-12-2017	EP 3256568 A1	20-12-2017
		FR 3032446 A1	12-08-2016
		WO 2016128135 A1	18-08-2016
