

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 385**

21 Número de solicitud: 201530157

51 Int. Cl.:

A61K 8/97 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

10.02.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.08.2016

71 Solicitantes:

**PHYTURE BIOTECH, S.L. (100.0%)
C. Sant Gaietà, 121, 2º
08221 TERRASSA (Barcelona) ES**

72 Inventor/es:

**EXPÓSITO TARRÉS, Òscar;
JANÉ FONT, Albert;
LAPLANA LASIERRA, Sara y
MAS DUARTE, Maria**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

54 Título: **CULTIVOS CELULARES DE ALGODÓN Y SU USO EN FOTOPROTECCIÓN**

57 Resumen:

Cultivos celulares de algodón y su uso en fotoprotección.

La invención se refiere a un cultivo de células en suspensión de algodón (*Gossypium*) que es útil como agente fotoprotector de la piel y para la preparación de medicamentos. La invención también describe el procedimiento de obtención de este cultivo celular y composiciones cosméticas y farmacéuticas que lo comprenden.

ES 2 579 385 A1

DESCRIPCIÓN

Cultivos celulares de algodón y su uso en fotoprotección.

- 5 La invención se refiere a cultivos celulares de algodón (*Gossypium*). También se refiere a métodos especialmente diseñados para su obtención y a usos médicos y cosméticos de estos cultivos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10

Es altamente conocido que la piel supone la primera barrera de protección frente a agentes externos en la mayoría de animales. También es sabido que la piel debe a su vez protegerse de agentes externos con la finalidad de no comprometer su integridad y así no comprometer sus distintas funciones. Uno de estos agentes externos es precisamente la radiación solar (espectro ultravioleta, visible e infrarrojo), o cualquier tipo de radiación electromagnética que deba aplicarse por otras finalidades; por ejemplo, radiación ultravioleta UV para conseguir un bronceado de manera controlada o radiación infrarroja IR en caso de tratamientos por fisioterapia.

15

- 20 La fotoprotección de la piel mediante filtros solares o productos tópicos de uso diario se ha centrado básicamente en la prevención del daño agudo, como quemaduras, o crónico de la piel, como el cáncer o el fotoenvejecimiento, causados por la exposición a la radiación UV, básicamente UVA y UVB.

- 25 La radiación UVB (280-315 nm) es responsable de la mayoría de quemaduras aunque la radiación UVA (315-400 nm) también causa eritemas en menor extensión. Ambos tipos de radiaciones alteran el sistema inmune. La radiación UVB queda parcialmente filtrada por la capa de ozono, pero penetra en las capas superficiales de la piel hasta la capa basal de la epidermis. Es la causante de la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS), promoviendo la inflamación y el envejecimiento. La radiación UVB puede además ser absorbida por el ADN celular y causar lesiones mutagénicas. Por otro lado, la radiación UVA, menos energética que UVB pero en mayor proporción en el espectro de radiación solar (esta última, la radiación solar de 200 nm a 1 mm de longitud de onda) penetra más que la radiación UVB (UVA llega a niveles basales de la dermis); y es conocido que al generar ROS puede alterar también el ADN,

35

proteínas, y lípidos de la piel, lo que conlleva un envejecimiento de la misma y la formación de arrugas, e indirectamente incrementa el riesgo de sufrir cáncer.

En los últimos años ha podido constatarse que otras longitudes de onda de la radiación solar, más allá de las UV, en concreto el espectro de luz visible (alrededor del 40 % del espectro de radiación solar) y la radiación IR (más del 50 % aproximadamente del espectro de radiación solar) también causan daño en la piel y producen fotoenvejecimiento.

Según se desprende de la referencia Dupont et al. "Review Article Beyond UV radiation: A skin under challenge", International Journal of Cosmetic Science-2013, vol. No.: 35, pp.:224-232, la luz visible (de 400 a 700 nm) penetra profundamente en la dermis y un 20 % alcanza la hipodermis (Ver por ejemplo Figura 6 de esta referencia).

También del documento anterior se desprende que de entre los distintos tipos de radiación IR (IRA, IRB, IRC), la radiación IRA (30 % del espectro IR), alcanza en un 65 % la dermis y en un 10 % la hipodermis. IRA puede inducir un desequilibrio en la expresión génica de la metaloproteinasa 1 de la matriz extracelular (MMP-1), alterando la expresión y funcionalidad del colágeno. Con ello, IRA también está involucrada en el fotoenvejecimiento y puede promover la carcinogénesis. Se postula que la radiación IRA puede interaccionar con elementos de la cadena de transporte electrónico en las mitocondrias y de este modo producir un desequilibrio favoreciendo la aparición de ROS.

Si bien se conocen muchos compuestos y composiciones para el filtro de la radiación UV, pocas son las composiciones que también incluyen activos que puedan prevenir el daño que pueda causar la radiación IR o incluso la visible. Sin embargo, existen referencias que indican el efecto de ciertos antioxidantes tópicos como agentes fotoprotectores de la radiación IRA. Un ejemplo de ello lo encontramos descrito por Grether-Beck et al., "Review Article Photoprotection of human skin beyond ultraviolet radiation", Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine -2014, doi:10.1111/phpp.12111. Grether-Beck et al. indican que una combinación de vitamina C, ácido ferúlico y tocoferol llegaron a inhibir la expresión del ARN mensajero de la MMP-1 (metaloproteinasa de la matriz extracelular 1) inducida por la IRA en fibroblastos y en piel humana. El documento también comenta la necesidad de

localizar antioxidantes o compuestos que sean capaces de filtrar tanto la radiación UV como la IR.

5 Con la finalidad de proporcionar filtros solares lo más naturales posibles, efectivos y que comprendan solo mínimas cantidades de activos sintéticos, se han desarrollado distintos extractos de plantas que han demostrado ser capaces de prevenir el daño de radiación UV. Un ejemplo de ello se desprende del documento Mishra et al., "Review Article. Herbal Cosmeceuticals for Photoprotection from Ultraviolet B Radiation: A review", Tropical Journal of Pharmaceutical Research-2011, vol. No. 10(3), pp.: 351-10 360. Este documento lista extractos de plantas y componentes aislados de las mismas con capacidad de eliminar o prevenir los efectos de los radicales libres causados por la radiación UV en particular. De entre estas plantas se listan el tomate (*Solanum lycopersicum*), el ajo (*Allium sativum*), el Aloe vera, el azafrán (*Crocus sativus*) o la verdolaga (*Portulaca oleracea*), entre otras.

15

Se desprende de todo ello que a fecha de hoy son todavía necesarias nuevas composiciones para prevenir y/o tratar los efectos de la radiación solar, y en particular de sus distintos componentes, en especial la radiación UV y algunos componentes del espectro IR e incluso la luz visible.

20

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

Los inventores proponen un cultivo de células en suspensión de algodón (género *Gossypium*) que, sorprendentemente, actúa como filtro de la radiación solar, y en particular y muy eficazmente de la radiación IR. Además, el cultivo también es altamente efectivo frente a la radiación UV. Según se detallará en los ejemplos, el cultivo es un potente inhibidor de la expresión de la MMP-1, evitando así la degradación del colágeno y manteniendo la integridad de la piel. Su efecto es comparable al de la quercetina (un flavonol empleado en composiciones cosméticas como filtro de radiación) incluso a dosis más bajas. El algodón es una planta que crece en distintas partes del planeta. Algunas de sus especies se caracterizan, entre otras capacidades, por crecer en zonas áridas. Los inventores han desarrollado un cultivo celular reproducible que, sorprendentemente, es capaz de prevenir los efectos nocivos de la radiación solar con alta efectividad respecto de otros compuestos.

35

Así, en un primer aspecto la invención se refiere a un cultivo de células en suspensión de una planta del género *Gossypium*, caracterizado porque comprende:

- polifenoles a una concentración de 250 a 500 miligramos por litro de cultivo;
 - fitoesteroles a una concentración de 30 a 60 miligramos por litro de cultivo;
 - 5 - una mezcla de azúcares que comprende a su vez glucosa, fructosa, sacarosa, furanosa, arabitol y mioinositol
 - lípidos; y
 - proteínas.
- 10 La composición del cultivo, comprendiendo las cantidades de polifenoles y fitoesteroles, así como la presencia de lípidos, azúcares y proteínas supone una combinación sinérgica, de tal modo que es la suma de sus componentes y sus proporciones la que da lugar al efecto ventajoso en cuanto a la prevención de los efectos dañinos de la radiación. Además el cultivo supone la ventaja de evitarse la
- 15 metodología de obtención de activos vía extractos tradicionales de plantas y aporta muchos más componentes activos que estos extractos.

En el sentido de la invención debe entenderse por “cultivo de células en suspensión de algodón o del género *Gossypium*” a aquel grupo de células desdiferenciadas dispersadas o en suspensión en un medio líquido. La suspensión celular puede comprender células en varios estadios de agregación. Los cultivos de células en suspensión, también denominados cultivos o suspensiones celulares se inician generalmente a partir de callos friables (disgregables) en un medio de cultivo líquido y en agitación. Se introduce el callo en un recipiente (matraz) con medio de cultivo

20 líquido y se coloca en agitación varios días a 25 °C hasta obtener células libres. Seguidamente la suspensión se filtra (250 µm) y se añade a otro recipiente con medio de cultivo nuevo y se continúa la agitación. Por callo debe entenderse aquella masa de células desdiferenciadas, amorfa que se multiplica de manera desorganizada. Los callos suelen inducirse in vitro a partir de órganos vegetales (generalmente también

30 establecidos in vitro) a medios de cultivo adecuados que comprenden distintos reguladores del crecimiento vegetales.

El empleo de cultivos de células en suspensión de plantas conlleva la ventaja de disponer de factorías de compuestos de interés de una manera controlada y

35 reproducible una vez puesto a punto el sistema, que no es una tarea rutinaria. Así,

células aisladas de plantas se someten a desdiferenciación para obtener células totipotentes. Estas células totipotentes (también conocidas como células madre vegetales) pueden diferenciarse luego en el tejido de interés bajo la correcta estimulación, o bien llevarse a un estadio de producción de compuestos de interés.

5 Los cultivos en suspensión se emplean generalmente para la producción de metabolitos secundarios de la planta en cuestión y de especial interés en cosmética o en farmacia.

10 En una realización particular del cultivo, los polifenoles están en una concentración en peso de 200 a 400 mg/l de cultivo.

Entre los polifenoles presentes en el cultivo de células en suspensión de la invención se encuentran aquellos presentes en el algodón, tal como fenoles y flavonoides seleccionados de ácido gálico, catequinas, ácido gentísico, ácido cafeico, ácido 15 ferúlico, ácido cumárico, ácido salicílico, ácido cinámico, gosipetina, gosipetina glicosilada, glicósidos de kaempferol, glicósidos de herbacitina y mezclas de ellos. Sin quedar ligados a ninguna teoría, los inventores proponen que el cultivo comprende la cantidad total de polifenoles y dentro de este total una composición particular de ellos que, junto con el resto de componentes, confieren las propiedades frente la radiación 20 solar y en particular frente la radiación IR.

Asimismo, entre los fitoesteroles presentes en el cultivo de células en suspensión de algodón se encuentran, de manera particular, el lanosterol, el estigmaesterol y el β - 25 sitoesterol.

En otra realización particular, el cultivo está caracterizado porque la planta del género *Gossypium* se selecciona del grupo constituido por *Gossypium herbaceum*, *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium tomentosum*, y mezclas de los mismos. En una realización todavía más particular es 30 de *Gossypium herbaceum*.

La invención también tiene como segundo aspecto un procedimiento de obtención de un cultivo de células de una planta del género *Gossypium* en suspensión, que comprende las siguientes etapas:

35

(a) Cultivar células desdiferenciadas de la planta del género *Gossypium* en un medio de cultivo de crecimiento que comprende reguladores del crecimiento de plantas, dichos reguladores seleccionados del grupo constituido por las auxinas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (NAA) y las citoquininas quinetina, y 6-Benzilaminopurina (BAP) y mezclas de las mismas por un periodo de 5 a 10 días;

(b) añadir al cultivo de la etapa (a), de 2 a 4 veces, una composición o combinación elicitora, donde esta composición o combinación se selecciona cada vez que se adiciona de:

- una composición o combinación que comprende ciclodextrinas, y al menos un compuesto de jasmonato, donde el compuesto de jasmonato se selecciona del grupo constituido por jasmonato de metilo, jasmonato de etilo y jasmonato de propilo; y donde al final de las 2 a 4 veces de adición de la composición o combinación elicitora, las ciclodextrinas están a una concentración final en el cultivo de 18 a 72 g/l de cultivo y el compuesto de jasmonato está en una concentración final en el cultivo de 100 μM a 500 μM ; y

- una composición que comprende al menos un compuesto de jasmonato, seleccionado de jasmonato de metilo, jasmonato de etilo y jasmonato de propilo, donde al final de las 2 a 4 veces de adición de la composición elicitora, el compuesto de jasmonato está en una concentración final en el cultivo de 100 μM a 500 μM .

En una realización particular, opcionalmente en combinación con una o más realizaciones descritas arriba o a más abajo, el procedimiento se lleva a cabo a la oscuridad.

Por "medio de cultivo de crecimiento" debe entenderse un medio de cultivo adaptado para el cultivo de células en suspensión de plantas, de tal forma que puedan realizar todo su ciclo celular y dividirse hasta alcanzar un estadio estacionario, momento cuando tantas células mueren como células se dividen. Estos medios comprenden los nutrientes y sales minerales para el correcto crecimiento de las células, tal como azúcares y sales de sodio, potasio o calcio. Además, en función de lo que se pretenda con las células en suspensión pueden añadirse reguladores del crecimiento de plantas y vitaminas.

En otra realización particular, el medio de cultivo de crecimiento de la etapa (a) consiste en un medio de cultivo basal de células de plantas seleccionado del grupo formado por medio Murashige y Skoog (MS); LS Linsmaier y Skoog (LS) y Gamborg-
5 B5, donde a dicho medio basal se añaden para complementarlo reguladores del crecimiento de plantas (también conocidos como fitohormonas) y seleccionados del grupo constituido por las auxinas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (NAA) y las citoquininas quinetina, y 6-Benzilaminopurina (BAP) y mezclas de las mismas. El experto conoce estos medios basales y dispone de la
10 técnica para complementarlos con nutrientes y otros componentes de interés, según cual sea el objetivo del cultivo.

En una realización particular, opcionalmente en combinación con cualquier realización descrita más arriba o abajo, el medio de cultivo es el medio Murashige y Skoog (MS)
15 que además comprende los reguladores del crecimiento de plantas seleccionados del grupo constituido por las auxinas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (NAA) y las citoquininas quinetina, y 6-Benzilaminopurina (BAP) y mezclas de las mismas.

20 En otra realización particular, también opcionalmente en combinación con una o más realizaciones descritas arriba o a más abajo, el medio de cultivo comprende auxinas seleccionadas de aquellas indicadas anteriormente a una concentración de 1 a 4 mg por litro de cultivo (mg/l) de la etapa (a); y citoquininas seleccionadas de aquellas indicadas anteriormente a una concentración de 0.1 a 3 mg/ litro de cultivo. En otra
25 realización más particular el medio de cultivo comprende la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y la citoquinina quinetina a una concentración de 0.5 a 4 mg/ litro de cultivo y 0.1 a 3 mg/ litro de cultivo, respectivamente. Todavía en una realización más particular la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) está a una concentración inicial de 0.5 a 2 mg/l cultivo y la citoquinina quinetina a una
30 concentración de 0.1 a 2 mg/l.

En una realización todavía más particular, el medio de cultivo de la etapa (a) comprende 0.5 mg/ litro de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 0.1 mg/l de quinetina.

35

Se entiende además que las concentraciones de los integrantes de la composición o combinación elicitora de la etapa (b) se refieren a la cantidad que se añade en el cultivo de tal modo que, una vez añadido en función del número de veces, la concentración molar es la indicada o la concentración en peso/volumen es la indicada.

- 5 Se tratará además de una composición elicitora (estimuladora de síntesis de otros compuestos en la célula de la planta) si ambos componentes se añaden a la vez en una misma matriz (por ejemplo en medio basal), y por combinación elicitora si se añaden simultáneamente pero por separado o secuencialmente.
- 10 En una realización particular del procedimiento, la concentración del compuesto de jasmonato es de 200 a 450 μM . Más en particular de 300 a 450 μM . En otra realización todavía más particular el compuesto de jasmonato está en una concentración final en el cultivo de 450 μM .
- 15 Otra realización particular del procedimiento según la invención, opcionalmente en combinación con las otras realizaciones del procedimiento, comprende adicionar las ciclodextrinas a una concentración en el cultivo de 25 a 50 g/l (gramos por litro de cultivo), más en particular de 30 a 40 g/l; y todavía más en particular de 35 a 40 g/l.
- 20 En otra realización particular del procedimiento, éste está caracterizado porque la etapa (b) se lleva a cabo con tres adiciones de la composición o combinación elicitora.

En otra realización todavía más particular, el procedimiento está caracterizado porque la adición de la composición o combinación elicitora se lleva a cabo de acuerdo con el siguiente patrón de adición:

- 25 (i) añadir una primera dosis de la composición o combinación elicitora cuando el cultivo de la etapa (a) ha crecido de 5 a 10 días;
- (ii) añadir una segunda dosis de 3 a 4 días después de la primera dosis; y
- (iii) añadir una tercera dosis de 2 a 3 días después de la segunda dosis.

30

En otra realización todavía más particular, la adición de la composición o combinación elicitora se lleva a cabo de acuerdo con el siguiente patrón de adición:

- (i) añadir una primera dosis de una composición o combinación elicitora que comprende ciclodextrinas y un compuesto de jasmonato, cuando el cultivo de la etapa
- 35 (a) ha crecido de 5 a 10 días;

- (ii) añadir una segunda dosis de una composición que comprende un compuesto de jasmonato, de 3 a 4 días después de la primera dosis; y
- (iii) añadir una tercera dosis una composición que comprende un compuesto de jasmonato, de 2 a 3 días después de la segunda dosis.

5

En una realización todavía más particular, la adición de la composición o combinación elicitora se lleva a cabo de acuerdo con el siguiente patrón de adición:

- (i) añadir una primera dosis de una composición o combinación elicitora que comprende ciclodextrinas y un compuesto de jasmonato, cuando el cultivo de la etapa 10 (a) ha crecido de 5 a 10 días, donde al final de la adición las ciclodextrinas están a una concentración final en el cultivo de 18 a 72 g/l de cultivo y la concentración de compuesto de jasmonato es de 50 μ M;
- (ii) añadir una segunda dosis de una composición que comprende un compuesto de jasmonato, de 3 a 4 días después de la primera dosis, donde al final de la adición la 15 concentración de compuesto de jasmonato es de 50 μ M; y
- (iii) añadir una tercera dosis una composición que comprende un compuesto de jasmonato, de 2 a 3 días después de la segunda dosis, donde al final de la adición la concentración de compuesto de jasmonato es de 50 μ M.

20 Otra realización particular del procedimiento, opcionalmente en combinación con el resto de realizaciones particulares aquí listadas, se caracteriza porque la composición elicitora comprende jasmonato de metilo, preferentemente a una dosis o concentración final de 300 a 450 μ M una vez añadido de 2 a 4 veces.

25 En otra realización particular, también opcionalmente en combinación con el resto de realizaciones particulares aquí listadas, la composición elicitora que comprende ciclodextrinas comprende una ciclodextrina seleccionada de α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina o una mezcla de dos o más de ellas. Las ciclodextrinas tal cual se describen en esta invención incluyen también ciclodextrinas modificadas o 30 funcionalizadas con grupos hidroxilo, alquiladas (con C₁-C₄-alquilo lineales o ramificados, incluyendo -CH₃, -CH₂-CH₃,) o hidroxialquiladas, tal cual se conocen en el estado de la técnica.

El procedimiento según la invención está caracterizado también porque además 35 comprende la etapa (c) de lisar el cultivo celular obtenido en la etapa (b).

En una realización particular del procedimiento, la etapa (c) de lisado se lleva a cabo adicionando el cultivo obtenido en la etapa (b) a una solución líquida y homogeneizando la mezcla en un turrax a una velocidad de agitación de 15000
5 revoluciones por minuto (rpm) a 25000 rpm. En una realización todavía más particular, la proporción en peso de cultivo en la solución líquida es del 10 al 40 % en peso, más particularmente del 25 al 40 % en peso medido en gramos de cultivo por gramos de solución líquida. Más particularmente del 30 al 35 % en peso de cultivo de la etapa (b) en la solución líquida.

10

En otra realización particular, la solución líquida de la etapa (c) comprende glicerina y, opcionalmente conservantes y aditivos, preferentemente gluconolactonas, benzoatos (como el benzoato sódico) y gluconatos.

15 En otra realización particular, la etapa (c) de lisado comprende las etapas de:

- congelar y liofilizar el cultivo de la etapa (b);
- adicionar una composición sólida que comprende un compuesto seleccionado de maltodextrina, sorbitol, manitol y mezclas de dos o más de ellos; y
- homogeneizar la mezcla sólida.

20

La invención incluye por tanto también un cultivo de células en suspensión de una planta del género *Gossypium*, caracterizado porque es obtenible por el procedimiento según se ha descrito en una cualquiera de las variantes anteriores. Concretamente un cultivo en suspensión de células de una planta del género *Gossypium*,
25 preferentemente de la especie *Gossypium herbaceum*, obtenible mediante las siguientes etapas:

(a) Cultivar células desdiferenciadas de la planta del género *Gossypium* en un medio de cultivo de crecimiento que comprende reguladores del crecimiento de plantas, dichos reguladores seleccionados del grupo constituido por las auxinas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (NAA) y las citoquininas quinetina, y 6-Benzilaminopurina (BAP) y mezclas de las mismas por un periodo de 5 a 10 días;

30

(b) añadir al cultivo de la etapa (a), de 2 a 4 veces, una composición o combinación elicitora, donde esta composición o combinación se selecciona cada vez que se adiciona de:

- 5 - una composición o combinación que comprende ciclodextrinas, y al menos un compuesto de jasmonato, donde el compuesto de jasmonato se selecciona del grupo constituido por jasmonato de metilo, jasmonato de etilo y jasmonato de propilo; y donde al final de las 2 a 4 veces de adición de la composición o combinación elicitora, las ciclodextrinas están a una concentración final en el cultivo de 18 a 72 g/l de cultivo y el compuesto de jasmonato está en una concentración final en el cultivo de 100 μ M a 500 μ M; y
- 10
- 15 - una composición que comprende al menos un compuesto de jasmonato, seleccionado de jasmonato de metilo, jasmonato de etilo y jasmonato de propilo, donde al final de las 2 a 4 veces de adición de la composición elicitora, el compuesto de jasmonato está en una concentración final en el cultivo de 100 μ M a 500 μ M.

La invención también tiene como aspecto un lisado celular de un cultivo de células en suspensión de una planta del género *Gossypium*, caracterizado porque es obtenible por el procedimiento según se ha descrito antes, comprendiendo la etapa (c) de lisis del cultivo.

El experto reconocerá como proceder a la lisis de un cultivo celular, mediante la disgregación o disrupción de las células mecánicamente o mediante ultrasonidos. Con la lisis se consigue liberar el contenido del interior de las células en el medio, lo que da lugar a una mezcla particular que comprende componentes del citoplasma, de la membrana celular y de la pared celular.

Tanto el cultivo de células en suspensión de la invención, como un lisado del mismo pueden emplearse en composiciones tópicas, cosméticas o farmacéuticas, como agentes activos para prevenir los efectos nocivos o antiestéticos ocasionados por la radiación solar, y en particular la radiación IR. También se puede usar en forma de composición farmacéutica sólida, tal como en cápsulas o comprimidos que comprenden el cultivo o su forma lisada con los excipientes sólidos farmacéuticamente aceptables.

Así, otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas o cosméticas tópicas, caracterizadas porque comprenden una cantidad efectiva de un cultivo de células en suspensión de una planta del género *Gossypium*, según se describe más arriba, o una cantidad efectiva de un lisado según se define también más arriba, junto con uno o más excipientes o vehículos aceptables farmacéutica o cosméticamente.

La expresión “cantidad efectiva del cultivo o lisado celular” se refiere a la cantidad de éste que proporciona un efecto terapéutico o cosmético después de su aplicación sin producir irritación y a la vez suficientemente baja como para evitar efectos secundarios (a una relación beneficio/riesgo razonable). La cantidad efectiva puede variar con la edad y las condiciones físicas del usuario final, ya sea para un efecto terapéutico y en función de la enfermedad; o bien para un efecto cosmético.

La expresión “excipientes o vehículos aceptables farmacéuticamente” se refiere a materiales, composiciones o vehículos farmacéuticamente aceptables. Cada componente debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido que debe ser compatible con los otros ingredientes de la composición farmacéutica, a la vez que apto per uso en la piel (u otros tejidos) sin toxicidad excesiva o respuesta alérgica o inmunogénica. El término “cosméticamente aceptable” o “dermatológicamente aceptable” se refiere a excipientes o vehículos adaptados para emplearse en contacto con la piel humana sin excesiva toxicidad, incompatibilidad o alergenidad.

Es aceptado por la comunidad científica que los mecanismos desencadenados por el efecto de la radiación UV son distintos que los ocasionados por la radiación IR, dada la distinta longitud de onda de las radiaciones. Ello implica que los compuestos que eficientemente permiten filtrar o neutralizar un tipo de radiación, no tienen por qué resultar efectivos con el otro tipo de radiación electromagnética. Pero además, a ello se suma que la fisiopatología ocasionada por un tipo de radiación no es idéntica a la causada por la otra. Todo ello hace que, de entrada, no sean extrapolables los efectos fotoprotectores de una composición frente un tipo de radiación a otro tipo con una longitud de onda distinta y dando lugar a consecuencias en la salud o apariencia estética distintas.

35

En una realización particular, la composición farmacéutica o la composición cosmética está caracterizada porque además comprende glicerina como vehículo o excipiente aceptable, independientemente de poder comprender otros excipientes y/o vehículos. En otra realización particular, la composición comprende conservantes tal como compuestos de gluconolactona y compuestos de benzoato (p.ej. benzoato sódico) y aditivos como el gluconato cálcico u otros compuestos gluconatos.

En otra realización particular la concentración de polifenoles en estas composiciones farmacéuticas o cosméticas es de al menos 50 mg/l de composición, preferentemente de 50 a 100 mg/l.

La invención también tiene como aspecto composiciones farmacéuticas o cosméticas sólidas caracterizadas porque comprenden una cantidad efectiva de un cultivo de células en suspensión de una planta del género *Gossypium*, según se describe más arriba, o una cantidad efectiva de un lisado según se define también más arriba, junto con uno o más excipientes o vehículos sólidos aceptables farmacéutica o cosméticamente. Ejemplos no limitativos de excipientes o vehículos sólidos se refieren a maltodextrinas, sorbitol y manitol.

La invención también se refiere a composiciones nutracéuticas caracterizadas porque comprenden una cantidad efectiva de un cultivo de células en suspensión de una planta del género *Gossypium*, según se describe más arriba, o una cantidad efectiva de un lisado según se define también más arriba, junto con uno o más excipientes o vehículos sólidos aceptables.

25

Las composiciones nutracéuticas hacen referencia a todos aquellos alimentos, por tanto mezclas de varios ingredientes comestibles, que se proclaman como poseedores de un efecto beneficioso sobre la salud humana. Del mismo modo, puede decirse que el cultivo o lisado de la invención es como producto *per se* un agente nutracéutico, puesto que administrado en una composición alimentaria es uno de los activos que ejerce este efecto beneficioso sobre la salud, en particular el efecto de evitar el daño que podría ser ocasionado por la radiación solar o cualquiera de sus integrantes del espectro, en particular por la radiación IR, tal como se verá en los ejemplos.

30

Dados los efectos protectores del cultivo o lisados objetos de la invención, es también un aspecto de la misma el uso de un cultivo de células en suspensión de una planta del género *Gossypium*, o de un lisado celular del mismo según se define arriba, o de una composición farmacéutica tópica que los comprenda, para la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o condición causada por la exposición a radiación, seleccionada del grupo formado por radiación UV, radiación IR y una combinación de ambas, siendo una combinación de ambas, por ejemplo, la radiación solar.

10 En una realización particular el medicamento es para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o condición causada por la exposición a radiación infrarroja.

En otra realización particular, opcionalmente en combinación con cualquier realización anterior o posteriores, el uso está caracterizado porque la enfermedad o condición causada por la exposición a radiación se selecciona del grupo constituido por escozor y/o picor de la piel y/o del cuero cabelludo, envejecimiento precoz de la piel, quemaduras cutáneas por radiación, inflamación dérmica ocasionada por radiación, dermatitis atópica y cáncer cutáneo.

20 En otra realización particular el medicamento es para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o condición causada por la exposición a radiación UV. En otra realización particular, el medicamento es para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o condición causada por la exposición a radiación IR.

25 La invención también tiene por objeto el uso de un cultivo de células en suspensión de una planta del género *Gossypium* o de un lisado celular según se define arriba, o de una composición cosmética tópica según se define arriba, como agente fotoprotector de la piel y/o del cuero cabelludo. La fotoprotección de la piel comprende la mejora o prevención de al menos uno de estos síntomas en la piel: arrugas, picor, sequedad, eritema, manchas y envejecimiento. Por agente fotoprotector se entiende que es una entidad que posee la capacidad de proteger la piel y/o cuero cabelludo de los efectos adversos (patológicos o estéticos) que van asociados a la radiación, ya sea solar con todo su espectro o bien relativa a cada una de las radiaciones por separado (UV, IR, visible).

35

El efecto cosmético del cultivo, lisado o composiciones que los comprenden se refiere a la protección de la piel cuando ésta no puede considerarse que está enferma (o tenga alguna patología), sino más bien que se desea preservar o mejorar su apariencia externa sin que por ello haya habido ningún daño o patología. Son efectos
 5 cosméticos derivados de la fotoprotección del cultivo celular, lisado o cualquier composición que los comprenda, el efecto reconfortante (también conocido como calmante), el efecto regenerador antiarrugas, la prevención de arrugas, la prevención o mejora de eritemas y/o eczemas, la fotoregeneración dérmica y epidérmica, la fotoreparación, y el efecto antioxidante en el sentido que se previene o se amortigua la
 10 aparición de radicales libres (ROS) que empeoran el aspecto de la piel y/o cuero cabelludo. El efecto cosmético será una combinación de los mencionados anteriormente en función de cual sea el estado de la piel y/o cuero cabelludo donde se aplique.

15 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Además, la palabra "comprende" incluye el caso "consiste en". Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los
 20 siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25

FIG. 1 se corresponde con la producción de MMP-1 (pg/ml) en un cultivo de fibroblastos dérmicos humanos (HDF) después de la exposición a radiación IR a una intensidad de 150 J/cm² (columna del medio) y de 300 J/cm² (columna de la derecha en cada tipo de muestra ensayada), o bien sin exponerlos a radiación (columna de la
 30 izquierda en cada tipo de muestra ensayada). La lámpara utilizada fue el modelo IR Philips BR125 Infrared lamp hard glass Red (250 W, 230 V). Las muestras se correspondían con cultivos de fibroblastos no tratados (NT), tratados con Quercetina (Qu) 25 µM, con ácido ascórbico (Asc) a 10 µM, o bien con distintas concentraciones de un lisado de un cultivo de células en suspensión de algodón de Arabia (Cott) a 23
 35 µg/ml (masa de células lisadas en volumen de glicerina), 45.6 µg/ml y 91 µg/ml. La

cantidad de MMP-1 en pg/ml se midió de acuerdo con un ensayo ELISA específico.

La FIG. 2 muestra el resultado del mismo ensayo que en la FIG. 1 pero se expresa la cantidad de MMP-1 detectada en cada tipo de muestra en porcentaje (%). El % se
 5 calcula considerando como el 100 % el de fibroblastos no tratados (NT) y no expuestos a radiación (primera columna izquierda de NT). Las abreviaciones significan lo mismo que en la FIG. 1. La columna del medio de cada muestra se corresponde con la irradiación IR a 150 J/cm^2 (columna del medio), mientras que la columna de la derecha en cada tipo de muestra ensayada a una intensidad de 300 J/cm^2 (columna
 10 de la derecha).

La FIG. 3 se corresponde con otro ensayo en un cultivo de fibroblastos dérmicos humanos (HDF). Se compara el índice MFI (intensidad de fluorescencia media) en los fibroblastos antes (columna izquierda en cada muestra) y después de la irradiación
 15 con IR a 200 J/cm^2 (columna derecha en cada muestra). En el eje de las abscisas se muestran las distintas concentraciones y productos testados en los cultivos. NT, significa no tratados; Qu (con quercetina); Asc con Ácido ascórbico (a 10 y $50 \mu\text{M}$) y Cott con el cultivo de células en suspensión de algodón ($23 \mu\text{g/ml}$ de lisado en glicerina, $45.6 \mu\text{g/ml}$, y $91 \mu\text{g/ml}$)

20

La FIG. 4 muestra la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (factor de incremento de producción ROS intracelular) en los cultivos de fibroblastos de la FIG. 3 después de irradiación con IR (200 J/cm^2).

25 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Obtención del cultivo celular

Para la obtención del cultivo de células en suspensión se partió de cultivos de
 30 *Gossypium herbaceum* crecidos 7 días en agitación constante (de 90 a 110 rpm) en la oscuridad y a temperatura ambiente. Antes de iniciar el tratamiento con la composición elicitora se confirmó que como mínimo había $500 \pm 50 \text{ ml}$ de células por cada litro volumen final de cultivo. El medio basal de cultivo fue el medio MS complementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (2 g/l), y quinetina (1 g/l).

35

Seguidamente, se procedió a la elicitación con una composición elicitora que comprendía ciclodextrinas (referencia 121877 de Wacker) a una concentración final en el cultivo 50 g/l; y jasmonato de metilo (referencia 392707 de Sigma) a una concentración final en el cultivo de 50 μ M. Los cultivos se dejaron en agitación (de 90
5 a 110 rpm) y a la oscuridad a una temperatura ambiente de 25 °C. Transcurridos 3 días desde la primera elicitación se procedió a una segunda elicitación con jasmonato de metilo a 50 μ M. Las condiciones de agitación, oscuridad y temperatura se mantuvieron también constantes. A los dos días de la segunda elicitación se repitió el esquema elicitando de nuevo con jasmonato de metilo 50 μ M, de tal modo que la
10 concentración final de jasmonato des de la primera elicitación es de 150 μ M. Se dejó dos días más en agitación y a la oscuridad.

Seguidamente se procedió al análisis de fenoles y flavonoides mediante espectrofotometría (Espectrofotómetro UV-visible marca Agilent Technologies/ modelo
15 Agilent 8453/ nº serie0000338-02-01). Para ello se emplearon 10 ml de la muestra. Se comprobó que la muestra para análisis tenía una concentración celular de 500 \pm 50 ml de células en 1 l de volumen final de cultivo. El mismo muestreo se utilizó para mandar una muestra para análisis microbiológico.

20 La cuantificación de fenoles y flavonoides se realizó mediante extracción previa de los mismos del cultivo y seguido de su cuantificación. Para ello se siguieron los protocolos descritos en la Monografía oficial de Farmacopea Europea (Ph Eur) de Herbal Drugs (European Pharmacopoeia 8.0) Markham, Andersen, páginas 1205-1206; y en la metodología descrita en Marinova D et al., "TOTAL PHENOLICS AND TOTAL
25 FLAVONOIDS IN BULGARIAN FRUITS AND VEGETABLES", Journal of University of Chemical Technology and Metallurgy -2005, Vol. No. 40 (3), pp.: 255-260.

Los resultados del análisis de polifenoles aparecen en la Tabla 1.

30 El producto se formuló con glicerina (glicerinado) y se procedió al lisado de las células de algodón con un dispositivo Ultraturrax T-25 Basic. Herramienta de dispersión, modelo S 25 N – 25 G (Fabricante IKA), el control del lisado se realizó por observación con microscopio binocular BIOLUX-12 (marca KYOWA). Para ello, se adicionó glicerina (69%), cultivo celular (30%) y conservante Geogard™ ultra (1%), en
35 un recipiente de acero inoxidable. Otros conservantes que el experto conocerá son

también apropiados. Se colocó en baño de hielo con el objetivo de no superar los 30° durante el proceso y se dispersó hasta la completa disolución del conservante y hasta observar una rotura celular apropiada.

- 5 La composición cualitativa y cuantitativa del cultivo, en cuanto a polifenoles y otros componentes, aparece en la Tabla 1. En la Tabla 2 se detalla la composición en el producto final glicerinado.

Tabla 1.

10

Activo	Método analítico	Rango concentración	de Activos identificados
Contenido proteínas	en Bradford	700-1200 mg/L	Proteína total
Contenido lípidos	en Cromatografía capa fina	Determinación cualitativa (visual)	Fitosteroles
			Triglicéridos
			ac. grassos libres
	Cromatografía de Gases i Espectrometría de Masas (GC-MS) ¹	Identificación cualitativa	Ácido esteárico
			Monopalmitina
			Monoestearina
Cuantificación fitosteroles	GC-MS ¹	30-60 mg/L	Stigmasterol
			β -Sitosterol
			Lanosterol
Contenido azúcares	en GC-MS ¹	Identificación cualitativa	D-fructosa
			Ácido 2-keto-D-glucónico
			6-deoxy- β-L-manofuranosa
			α-D-glucopiranososa
			Arabitol
			Mioinositol
Polifenoles	Colorimetría Espectrofotómetro UV-visible (método según indicado arriba)	250-500 mg/L	Polifenoles totales

¹Las condiciones cromatográficas GC-MS fueron las siguientes: Volumen de inyección: 1µL; Columna: Zebron ZB5MS 30m x 0.25 mm x 0.25µm; Programa de temperaturas: Temperatura inicial de 40°C mantenida 1 minuto, rampa de temperaturas de 10°C/min, temperatura final de 320°C mantenida 15 minutos; Gas portador: He a velocidad lineal constante de 36cm/seg; Relación de split:

15

1:50; Temperatura de inyector: 320°C; Temperatura de interfase: 280°C Detección: SCAN de m/z 41 a m/z 600. Intervalo de SCAN 0,5 segundos.

5 Tabla 2. Composición y datos físico-químicos del producto formulado en glicerina

Ensayo	Datos	Método
Examen organoléptico		
Apariencia	Suspensión viscosa de lisado celular	
Color	Marrón-marrón oscuro	
Parámetros físico-químicos		
pH	4-5.5	
Densidad	1.10-1.30 g/ml	Picnómetro
polifenoles	≥ 50 mg/l	
Parámetros microbiológicos		
Total aeróbicos	< 100 cfu/g	
HonGos y levaduras	< 10 cfu/g	
Gérmes patógenos		Farmacopea europea 8.0 2.6.12. Microbial enumeration tests, páginas 185 a 194.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia en 1 g	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia en 1 g	
OTROS componentes	Fitosteroles (estigmasterol, β-sitosterol, lanosterol) Lípidos (monoglicéridos, triglicéridos, ácidos grasos libres,) Azúcares (glucosa, fructosa, sucrosa, furanosa, arabitol, mioinositol) Proteínas (ensayo Bradford)	GC-MS (según se detalla para Tabla 1)

Ejemplo 2. Efecto inhibitor de la expresión de la enzima MMP-1 (encargada de la degradación de colágenos de la matriz extracelular) del lisado celular según la invención.

5

En la FIG. 1 se detalla la producción de la enzima MMP-1 (pg/ml) en un cultivo de fibroblastos dérmicos humanos (obtenidos de muestras de piel humana-operaciones de fimosis 0-3 años), cultivados y expandidos en medio de cultivo Dulbecco's 1g/l glucosa (Dulbeco's Modified Eagle's Medium 1g/L glucose, Lonza BioWhitaker) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (FCS, Labclinics), 2 mM L-glutamina (Lonza) y antibióticos (10µg/ml Penicilina 100 U/ml Estreptomicina, Lonza). Los fibroblastos fueron expuestos a radiación IR con una lámpara IR Philips BR125 Infrared lamp hard glass Red (250 W, 230 V). Esta lámpara acoge en su espectro de emisión la región IR al completo, con un pico pronunciado a la longitud de onda de 1000 nm en la región IRA.

La cantidad de MMP-1 se midió mediante ensayo ELISA específico (ELISA plate reader, Multiskan Ascent (Labsystems- Perseptive Biosystems)) a partir de los sobrenadantes de los cultivos de los fibroblastos previamente expuestos a radiación (de 24 a 48 h de exposición) y en presencia de distintas dosis de lisado de células de algodón o controles. La recolección de los sobrenadantes se hizo de 20 a 24 horas después de la irradiación.

Los cultivos de fibroblastos se sembraron en 24 pocillos hasta confluencia. Se trataron con los distintos activos (distintas concentraciones del lisado celular en glicerina de la invención, en concreto, 23 µg/ml, 45.6 µg/ml, 91 µg/ml; o con quercetina y ácido ascórbico como controles positivo. El blanco fueron células no tratadas (NT))

Para la obtención de las distintas concentraciones de lisado celular (también denominada aquí biomasa activa) en glicerina se realizaron las diluciones del lisado al 30 % en peso inicial de biomasa en glicerina, según se detalla a continuación. Se resaltan en **negrita** las concentraciones ensayadas en los cultivos de fibroblastos. La dilución se hizo con glicerina.

35

Relación de la muestra original lisado celular de <i>Gossypium herbaceum</i> en glicerina (%)	30
Densidad muestra (g/ml)	1,21
Concentración real de la biomasa (lisado) en muestra (g/ml):	0,363

	Dilución de la muestra M06413 evaluada (veces):	Concentración biomasa evaluada (%):	Concentración biomasa evaluada (mg/ml):
Dilución 1/500	500	0,06	0,73
Dilución 1/1000	1000	0,03	0,36
Dilución 1/2000	2000	0,015	0,18
Dilución 1/4000	4000	0,0075	0,09
Dilución 1/8000	8000	0,0038	0,045
Dilución 1/16000	16000	0,0019	0,023

- 5 De la FIG. 1 se desprende que la presencia del lisado celular a las concentraciones indicadas y obtenido según se describe en el Ejemplo 1 en los cultivos de fibroblastos, es capaz de reducir los niveles de expresión de esta enzima encargada de la degradación del colágeno tipo 1. Aunque a mayor intensidad de radiación IR (300 J/cm², columna de la derecha en cada tipo de muestra ensayada) la expresión era
- 10 mayor que a una intensidad menor de irradiación (intensidad de 150 J/cm², columna del medio), los fibroblastos a los que se habían añadido distintas concentraciones del lisado celular de la invención mostraron todos un nivel de expresión menor que en las células no tratadas (NT). Además, el nivel de expresión era similar al de la quercetina (25µM), un antioxidante generalmente empleado como control. Nótese que incluso a
- 15 mucha menor concentración de activo (lisado celular), el efecto es mayor al de los activos de referencia quercetina y ácido ascórbico.

Por otro lado, los mismos datos de la FIG. 1 se expresan en cantidad en porcentaje (%) de MMP-1 detectada en cada tipo de muestra en la FIG. 2. El % se calcula

20 considerando como el 100 % el de fibroblastos no tratados (NT) y no expuestos a

radiación (primera columna izquierda de NT). Se ve claramente que la expresión de MMP-1 es similar al del grupo con quercetina y claramente significativamente menor que en los fibroblastos no tratados.

- 5 En otro ensayo se valoró la actividad inhibitoria del lisado celular en glicerina en la producción de sustancias reactivas de oxígeno (ROS), ocasionada por el efecto de la radiación IR a 200 J/cm², aportada por la misma lámpara que en el ensayo anterior. Los resultados se muestran en las FIGs. 3 y 4.
- 10 Para ello, los cultivos de fibroblastos se prepararon de la misma manera (placa de cultivo formato 96 pocillos) y se sometieron a radiación pero sin ningún activo añadido (células NT de no tratadas) o en presencia de lisado celular en glicerina a las concentraciones antes indicadas. También como control positivo se empleó quercetina (25 µM) y Ácido ascórbico (concentraciones 10 y 50 µM). El lisado celular y los activos
- 15 de los distintos controles se añadieron 24 horas antes de irradiar.

En este ensayo, la velocidad de producción de especies reactivas de oxígeno se determinó mediante la sonda específica Carboxy-H₂DCFDA (Molecular Probes). Esta sonda difunde al interior de las células (fibroblastos) y se mantiene en estado no

20 fluorescente. Bajo estrés (irradiación) los grupos acetato de esta sonda son eliminados por acción de las esterasas intracelulares, dando lugar a su forma fluorescente, concediéndole además cargas negativas que impiden su salida de las células. Tras la irradiación se midieron por tanto los niveles de ROS de manera indirecta mediante fluorimetría (Fluororoskan Ascent CF (Thermolabsystems)), puesto

25 que son directamente proporcionales a la fluorescencia emitida por la sonda.

Como se indicaba antes, los datos de este ensayo aparecen ilustrados en las FIGs. 3 y 4. En la FIG. 3 se muestran los valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y a una longitud de onda de emisión de

30 527 nm. Aunque en todas las muestras la radiación con IR produjo una elevación del MFI respecto de las muestras no irradiadas, el valor absoluto de MFI era siempre menor que en la muestra de fibroblastos no tratados (NT). Ello da muestra del potencial del lisado de acuerdo con la invención como agente fotoprotector de la piel en relación a la radiación IR. La FIG. 4, por otro lado, muestra el análisis de las ROS

35 detectadas en cada muestra. Las muestras tratadas con el lisado de células de

algodón mostraron un efecto protector con niveles de ROS significativamente menores que en los fibroblastos no tratados. Nótese de nuevo que a menor concentración que los controles positivos (quercetina y ácido ascórbico), el cultivo celular (lisado en glicerina) protegía igual o incluso más que estos últimos. Ello prueba que la
5 composición del lisado es tal que sus componentes actúan de manera sinérgica, pudiéndose emplear dosis muy bajas para tener un efecto protector considerable.

Los datos obtenidos con los ensayos con radiación IR demuestran que con un ingrediente de obtención asequible y reproducible, y a la vez siendo un producto
10 natural, el efecto protector de la radiación es comparable o incluso mejor que aquellos compuestos actualmente utilizados para ello.

Ejemplo 3. Efecto de la radiación UV en fibroblastos humanos tratado con los cultivos de células en suspensión de la invención.

15

Con la finalidad de evaluar si el lisado celular o el cultivo de células de algodón en suspensión era también activo frente a los mecanismos fisiológicos que provoca en la piel la radiación UV, se realizaron también ensayos relativos a la capacidad protectora frente al estrés oxidativo producido por radiación UV en células de la piel; ensayos
20 relativos a la capacidad protectora frente la degradación de las proteínas de la matriz extracelular inducida por UV (colágenos del tipo I y III y elastina); ensayos relativos a la capacidad regeneradora mediante la estimulación de la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular (colágenos del tipo I y III y elastina); y ensayos relativos a la modulación del patrón de citoquinas implicadas en los procesos de inflamación de la
25 piel inducida por UV.

Del mismo modo que para los ensayos con IR, se emplearon distintas concentraciones de un lisado celular de células de algodón, obtenidas por dilución acumulada de una composición del lisado inicialmente al 30 % en peso en matriz de glicerina.

30

Estas muestras se añadieron en cultivos de fibroblastos dérmicos humanos como en el Ejemplo 2 anterior.

En esta ocasión la irradiación se llevó a cabo con la lámpara SOL500 (Dr. HÖNLE),
35 Ref. 19671. Serial nº 0298 SOL 500 es un sistema de radiación que simula la luz

natural del sol. Está compuesta por una lámpara halógena de alta presión (Halogenide high-pressure SOL 500 S lamp) en una unidad de balasto (Ballast unit), y un disco filtrante (H-filter) el cual bloquea parcialmente la radiación UVB. La radiación emitida por el sistema está dentro del rango de longitud de onda de 300-2500 nm (UVB-UVA-
5 VS-IR). Esta configuración permite la emisión de un espectro similar al de la luz del sol, que comprende luz UV (UVA principalmente, y un 17,3% de luz UVB), luz visible e infrarroja.

3.1. Capacidad de inhibir la aparición de ROS

10

Para evaluar la capacidad de inhibir la aparición de ROS, se utilizó el indicador general de estrés oxidativo carboxi-H₂DCFDA (Molecular Probes) como en el ejemplo 2.

Los fibroblastos dérmicos humanos (HDF) se sembraron en placas de cultivo de 96
15 pocillos y se mantuvieron en crecimiento (37 ° C, 5% CO₂) hasta su confluencia. Luego, las células fueron pre-tratadas con diferentes concentraciones de lisado celular de células de algodón en glicerina durante 24 h. Como un control de producción basal de ROS, las células se mantuvieron en medio de cultivo durante el pretratamiento. Se utilizaron células tratadas con quercetina (25µM) como controles positivos. Cada
20 condición experimental se evaluó por triplicado. Después del pretratamiento, se retiraron las soluciones de ensayo, y los cultivos se lavaron 2 veces con solución de Hank tamponada de sal (HBSS) para su eliminación completa. Se añadió nueva solución HBSS a los pozos antes de su exposición al sol. Las células fueron irradiados con la lámpara a intensidad de 12J/cm². En paralelo, una placa de cultivo de control
25 no fue expuesta a la radiación solar. Entonces, el colorante carboxi-H₂DCFDA se aplicó sobre las células y se incubaron a 37 ° C durante 30 min. Cuando terminó, se midió la fluorescencia y se registró en el fluorímetro como en el ejemplo 2. Se calcularon las unidades de fluorescencia media relativa (MRFU) y desviación estándar (SD) para cada condición experimental. Los valores de MRFU son directamente
30 proporcionales a la cantidad de ROS intracelular producida. La Tabla 3 muestra los resultados (disminución en % de ROS respecto de las ROS en células no tratadas):

35

Tabla 3:

		Análisis comparativo vs células no tratadas		Análisis comparativo vs células irradiadas	
		Incremento	S.D.	Porcentaje medio (%)	S.D.
Control colorante		0,377	0,003	1,616	0,013
Células no tratadas		23,315	1,439	100,000	6,173
Quercetina 25 μ M		14,627	1,650	62,735	7,079
% lisado celular en ensayo	1,9 \cdot 10 ⁻³ % (0.023 mg/ml)	16,332	1,400	70,049	6,006
	3,75 \cdot 10 ⁻³ % (0.045 mg/ml)	15,894	1,186	68,170	5,085
	7,5 \cdot 10 ⁻³ % (0.091 mg/ml)	15,077	1,346	64,667	5,774

- 5 Como se muestra en la Tabla 3, después de 12J/ cm² de radiación UV, los fibroblastos aumentaron la producción de ROS intracelular (23,315 \pm 1,44 aumentos) en comparación con la producción de la línea de base (no UV). La quercetina, como control positivo en este ensayo, muestra una importante acción antioxidante con un potente efecto inhibitor de la producción de ROS intracelular inducida por UV en HDF
- 10 (inhibición de 37,3 \pm 7,08% con respecto al control basal). La eficacia antioxidante de los productos se definió como el porcentaje de reducción de la producción de ROS en el pre-tratamiento de los fibroblastos con respecto a la producción observada cuando los fibroblastos no se trataban.
- 15 Los fibroblastos (HDF) tratados con el lisado celular de acuerdo con la invención muestran un nivel de producción de ROS de 30,21 \pm 7,23%, 33,07 \pm 8,18, y 35 052 \pm 9,9 %, inferior a la observada en HDF sin tratar, a concentraciones de 0,023, 0,045, y 0,091 mg / ml, respectivamente. Estos resultados demuestran la potente acción protectora del lisado. Tomando de base estos resultados obtenidos con el lisado,
- 20 queda demostrada su potente acción antioxidante. El pretratamiento con 0,023, 0,045 y 0,091 mg / ml de lisado celular de células de algodón condujo a una reducción de los niveles de ROS en HDF del 29.951 \pm 6%, 31,830 \pm 5,08, 35,33 \pm 5,77%,

respectivamente. Estos valores salen de restar al 100 % los valores de la Tabla 3 70.049, 68.170 y 64.667, respectivamente)

5 3.2. Capacidad protectora del lisado de la invención contra la degradación proteínas de la matriz extracelular (ECM)

10 La capacidad protectora del lisado de la invención contra la degradación de proteínas de matriz extracelular causada por la radiación solar fue evaluada sobre la base de la cuantificación de colágenos tipo I y tipo III en los HDF pretratados y expuestos a la radiación solar, por medio de análisis inmunocitoquímico. Para ello los fibroblastos se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos y se mantuvieron en el crecimiento (37 ° C, 5% CO₂) hasta confluencia (72-96h después de la siembra celular). Luego, las células fueron pre-tratamiento con diferentes concentraciones de algodón de Arabia (*Gossypium herbaceum*) durante 24 h. Las células no tratadas y células tratadas con 15 quercetina 25 µM se utilizaron como un control basal y el control positivo, respectivamente. Después del pretratamiento, se retiraron las soluciones de ensayo y las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada de Hank (HBSS). Para el proceso de irradiación, se añadió nueva solución de HBSS en la célula pocillos de cultivo y las células fueron expuestas a una dosis de radiación de 40 J / cm², con la 20 lámpara SOL 500. En paralelo placas de cultivo de HDF se evaluaron en las mismas condiciones experimentales y tratamientos y controles sin estar expuestos a la radiación solar.

25 Inmediatamente después de la irradiación, la solución de HBSS se eliminó de los cultivos y se añadió nuevo medio de cultivo con baja concentración de FCS (1%). Los cultivos se mantuvieron en incubación durante 24 h adicionales. Después de este período, las células se lavaron y se fijaron con para-formaldehído para la cuantificación de colágeno de tipo I y tipo III presente en la matriz extracelular de tratados y se irradiaron HDF por análisis inmunocitoquímico. La detección de estas proteínas de la 30 matriz se realizó por la técnica de inmunocitoquímica mediante ELISA. Para este análisis, se utilizaron los anticuerpos humanos primarios específicos contra ambas proteínas (anticuerpo monoclonal anti- colágeno de tipo I humano de Sigma, anticuerpo monoclonal anti- colágeno de tipo III humano de MP Biomedicals y anticuerpo monoclonal anti-elastina humana de Sigma), seguido por el anticuerpo 35 secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y la incubación con su

5 sustrato, o-fenilendiamina, en tampón de urea H₂O₂. Al final de la reacción de HRP, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (492 nm). Los cultivos que se incubaron con el anticuerpo secundario solamente se utilizaron como controles para la unión de anticuerpo no específica. Los valores obtenidos en estos pocillos de control se restaron de los pocillos de ensayo. Los valores de absorbancia son proporcionales a la cantidad de proteína presente en la matriz extracelular de los cultivos de HDF evaluados.

10 Aunque no se muestran los datos se detectó una reducción significativa en la cantidad de proteínas de la matriz extracelular (ECM) en los fibroblastos inducidos por UV en comparación con los no irradiados. La reducción de colágeno de tipo I, colágeno de tipo III y elastina fue de $58,97 \pm 8,14\%$, $47,91 \pm 8,11\%$ y $62,47 \pm 4,42\%$, respectivamente, en HDF expuestos a 40 J/cm² de UV con respecto a los no irradiados. Esta reducción en los niveles de proteínas ECM fue ligeramente inferior en
15 los fibroblastos tratados con quercetina después de UV-exposición (reducción de $46,78 \pm 6,91\%$, $25,03 \pm 8,08\%$ y $49,15 \pm 10,17\%$ en colágeno de tipo I, colágeno de tipo III y elastina, respectivamente). Estos resultados apoyan el efecto protector de la quercetina contra la degradación foto-inducida de proteínas ECM.

20 El efecto protector del lisado de la invención fue mayor que la mostrada por la quercetina. Los valores de reducción de colágeno tipo I en HDF pre-tratados con lisado en comparación con los no irradiados fue de $36,59 \pm 7,72\%$, $37,81 \pm 4,62\%$ y $32,95 \pm 7,25\%$ para el 0.091, 0.182 y 0.363 mg / ml de concentración de lisado, respectivamente. En consecuencia, HDF tratados con 0,091, 0,182 y 0,363 mg / ml de
25 lisado tenían un $54,55 \pm 4,18\%$, $51,58 \pm 11,26\%$ y $63,41 \pm 17,67\%$ más de colágeno de tipo I en su matriz extracelular, que los fibroblastos no tratados.

El lisado también mostró un efecto protector del colágeno de tipo III y la elastina. Los fibroblastos tratados con 0.091, 0,182 y 0,363 mg / ml de lisado tenían un $44,46 \pm$
30 $23,43\%$, $53,13 \pm 22,2\%$ y $61,02 \pm 17,8\%$ más de colágeno de tipo III y $59,18 \pm 11,045\%$, $58,58 \pm 1,12\%$ y $43,46 \pm 29,01\%$ más de elastina en matriz extracelular respecto de los fibroblastos no tratados.

3.3. Producción de proteínas de la matriz extracelular (ECM)

35

La producción de proteínas de ECM se evaluó con el fin de medir la firmeza de la piel, la elasticidad y los efectos anti-envejecimiento del lisado. Se analizaron los colágenos fibrilares (colágenos tipo I y tipo III) y la producción de elastina mediante el método inmunocitoquímico anterior. Para ello, se sembraron células HDF en placas de cultivo

5 de 96 pocillos y se mantuvieron en condiciones de crecimiento (medio de crecimiento, 37 ° C, 5% de CO₂) hasta 75-80% de confluencia. Luego, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de lisado durante 72 h (tiempo necesario para la síntesis, procesamiento y la inserción de las proteínas seleccionadas en la matriz extracelular). Las células no tratadas se utilizaron como control negativo. Como control

10 positivo, las células fueron incubadas con 10 ng/ml de factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF-β1), un agente inductor conocido de la síntesis de proteínas ECM en HDF. Cada condición experimental se evaluó por triplicado. Al final del tratamiento de células, los cultivos se lavaron con HBSS y se fijaron con paraformaldehído para el análisis de colágeno tipo I y tipo III y el contenido de elastina

15 en la matriz extracelular de las células tratadas. La absorbancia de los cultivos de ensayo se midió en un espectrofotómetro a 492 nm. Valores de absorbancia obtenidos son directamente proporcionales a la cantidad de la proteína detectada en el ECM de la cultura HDF. Los cultivos que se incubaron con el anticuerpo secundario solo se utilizaron como controles para la unión de anticuerpos inespecíficos y sus valores de

20 absorbancia se restaron de los pocillos de ensayo. Los resultados obtenidos en las células tratadas con el lisado se compararon con los del control no tratado, para determinar el efecto inductor de la síntesis de proteínas ECM.

El factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF-β1) indujo la producción de

25 colágeno tipo I, colágeno de tipo III y elastina en un 98,71 ± 9,31 %, 109,97 ± 6,73 % y 46,74 ± 18,59 %, respectivamente, después del tratamiento HDF durante 72 h en comparación con los fibroblastos no tratados. Las muestras tratadas con los lisados mostraron (datos no mostrados) un efecto ligeramente estimulante sobre la producción de colágeno de tipo I de una manera dependiente de la dosis a las concentraciones

30 evaluadas. En particular, un aumento de la producción de colágeno de tipo I del 31,63 ± 8,53 %, 37,24 ± 7,98%, 58,22 ± 8,6 y 51 ± 16,63% en los HDF tratados con 0,091, 0,182, 0,363 y 0,726 mg/ml de lisado respecto de los fibroblastos no tratados. Los fibroblastos tratados con 0,363 y 0,726 mg/ml de lisado en glicerina según Ejemplo 1 durante 72 h mostraron un aumento en la síntesis de colágeno tipo III del 50,29 ±

35 10,23% y 78,97 ± 26,16%, respectivamente, en comparación con HDF no tratados.

Además, los HDF tratados con lisado celular de células de algodón también indujeron la producción de elastina por $68,86 \pm 14,44\%$ a la concentración más alta evaluada (0.726 mg / ml).

- 5 Estos datos de producción de proteínas de la ECM demuestran que el lisado de la invención posee un efecto regenerador (actividad regeneradora) debida a su capacidad de promover la síntesis de estas proteínas.

3.4. Modulación de la respuesta inflamatoria

10

Aunque no se muestran los datos, se determinaron también en los cultivos de fibroblastos las concentraciones de distintas citoquinas pro-inflamatorias. El lisado celular de células de algodón redujo la producción de las citoquinas responsables del inicio de la inflamación cutánea IL-1 α , IL-1 β y TNF- α . También redujo la producción de las mayoría de citoquinas implicadas en la fase de amplificación de inflamación de la piel inmunomediada, tal como las interleuquinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, interferón γ (INF- γ) y la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1).

15

3.5. Eficacia del lisado frente radiación UV en ensayo in vivo en humanos

20

Se realizaron ensayos in vivo con el lisado celular (al 30 % en glicerina) según la invención en 16 voluntarios. El lisado se aplicó junto con una crema basal comercial para la piel a una concentración de lisado glicerinado en la crema del 1 % en peso. Los voluntarios incluían varios fototipos (I-III) según escala Fitzpatrick

25

Un ensayo consistió en evaluar el potencial del lisado celular según la invención, como agente fotoprotector.

El efecto de protección solar se evaluó mediante la determinación de la dosis mínima de eritema (MED) antes y después de 4 días de tratamiento. La MED se calculó induciendo un eritema en la piel con un simulador solar. El efecto del lisado se comparó con placebo (crema comercial sin el lisado celular). Para la inducción del eritema se utilizó una fuente de luz artificial con el sistema de filtrado Multiport® (Luz solar luz Co): de arco de xenón (300 W) y Schott WG 320 y UG 11 (1 mm) filtros. El espectro de emisión del simulador oscila entre 290 y 400 nm.

35

Las áreas de irradiación fueron elegidas por el técnico responsable, teniendo en cuenta el aspecto de la piel (sin marcas y que tuviera color uniforme), y que el área no hubiera sido expuesta a la irradiación del sol 1 mes antes del comienzo del estudio, evitando las áreas de fricción (ropa), los salientes óseos y las zonas extremas de curvatura. Las áreas se limitaron con una pluma quirúrgica especial (Superficie: 35 cm²). Las exposiciones se realizaron antes de la aplicación del producto y después de 4 aplicaciones.

Los valores de MED se leyeron cuando la respuesta de eritema era óptima (es decir, 20 ± 4 , entre 16 a 24 horas) después de la exposición a los rayos UV. La determinación de la MED se realizó visualmente. La MED se definió como la energía radiante de calidad (la dosis más baja UV) necesaria para producir el primer enrojecimiento perceptible y sin ambigüedades, con bordes definidos en la mayoría de la zona de la exposición a UV y leída de 16 a 24 horas después de la exposición.

La MED se calculó luego según:

$$\text{MED} = (\text{Dosis (en MED/min)} \times \text{tiempo de exposición (en segundos)}) / 60$$

Las siguientes tablas 4 a 6 muestran los resultados obtenidos:

20

Tabla 4. Resultados con la crema con lisado al 1 %

	MED Dosis mínima de eritema		
	Antes del tratamiento (Día 1)	Después del tratamiento (día 8)	% de variación (antes-después)
Media	1.43	1.54	11.50%
S.D.	0.32	0.39	28.40%

Tabla 5. Resultados con crema placebo

	MED Dosis mínima de eritema		
	Antes del tratamiento (Día 1)	Después del tratamiento (día 8)	% de variación (antes-después)
Media	1.43	1.42	0.80%
S.D.	0.32	0.33	18.10%

Tabla 6. Resultados control (área sin tratar)

MED Dosis mínima de eritema			
	Antes del tratamiento (Día 1)	Después del tratamiento (día 8)	% of variation (antes-después)
Media	1.43	1.36	-2.90%
S.D.	0.32	0.34	20.00%

Los resultados muestran una mejora del MED (11,5%) en el área tratada con el lisado de células de algodón. Por otro lado, no se observó ninguna variación importante en la MED para la zona de control y la zona tratada con el placebo.

Puede concluirse entonces que, las condiciones experimentales adoptadas y teniendo en cuenta la evolución del parámetro decisivo considerado, el producto (lisado) de la invención tiene un efecto protector de sol después de 4 aplicaciones.

Por otro lado, también se evaluó en otro ensayo el efecto reparador (soothing effect; after-sun action) proporcionado por el lisado al 1 % en la misma crema basal comercial.

Para ello, zonas de la piel con los mismos criterios de selección que para el ensayo de fotoprotección, se irradiaron con la misma lámpara en los mismos 16 voluntarios. La radiación UV se aplicó por 6 fibras ópticas (8 mm de diámetro) que definen sobre la piel 6 subsitios de 0,5 cm².

El efecto calmante del producto se evaluó, objetiva y cuantitativamente, mediante mediciones colorimétricas, con el Mexameter® MX18 (Courage & Khazaka), que tiene una sonda de medición con un diámetro de superficie de medición de 5 mm. La medición se realizó en el área de la piel tratada con el producto de prueba y el producto placebo y el área no tratada, después de la exposición a la radiación.

La superficie de las sub-sitios de exposición (irradiación) fue de 0,5 cm² y la distancia mínima entre los bordes de dos sub-sitios de exposición adyacente era de 0,8 cm por lo menos.

La energía producida por cada fibra del simulador estaba regulada por las pantallas de observación de los valores crecientes según una progresión geométrica 1,25.

- 5 Las dosis de UV se midieron mediante un dosímetro de luz solar previamente calibrado y se expresaron en MED / min. (escala hasta aproximadamente las 3.00 MED / min). Todas las mediciones de irradiancia se hicieron usando el mismo dosímetro.
- 10 El tiempo de exposición de la zona (establecido mediante el MED estimada, por colorimetría) fue de 15 a 60 segundos y variaba de acuerdo a los sujetos (fototipos). Los resultados se expresaron en valores medios del parámetro E o el nivel de eritema.

Se calculó la diferencia entre el valor del parámetro E obtenido en el área irradiada y la obtenida en la zona adyacente (ΔE).

15

Las mediciones de nivel de eritema se realizaron en D2 / T0H (6h después de la irradiación de la piel y antes de la aplicación del producto de ensayo y el producto placebo) y en D2 / T1h y D2 / T2H (1h y 2h después de la aplicación del producto de prueba y el placebo producto).

20

El porcentaje de reducción de eritema observado en cada voluntario para la crema con el lisado celular de células de algodón (1% en peso), para el placebo y para el control se detalla en las Tabla 7 siguiente:

25

Tabla 7. Porcentaje de reducción del eritema tras irradiación y aplicación del lisado celular, el placebo o en áreas no tratadas

Tratamiento con lisado celular de células de algodón		
Sujeto	Porcentaje de reducción D2/T1h-D2/T0h (%)	Porcentaje de reducción D2/T2h-D2/T0h (%)
1	-10%	-25%
2	-15%	-27%
3	-26%	-4%

ES 2 579 385 A1

4	-16%	-31%
5	-44%	-34%
6	-11%	-13%
7	-9%	-6%
8	-28%	-52%
9	-31%	-33%
10	-1%	-1%
11	-12%	-26%
12	-9%	-10%
13	-20%	-8%
14	-13%	-8%
15	-2%	-1%
16	-8%	-18%
Media	-15.9%	-18.5%
Desviación estándar (SD)	11.3%	14.6%
Placebo		
Sujeto	Porcentaje de reducción D2/T1h-D2/T0h (%)	Porcentaje de reducción D2/T2h-D2/T0h (%)
1	2%	-2%
2	1%	12%
3	-7%	-55%
4	-3%	1%
5	-12%	6%
6	6%	8%
7	1%	11%
8	-10%	-1%
9	9%	-9%
10	-44%	5%
11	17%	20%
12	4%	3%
13	-14%	4%
14	-4%	-17%
15	2%	-8%
16	3%	-1%
Media	-3.1%	-1.4%

Desviación estándar (SD)	13.4%	16.8%
Control		
Sujeto	Porcentaje de reducción D2/T1h-D2/T0h (%)	Porcentaje de reducción D2/T2h-D2/T0h (%)
1	3%	25%
2	-8%	-23%
3	-10%	-12%
4	-19%	-11%
5	-38%	14%
6	11%	16%
7	0%	10%
8	151%	195%
9	-28%	5%
10	20%	33%
11	46%	52%
12	-4%	-7%
13	-5%	4%
14	-5%	-16%
15	7%	7%
16	-12%	-17%
Media	6.8%	17.3%
Desviación estándar (SD)	42.9%	51.5%

Estos resultados muestran que el lisado celular de células de algodón según se describe en el Ejemplo 1 (aplicado al 1 % en peso en una crema basal), muestran que el producto reduce el nivel de eritema en un 16%, 1 hora después de su aplicación y en un 19%, 2 horas después de su aplicación. De la misma manera, el porcentaje de reducción del nivel de eritema detectado en los "sujetos reactivos" es 16,5% y 23,3%, 1h y 2h después de la aplicación del producto, respectivamente.

En las condiciones experimentales adoptadas y teniendo en cuenta la evolución de los parámetros fundamentales de análisis, el lisado celular de la invención demuestra un efecto calmante estadísticamente significativo. Este efecto se detectó en el 81 % de los voluntarios ensayados.

Ejemplo 4. Composición tópica con lisado celular de un cultivo de células de algodón en suspensión.

Componente	Porcentaje (%)
Glicerina	69
Lisado de cultivo celular de <i>Gossypium herbaceum</i> (algodón)	30
Conservantes	
Gluconolactona	0.74
Benzoato sódico	0.25
Aditivos	
Gluconato cálcico	0.01

5

Esta composición puede ser un ingrediente adicionado a otras composiciones o galénicas de uso tópico, tal como cremas, geles, ungüentos, vaporizadores (sprays), bases de maquillaje, o champús para el cuero cabelludo.

10 REFERENCIAS CITADAS

- Grether-Beck et al., "Review Article Photoprotection of human skin beyond ultraviolet radiation", Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine - 2014, doi:10.1111/phpp.12111.
- 15 - European Pharmacopoeia 8.0 Markham, Andersen, páginas 1205-1206.
- Marinova D et al., "TOTAL PHENOLICS AND TOTAL FLAVONOIDS IN BULGARIAN FRUITS AND VEGETABLES", Journal of University of Chemical Technology and Metallurgy -2005, Vol. No. 40 (3), pp.: 255-260.

REIVINDICACIONES

- 1.- Cultivo de células de planta del género *Gossypium* en suspensión, caracterizado
5 porque comprende:
- polifenoles a una concentración de 250 a 500 miligramos por litro de cultivo;
 - fitoesteroles a una concentración de 30 a 60 miligramos por litro de cultivo;
 - una mezcla de azúcares, que comprende a su vez glucosa, fructosa, sacarosa,
furanosa, arabitol y mioinositol;
 - 10 - lípidos; y
 - proteínas.
- 2.- Cultivo según la reivindicación 1, caracterizado porque los polifenoles están en una
concentración de 200 a 400 mg/l de cultivo.
- 15
- 3.- Cultivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 anteriores, caracterizado
porque la planta del género *Gossypium* se selecciona del grupo constituido por
Gossypium herbaceum, *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum*, *Gossypium*
barbadense, *Gossypium tomentosum*, y mezcla de los mismos.
- 20
- 4.- Procedimiento de obtención de un cultivo de células de una planta del género
Gossypium en suspensión que comprende las siguientes etapas:
- (a) Cultivar células desdiferenciadas de la planta del género *Gossypium* en un
25 medio de cultivo de crecimiento que comprende reguladores del crecimiento de
plantas, dichos reguladores seleccionados del grupo constituido por las auxinas
ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (NAA) y las
citoquininas quinetina, y 6-Benzilaminopurina (BAP) y mezclas de las mismas
por un periodo de 5 a 10 días;
- 30 (b) añadir al cultivo de la etapa (a), de 2 a 4 veces, una composición o
combinación elicitora, donde esta composición o combinación se selecciona
cada vez que se adiciona de:
- una composición o combinación que comprende ciclodextrinas, y al
menos un compuesto de jasmonato, donde el compuesto de jasmonato se
35 selecciona del grupo constituido por jasmonato de metilo, jasmonato de

5 etilo y jasmonato de propilo; y donde al final de las 2 a 4 veces de adición de la composición o combinación elicitora, las ciclodextrinas están a una concentración final en el cultivo de 18 a 72 g/l de cultivo y el compuesto de jasmonato está en una concentración final en el cultivo de 100 μM a 500 μM ; y

10 - una composición que comprende al menos un compuesto de jasmonato, seleccionado de jasmonato de metilo, jasmonato de etilo y jasmonato de propilo, donde al final de las 2 a 4 veces de adición de la composición elicitora, el compuesto de jasmonato está en una concentración final en el cultivo de 100 μM a 500 μM .

5.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque la etapa (b) se lleva a cabo con tres adiciones de la composición o combinación elicitora.

15 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque la adición de la composición o combinación elicitora se lleva a cabo de acuerdo con el siguiente patrón de adición:

(i) añadir una primera dosis de la composición o combinación elicitora cuando el cultivo de la etapa (a) ha crecido de 5 a 10 días;

20 (ii) añadir una segunda dosis de 3 a 4 días después de la primera dosis; y

(iii) añadir una tercera dosis de 2 a 3 días después de la segunda dosis.

7.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, caracterizado porque la adición de la composición o combinación elicitora se lleva a cabo de acuerdo con el siguiente patrón de adición:

25 (i) añadir una primera dosis de una composición o combinación elicitora que comprende ciclodextrinas y un compuesto de jasmonato, cuando el cultivo de la etapa (a) ha crecido de 5 a 10 días;

(ii) añadir una segunda dosis de una composición que comprende un compuesto de jasmonato, de 3 a 4 días después de la primera dosis; y

30 (iii) añadir una tercera dosis de una composición que comprende un compuesto de jasmonato, de 2 a 3 días después de la segunda dosis.

8.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, caracterizado porque la composición o combinación elicitora comprende jasmonato de metilo.

35

9.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, caracterizado porque además comprende la etapa (c) de lisar el cultivo celular obtenido en la etapa (b).

5

10.- Lisado celular de un cultivo en suspensión de células de una planta del género *Gossypium*, caracterizado porque es obtenible por el procedimiento según la reivindicación 9.

10 11.- Composición farmacéutica o cosmética tópica, caracterizada porque comprende una cantidad efectiva de un cultivo en suspensión de células de una planta del género *Gossypium* según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o de un lisado según se define en la reivindicación 10, junto con uno o más excipientes o vehículos aceptables farmacéutica o cosméticamente.

15

12.- Composición según la reivindicación 11, caracterizada porque además comprende glicerina como excipiente.

13- Uso de un cultivo en suspensión de células de una planta del género *Gossypium*
20 según se define en las reivindicaciones 1 a 3, o de un lisado celular según se define en la reivindicación 10, o de una composición farmacéutica tópica según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, para la preparación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o condición causada por la exposición a radiación seleccionada del grupo formado por radiación ultravioleta (UV),
25 radiación infrarroja (IR) y una combinación de ambas.

14.- Uso según la reivindicación 13, caracterizado porque el medicamento es para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o condición causada por la exposición a radiación infrarroja.

30

15.- Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, caracterizado porque la enfermedad o condición causada por la exposición a radiación se selecciona del grupo constituido por escozor y/o picor de la piel y/o del cuero cabelludo, envejecimiento precoz de la piel, quemaduras cutáneas por radiación, inflamación dérmica ocasionada
35 por radiación, dermatitis atópica y cáncer cutáneo.

16.- Uso de un cultivo en suspensión de células de una planta del género *Gossypium* según se define en las reivindicaciones 1 a 3, o de un lisado celular según se define en la reivindicación 10, o de una composición cosmética tópica según se define en una
5 cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, como agente fotoprotector de la piel y del cuero cabelludo.

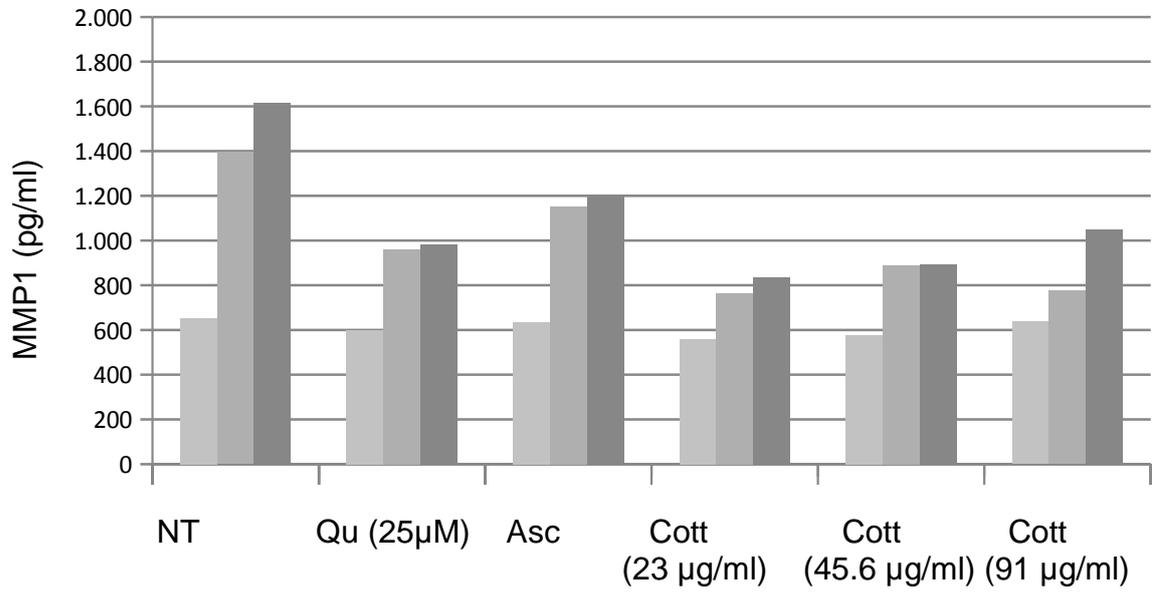


FIG. 1

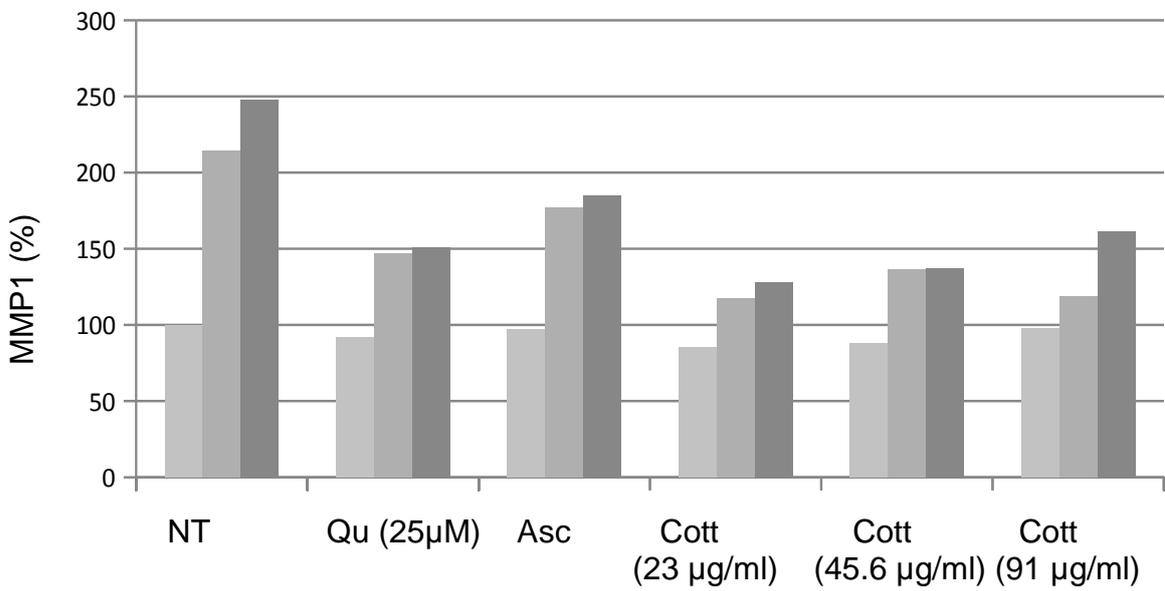


FIG. 2

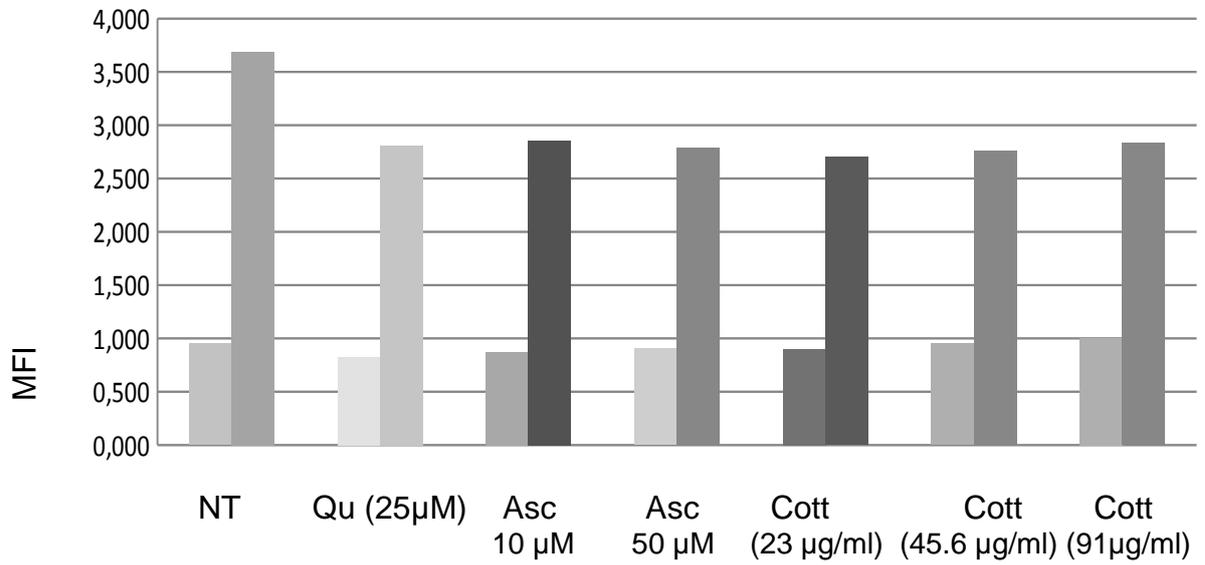


FIG. 3

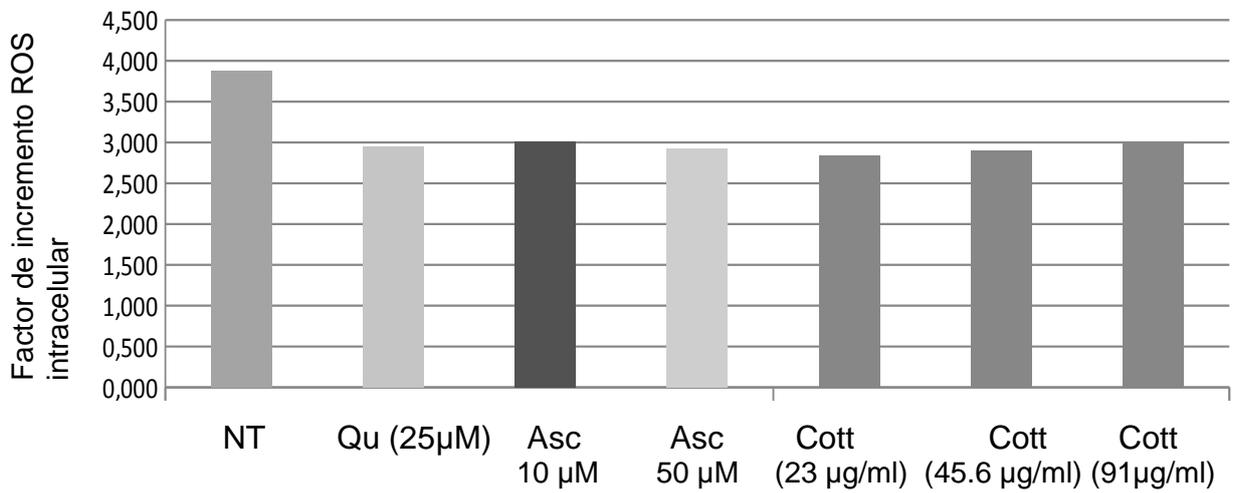


FIG.4



- ②¹ N.º solicitud: 201530157
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 10.02.2015
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **A61K8/97** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KULKARNI, Snehal S., et al. HERBAL PLANTS IN PHOTO PROTECTION AND SUN SCREENING ACTION: AN OVERVIEW. Indo American Journal of Pharmaceutical Research, 2014, vol. 4, no 2, p. 1104-1113.	1-16
A	GOSWAMI, Priyanka Kantivan; SAMANT, Mayuri; SRIVASTAVA, Rashmi. Natural Sunscreen Agents: A Review. Scholars Academic Journal of Pharmacy, 2013, vol.2 no 6, p.458-463.	1-16
A	SINGH, Madhulika; SHARMA, Ekta. NOVEL AND SECURE TREND FOR PHOTOPROTECTION-A HALLMARK OF PLANT METABOLITES AS UV FILTERS. International Journal of Recent Scientific Research, 2014, vol.5, no 2, p. 322-325	1-16
A	MALSAWMTLUANGI, C., et al. Determination of Sun Protection Factor (SPF) number of some aqueous herbal extracts. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2013, vol.3, no 9, p.150-151.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
22.07.2015

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.07.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KULKARNI, Snehal S., et al. HERBAL PLANTS IN PHOTO PROTECTION AND SUN SCREENING ACTION: AN OVERVIEW. Indo American Journal of Pharmaceutical Research, vol. 4, no 2, p. 1104-1113.	2014
D02	GOSWAMI, Priyanka Kantivan; SAMANT, Mayuri; SRIVASTAVA, Rashmi. Natural Sunscreen Agents: A Review. Scholars Academic Journal of Pharmacy, vol.2 no 6, p.458-463.	2013
D03	SINGH, Madhulika; SHARMA, Ekta. NOVEL AND SECURE TREND FOR PHOTOPROTECTION-A HALLMARK OF PLANT METABOLITES AS UV FILTERS. International Journal of Recent Scientific Research, vol.5, no 2, p. 322-325	2014
D04	MALSAWMTLUANGI, C., et al. Determination of Sun Protection Factor (SPF) number of some aqueous herbal extracts. Journal of Applied Pharmaceutical Science, vol.3, no 9, p.150-151.	2013

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (artículos 6 y 8 de la LP11/86)

En las reivindicaciones 1-3 de la solicitud de patente se reivindica un cultivo de células, de planta del género *Gossypium* en suspensión.

En las reivindicaciones 4-9 de la solicitud de patente se reivindica un procedimiento de obtención de un cultivo de células, de una planta del género *Gossypium* en suspensión.

En la reivindicación 10 de la solicitud de patente se reivindica un lisado celular, de un cultivo en suspensión de células, de una planta del género *Gossypium*.

En las reivindicaciones 11 y 12 de la solicitud de patente se reivindica una composición farmacéutica, o cosmética tópica que comprende una cantidad efectiva de un cultivo en suspensión, de células de una planta del género *Gossypium*.

En las reivindicaciones 13-16 de la solicitud de patente se reivindica el uso de un cultivo en suspensión de células, de una planta del género *Gossypium*, o de un lisado celular, o de una composición farmacéutica tópica para la preparación de un medicamento.

En los documentos D01, D02, D03 y D04 se divulga el poder fotoprotector de diferentes especies vegetales. El objeto de invención reivindicado, en la solicitud de patente no se encuentra reflejado en ninguno de los documentos citados. Además, a partir de la información divulgada en cualquiera de los documentos citados, no resultaría evidente, para un experto en la materia, el desarrollo de la invención reivindicada en la solicitud de patente. Por tanto, las reivindicaciones 1-16 de la solicitud de patente presentan novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la LP 11/86.