

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 981**

51 Int. Cl.:

C12N 5/04 (2006.01)

A61K 36/23 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012** E 12382351 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016** EP 2708596

54 Título: **Cultivos de células vegetales del género Centella, procedimiento de producción y usos de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2017

73 Titular/es:

CASEN RECORDATI, S.L. (100.0%)
Autovía de Logroño, km. 13,300
50180 Utebo (Zaragoza), ES

72 Inventor/es:

TABUENCA NAVARRO, DANIEL;
BELLO NAVARRO, MARTA;
JANÉ FONT, ALBERT;
EXPÓSITO TARRÉS, ÓSCAR y
ALLUÉ CREUS, JOSÉ

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 613 981 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cultivos de células vegetales del género *Centella*, procedimiento de producción y usos de los mismos

- 5 La presente invención se refiere a cultivos de células vegetales derivados de una planta del género *Centella*. También se refiere a procedimientos para obtener células cultivadas enriquecidas en metabolitos secundarios de interés y a usos de estos cultivos de células vegetales en el campo de la medicina, la salud y el bienestar.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

- 10 Existen varias composiciones que incluyen extractos de plantas del género *Centella*, es decir de la especie *Centella asiatica* (*C. asiatica*), denominada también Gotu Kola, hierba de tigre e Indian pennywort. Los extractos de esta planta se han usado ampliamente en el tratamiento de afecciones dermatológicas, para tratar heridas, raspados, quemaduras superficiales, eccemas o como agente antiinflamatorio.

- 15 El uso extendido de los extractos de *Centella asiatica* en composiciones para regeneración de la piel, además de en preparaciones para la reparación de tejido dañado, se debe a la capacidad de algunos de los compuestos de la planta, que son capaces de estimular la síntesis del colágeno. Algunos de estos constituyentes activos de *Centella asiatica* son triterpenoides pentacíclicos, que se encuentran como geninas (ácido asiático y madecásico) y heterósidos (asiaticósido y madecasósido) en la planta. Dado que estos compuestos se asocian con *Centella*, también se conocen como centellósidos. Maquart y col., "Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by a triterpene extracted from *Centella asiatica*". Conn. *Tissue Res* -1990, vol. 24, pp. 107-120, de hecho divulgan que el asiaticósido, ácido asiático y madecásico estimulan la síntesis del colágeno de un modo dependiente de la dosis.

- 25 Los centellósidos son un tipo de metabolitos secundarios presentes en *Centella asiatica*, y se considera que están implicados en la respuesta a los estímulos de estrés. Los metabolitos secundarios son compuestos sintetizados por las células vegetales y, aunque no tienen una función evidente en el metabolismo primario de la planta, desempeñan importantes papeles secundarios, por ejemplo actuando como repelentes de insectos, moléculas de defensa contra microorganismos o contra estímulos externos (cortes de algunas partes de la planta, presencia de venenos, etc.).
- 30 Algunos de estos compuestos derivados de plantas son útiles como ingredientes farmacológicos activos. No obstante, la síntesis química de ellos en ocasiones es difícil y por esta razón se extraen de las plantas y, después, se concentran y purifican si es necesario.

- 35 Ejemplos de extractos de *Centella asiatica* incluyen extractos acuosos, extractos alcohólicos y extractos con otros disolventes. La extracción normalmente se realiza de diferentes partes de la planta, incluidas hojas, tallos, frutas, semillas, ramas etc.

- 40 El extracto titulado de *Centella asiatica* (TECA) es uno de los extractos más conocidos de esta planta. Incluye asiaticósido (40 % en peso) y ácido asiático y madecásico (60 % e peso). El madecasósido no está presente, ya que, debido al proceso de extracción y debido a la elevada solubilidad en agua, se elimina durante la manipulación. El TECA es, por tanto, un extracto estandarizado de *Centella asiatica*, en el que los ingredientes activos se combinan en proporciones constantes para garantizar una actividad óptima.

- 45 Por otro lado, el documento de patente EP867447, presentado por Dong Kook Pharmaceutical, divulga un extracto hidrosoluble que incluye asiaticósido y madecasósido, en el que dicho asiaticósido y madecasósido están en una proporción que varía de 4:6 a 6:4, constituyendo ambos componentes al menos un 97 % en peso o más del extracto.

- 50 Los procedimientos de extracción, aunque estandarizados, conllevan el problema de que se convierten en bastante caros, especialmente cuando el objetivo es una composición enriquecida en un compuesto específico o grupo de compuestos de interés de la planta seleccionada.

- 55 Un modo alternativo de obtener un compuesto de interés de una planta que actúa como fábrica es usando la tecnología de los cultivos de células vegetales. Los cultivos de células vegetales permiten el aislamiento de las células de diferentes partes de la planta (hojas, frutos, tallos, raíces, brotes etc.), tales partes de la planta cultivándose además en condiciones controladas con el fin de obtener un compuesto deseado. Con la tecnología de los cultivos de células vegetales, las células vegetales aisladas generalmente se someten a indiferenciación hasta que se alcanza la totipotencia. Estas células totipotenciales no diferenciadas pueden convertirse en cualquier tejido de célula vegetal tras la estimulación adecuada. Esta es la razón por la cual estas células indiferenciadas también se denominan células madre vegetales.

- 60 Estas células vegetales totipotenciales se usan como fábricas de metabolitos o compuestos de interés una vez que han sido estimuladas con compuestos específicos (también conocidos como agentes de inducción). Esta tecnología

se expone en el documento de Mulabagal y col., "Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites", International Journal of Applied Science, Engineering and Technology-2004, Vol. 2, pp.: 101-153. Mulabagal y col. divulgan procedimientos de cultivo de callos y suspensión para la producción de metabolitos secundarios bioactivos de plantas medicinales.

La ventaja principal de la tecnología de los cultivos de células vegetales es que permite el suministro de una fuente continua y fiable de sustancias farmacéuticas derivadas de plantas.

En el caso concreto de *Centella asiatica*, se ha usado una suspensión de las células indiferenciadas totipotenciales para obtener fitosteroles y centellosidos. El procedimiento se divulga en Bonfill y col., "Production of centellosides and phytosterols in cell suspension cultures of *Centella asiatica*", Plant Cell Tiss Organ Cult – 2011, Vol. No. 104, pp.: 61-67. En este documento se establecieron suspensiones de células de *C. asiatica* y se trataron con dos concentraciones (100 y 200 μM) del agente de inducción (estimulador) jasmonato de metilo (MeJA). La producción máxima de centellosido se observó en la fase de crecimiento estacionario, que alcanza 0,16 mg/g de peso seco el día 25 del cultivo en el control y 1,11 mg/g el día 15 en los cultivos provocados por MeJA. Por medio de esta metodología se obtuvo un porcentaje en peso de 54,5 % de madecasósido y de 45,5 % de asiaticósido con respecto a la cantidad total de centellosidos.

Aunque todas las composiciones conocidas que comprenden componentes de *Centella asiatica* (principalmente extractos de la planta) tienen interesantes propiedades en términos de estimulación de la reparación de tejidos, especialmente tejido dermatológico, todavía existe la necesidad de composiciones alternativas con una capacidad elevada de inducir síntesis de colágeno.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

En el presente documento se proporciona un cultivo celular de una planta del género *Centella*, que está específicamente enriquecido en madecasósido y tiene buenas propiedades como agente inductor de la síntesis de colágeno.

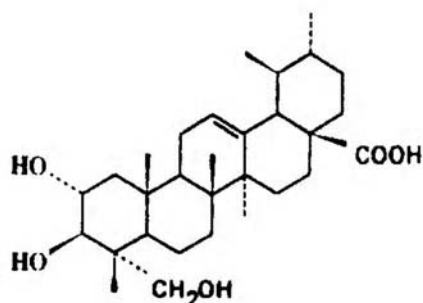
Por tanto, en un primer aspecto de la invención se refiere a un cultivo de células vegetales de una planta del género *Centella*, comprendiendo dicho cultivo de células vegetales una cantidad de madecasósido comprendida del 85 % al 95 % en peso, y una cantidad de asiaticósido del 5 % al 15 % en peso, siendo el % en peso del madecasósido y el asiaticósido respecto al peso total de los centellosidos en el cultivo celular, y obtenible por:

a) cultivo mediante suspensión celular de una célula vegetal indiferenciada de una planta del género *Centella* en un medio de crecimiento adecuado durante un periodo comprendido de 8 a 15 días hasta que se alcanza la fase de crecimiento estacionario; para obtener un cultivo en fase estacionaria;

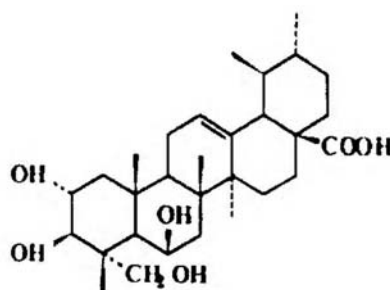
b) adición de 3 dosis de un compuesto de jasmonato al cultivo en fase estacionaria de la etapa a), en el que cada una de las dosis añadidas corresponde a una cantidad tal de compuesto de jasmonato que la concentración final al final de cada adición es de 80 μM a 150 μM ; y donde las tres dosis del compuesto de jasmonato se añaden con la pauta siguiente:

- (i) la primera dosis una vez que el cultivo de la etapa a) ha alcanzado la fase de crecimiento estacionaria;
- (ii) la segunda dosis se añade de 3 a 5 días después con respecto a la primera adición;
- (iii) la tercera dosis se añade de 8 a 11 días después con respecto a la primera adición.

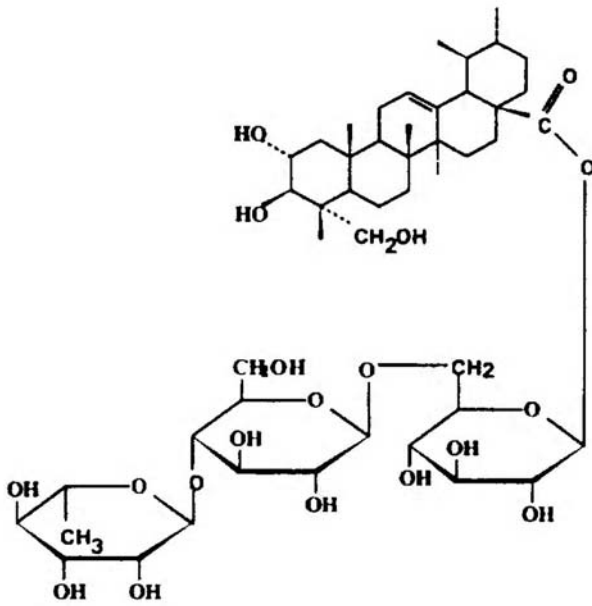
Los centellosidos principales son, como se ha indicado anteriormente, las geninas ácido asiático y madecásico, y también los heterósidos asiaticósido y madecasósido, los cuatro representados en las fórmulas (I) a (IV) más adelante:



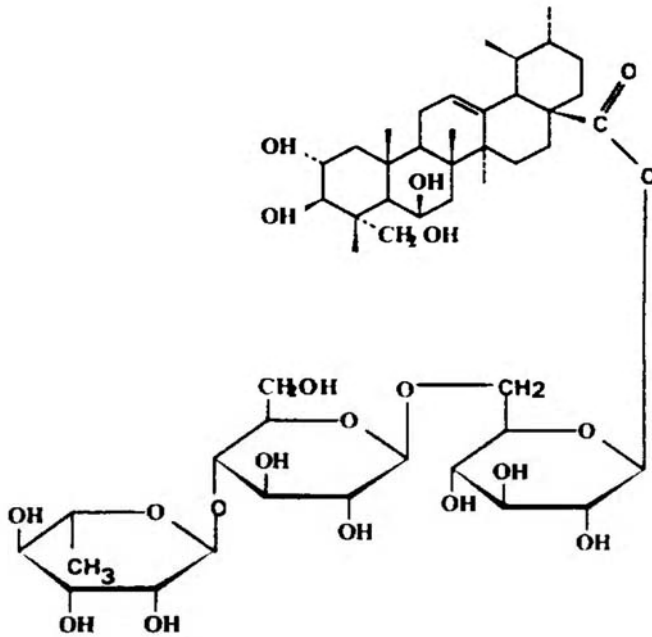
(I) Ácido asiático



(II) Ácido madecásico



(III) Asiaticósido



(IV) Madecasósido

5 Sorprendentemente, el cultivo de células vegetales del género *Centella* tiene un perfil concreto de concentraciones de centellósido. En concreto, el cultivo celular está enriquecido en madecasósido comprendiendo una cantidad de madecasósido del 85 % al 95 % en peso, y una cantidad de asiaticósido del 5 % al 15 % en peso. Además, estos cultivos de células vegetales de la invención estimulan con eficiencia la síntesis de colágeno, que, a su vez, permite la cicatrización y reparación de tejido dermatológico dañado, pudiéndose por tanto utilizar como agentes de
 10 reparación de tejidos.

5 El uso de la tecnología de cultivos de células vegetales, y especialmente de cultivos en suspensión, permiten la obtención de los productos de interés de un modo altamente reproducible, siendo los lotes de fabricación lo más similares posibles. Esto es una gran ventaja de la tecnología de cultivos de células vegetales, porque la reproducibilidad es una condición obligada para que las autoridades reguladoras aprueben los agentes y para que se usen en composiciones farmacéuticas. Adicionalmente, los cultivos de suspensiones celulares son de interés concreto, ya que son escalables y conducen, además, a altos rendimientos del proceso con un coste menor que el de los procesos de extracción aplicados a las plantas.

10 Otro aspecto de la invención es un cultivo de célula vegetal como se ha definido anteriormente, para usar como medicamento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15 La FIG. 1, relacionada con el Ejemplo 3, es un diagrama de barras que muestra la cantidad de colágeno ($\mu\text{g}/10^6$ fibroblastos humanos) sintetizado por los fibroblastos humanos tras la adición, al medio de cultivo, de diferentes composiciones que incluyen el cultivo de células vegetales del género *Centella* de acuerdo con la invención.

20 La FIG. 2, relacionada con el Ejemplo 1, es otro gráfico de barras que muestra la cantidad (concentración en mg/l) de madecasósido (M) y de asiaticósido (A) obtenida en una suspensión celular de una planta del género *Centella* sometido al procedimiento de acuerdo con la invención. T significa tratamiento o adición de jasmonato de metilo; 1X significa una adición de jasmonato de metilo; 3X significa adición triple de jasmonato de metilo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 Las siguientes definiciones se incluyen a fines de comprensión.

30 El término "enriquecido" significa en el presente documento que el madecasósido es el componente principal del total de centelósidos producido por el cultivo de células vegetales del género *Centella*, es decir que representa al menos el 85 % en peso del total de centelósidos (madecasósido, asiaticósido, ácido madecásico y ácido asiático) en el cultivo de células vegetales. La cantidad en porcentaje en peso de madecasósido en el cultivo celular es, de hecho, la representación de la cantidad en cualquier célula individual constituyente de dicho cultivo, cualquier célula que contribuye a la cantidad absoluta final del compuesto.

35 La cantidad de centelósidos se determina, preferentemente, en el cultivo siguiendo la metodología de HPLC. Las células se liofilizan y extraen a través de extracción en metanol:agua y, después, se disuelven en un disolvente polar para realizar el análisis HPLC.

40 En el sentido de la presente invención, un "cultivo de células vegetales" son células vegetales derivadas de tejido o células de plantas, que después se cultivan en un contenedor o recipiente. Los cultivos de células vegetales incluyen tejidos de callos (callos), tejidos cultivados diferenciados o un tejido de órgano cultivado. Los callos son, a su vez, agregados de células vegetales cultivadas compuestos por células indiferenciadas (masa de células vegetales indiferenciadas) propagadas sobre medio de cultivo sólido que contiene hormonas vegetales o en medio de cultivo líquido que contiene hormonas vegetales. Por otro lado, los tejidos cultivados diferenciados son agregados de células vegetales que constituyen una raíz, un tallo, una yema o un fruto.

45 "Callo" vegetal es una masa de células parenquimatosas no organizadas derivadas de tejido vegetal (explantes) para usar en investigación biológica y biotecnología. En biología vegetal, las células de los callos son las células que cubren una herida en una planta. La formación de callos es inducida a partir de tejidos vegetales tras la esterilización de la superficie y el sembrado sobre medio de cultivo tisular in vitro. Los reguladores del crecimiento de las plantas, tales como auxinas, citoquininas y giberelinas, se añaden al medio como suplemento para iniciar la formación de callo o la embriogénesis somática.

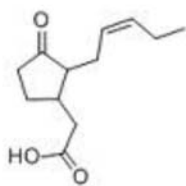
50 Un "lisado de cultivo de células vegetales" es un cultivo de células vegetales que se ha sometido a desagregación y rotura de las células, por medio de ultrasonidos o mecánicamente con un agitador-cortador. Con la rotura de las células, el contenido del citoplasma se libera en el medio (sólido o líquido), de modo que conduce a una mezcla que comprende los diferentes componentes de la célula (compuestos del citoplasma, fragmentos de membrana y compuestos de la célula liberada previamente al medio). El lisado de cultivo de células vegetales también se puede obtener por otros medios, incluido, como ejemplo no limitativo, congelación a una temperatura muy baja.

60 En el sentido de la invención, un "cultivo de suspensión celular" o "suspensión celular" es un grupo de células no diferenciadas dispersas o en suspensión en un medio nutritivo líquido (medio de cultivo líquido). La suspensión

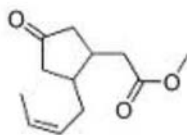
celular puede comprender células en varios estadios de agregación.

5 En el sentido de la invención, un "cultivo en fase de equilibrio" o "cultivo en crecimiento", usados en el presente documento de forma intercambiable, significa un cultivo de células (no diferenciadas o diferenciadas) de una planta del género *Centella* que se cultivan hasta una fase deseada, fase en la cual la densidad del cultivo celular se mantiene a un valor constante porque las células ni mueren ni crecen. A este cultivo se le pueden aplicar tratamientos adicionales.

10 La expresión "compuesto derivado de jasmonato" o "compuesto de jasmonato" usada en el presente documento de forma intercambiable, abarca compuestos derivados del ácido jasmónico de fórmula (A) en los que uno o varios átomos de hidrógeno, a saber el átomo de hidrógeno del compuesto hidroxilo, se han sustituido con un radical alquilo (C1-C3). Ejemplos de radical alquilo (C1-C3) incluyen metilo, etilo y propilo. Por tanto, algunos de los compuestos derivados de jasmonato son jasmonato de metilo (fórmula (B)), jasmonato de etilo y jasmonato de propilo.



(A)



(B)

15 Un "agente de reparación tisular" se tiene que entender como un compuesto o mezcla de compuestos (en la presente invención un cultivo de células vegetales o lisado de cultivo de células vegetales) que, debido a su capacidad inherente de recuperar células dañadas, o estructuras celulares intersticiales, es decir células de la piel o la mucosa, estimulan la recuperación de la totalidad de la funcionalidad del tejido. Un ejemplo de agente de reparación tisular es un compuesto o mezcla de compuestos que permite la síntesis de colágeno.

20 La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, pertenece a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico sólido, adecuados para usar en contacto con los tejidos de un sujeto (p. ej., un ser humano) sin que produzcan toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una proporción beneficios/riesgos razonable. Cada vehículo, excipiente etc. debe también ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la formulación. Los vehículos, excipientes etc. adecuados se pueden encontrar en textos farmacéuticos e incluyen, a modo de ejemplo, conservantes, aglutinantes, humectantes, emolientes y antioxidantes.

30 La expresión "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, significa una cantidad de un agente activo lo bastante elevada para dar lugar al beneficio deseado (el tratamiento o la prevención de la enfermedad), pero lo bastante baja para evitar efectos secundarios graves dentro del alcance del juicio médico.

35 La expresión "cosméticamente aceptable" o "dermatológicamente aceptable", que en el presente documento se usa de forma intercambiable, se refiere a los excipientes o vehículos adecuados para usar en contacto con la piel humana sin toxicidad indebida, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica, entre otras cosas.

40 La expresión "dispositivo médico" significa, como se define en la Directiva Europea 2007/47/CE, cualquier producto, instrumento, dispositivo, aparato, programa de ordenador, material o artículo usado en el campo médico-sanitario y está regulada por la Directiva Europea 90/385/CEE de dispositivos médicos implantables activos, 98/79/CE de dispositivos médicos para diagnóstico in vitro y 93/42/CEE para dispositivos médicos generales. El dispositivo médico está incluido en las tecnologías sanitarias. Se usan en seres humanos para el diagnóstico, prevención, control, tratamiento o alivio de una enfermedad, para la compensación de una deficiencia; para investigar, sustituir o modificar la anatomía o un proceso fisiológico y para la regulación de la anticoncepción. Los dispositivos médicos de la presente invención se refieren a composiciones o formulaciones ("composiciones de dispositivos médicos") o a productos o dispositivos que comprenden dichas composiciones o formulaciones, que comprenden una cantidad eficaz de un cultivo de células vegetales de una planta del género *Centella*, comprendiendo dicho cultivo de células vegetales una cantidad de madecacosido del 85 % al 95 % en peso y una cantidad de asiaticósido del 5 % al 15 % en peso, con respecto al peso total de centellosidos en el cultivo celular; y obtenible por el método descrito arriba. La expresión "composición para dispositivo médico" se usa, en el presente documento, para identificar las

composiciones de acuerdo con la invención, en el que las composiciones, como tales (por sí mismas) son catalogadas por las autoridades sanitarias competentes como dispositivos médicos.

Para los fines de la invención, cualquier intervalo dado incluye los límites inferior y superior del intervalo.

5 Las cantidades más preferidas de madecasósido son 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % y 95 % en peso con respecto al peso total de los centellósidos. Especialmente preferida es una cantidad del 90 % en peso de madecasósido con respecto al peso total de los centellósidos en el cultivo celular.

10 En otra realización preferida, el cultivo de células vegetales de acuerdo con la invención comprende una cantidad de madecasósido del 85 % al 95 % en peso con respecto al peso total de los centellósidos en el cultivo de células vegetales y una cantidad de asiaticósido que va del 5 % al 15 % en peso con respecto al peso total de los centellósidos en el cultivo de células vegetales, de modo que se representa tanto el 100 % en peso de los centellósidos del cultivo celular. Más preferentemente, el cultivo de células vegetales del género *Centella* comprende
15 una cantidad del 90 % en peso de madecasósido con respecto al peso total de los centellósidos y una cantidad del 10 % en peso de asiaticósido con respecto al peso total de los centellósidos.

20 En otra realización, tanto el madecasósido como el asiaticósido representan la mayoría de los centellósidos en el cultivo celular, siendo ambos al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o al menos el 99,9 % en peso del peso total de los centellósidos en el cultivo celular y en el que la proporción de madecasósido en peso del peso total de los centellósidos en el cultivo celular, es preferentemente el 85 % y, más preferentemente, el 90 %. Otros centellósidos que pueden estar presentes son ácido asiático y ácido madecásico, que en el cultivo celular de acuerdo con la invención generalmente están presentes en cantidades minoritarias.

25 También, otra realización preferida es un cultivo de célula vegetal en el que la planta del género *Centella* es *Centella asiatica*. El cultivo de células vegetales procede de una célula indiferenciada. La *Centella asiatica* puede ser de diferente origen territorial. Ejemplos de dichos orígenes incluyen países asiáticos, tales como China, India, Indonesia, Pakistán, Sri Lanka, países africanos, tales como Madagascar, países de la Europa oriental, y países americanos, tales como Méjico.
30

En otra realización, el cultivo de células vegetales es un cultivo de células vegetales indiferenciadas de *Centella asiatica* en el que dichas células vegetales indiferenciadas procede de una fuente de células indiferenciadas bien establecidas.

35 En otra realización, el cultivo de células vegetales de la invención procede de una fuente de células diferenciadas (de cualquiera de las partes de la planta del género *Centella*), siendo sometidas previamente dichas células diferenciadas a un tratamiento para la inducción de callos (masa de células vegetales indiferenciadas) con el fin de producir las cantidades de madecasósido). Ejemplos de medios de inducción de callos incluyen Murashige y Skoog (MS) suplementado con azúcar (Sacarosa), 6-benciladenina (BA) y ácido 1-naftalenoacético (NAA). Una vez
40 inducidos los callos, ejemplos de medios de crecimiento incluyen MS suplementado con azúcares (sacarosa), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y de N1-(2-cloro-4-piridil)-N2 fenilurea (4PU-30).

45 En otra realización preferida más, el cultivo de células vegetales de acuerdo con la invención está en forma de un lisado de cultivos de células vegetales, también denominado cultivo de células vegetales lisadas o, simplemente, lisado.

50 El lisado de cultivos de células vegetales se obtiene, preferentemente, mediante rotura mecánica de las células del cultivos de células vegetales y posterior filtración a través de una malla de 50 a 150 μm . Otros medios para lisar los cultivos de células vegetales también son aplicables siempre que la mezcla final sea adecuada para administrar y usar en productos derivados, tales como composiciones farmacéuticas. Ejemplos de dichos medios incluyen la congelación a una temperatura muy baja.

El cultivo de células vegetales de acuerdo con la invención es obtenible por un método que incluye:

- 55 a) cultivar por suspensión celular una célula vegetal indiferenciada de una célula vegetal de una planta del género *Centella* para obtener un cultivo en fase estacionaria, y
b) añadir 3 dosis de un compuesto de jasmonato al cultivo en fase estacionaria de la etapa a), en el que cada una de las dosis añadidas corresponde a una cantidad tal de compuesto de jasmonato que la concentración final al final de cada adición es de 80 μM a 150 μM ; y donde las tres dosis del compuesto de jasmonato se añaden con la pauta siguiente:
60 (i) la primera dosis una vez que el cultivo de la etapa a) ha alcanzado la fase de crecimiento estacionaria;
(ii) la segunda dosis se añade de 3 a 5 días después con respecto a la primera adición;
(iii) la tercera dosis se añade de 8 a 11 días después con respecto a la primera adición.

Generalmente, la primera dosis es la dosis que comienza la etapa b) del procedimiento de obtención del cultivo de células vegetales. La etapa a) de crecimiento o cultivo está, generalmente, controlada o seguida por medio de ensayos turbidimétricos y determinación del volumen de empaquetado.

Esta realización también se puede formular como procedimiento de obtención de un cultivo de células vegetales como se ha definido anteriormente, en el que el compuesto de jasmonato se añade tres veces con la pauta siguiente: Al principio de la etapa b), es decir cuando el cultivo de crecimiento ha alcanzado su fase de crecimiento estacionario; de 3 a 5 días más tarde respecto de la primera adición; y de 8 a 11 días más tarde respecto de la primera adición.

En una realización preferida del cultivo de células vegetales obtenible por el procedimiento de acuerdo de la invención, las células vegetales indiferenciadas de la etapa a) son células de una fuente de callo subcultivado. Esta fuente de callo se puede obtener de explantes de partes diferentes de una planta del género *Centella*, en el que los explantes se tratan en un medio adecuado para obtener, finalmente, un cultivo de callos solidificados establecido. Ejemplos de medios para obtener callos se han divulgado anteriormente e incluyen, entre otros, medio MS suplementado con azúcar y otros compuestos. Como alternativa, las células vegetales indiferenciadas de la etapa a) son células de otros cultivos en suspensión de células indiferenciadas.

Medios adecuados para el cultivo en suspensión celular incluyen los medios Murashige & Skoog (MS), Gamborg's (B5) y Linsmaier & Skoog (LS).

En otra realización preferida, las células de la etapa a) derivan de frutos, hojas, brotes, yemas, raíces, tallos, semillas y flores. Como alternativa, las células de la etapa a) derivan de tejido meristemático. El meristemo es el tejido en la mayoría de las plantas compuesto por células indiferenciadas (células meristemáticas), que se encuentra en zonas de la planta en la que puede tener lugar crecimiento. Las células meristemáticas dan lugar a varios órganos de la planta y mantienen el crecimiento de la planta. Las células meristemáticas con frecuencia se comparan con las células madre en animales, que tienen un comportamiento y una función análogos, ya que no poseen ningún destino final definido.

En una realización preferida del cultivo de células vegetales obtenible por el procedimiento de la invención, el compuesto de jasmonato se proporciona dentro del cultivo en suspensión en concentraciones finales preferidas del compuesto de jasmonato de 90 μM a 120 μM . Más preferidas de 95 μM a 100 μM . También se prefieren las concentraciones de 96, 97, 98, 99 y 100 μM .

El compuesto de jasmonato se selecciona, preferentemente, de un modo tal que es un compuesto hidrosoluble. Esto permite que se aplique fácilmente en el cultivo en medio líquido. No obstante, también se puede usar ácido jasmónico. Del mismo modo, si la solubilidad se fuerza con las condiciones adecuadas de presión también se pueden usar los compuestos volátiles de jasmonato. Como alternativa, los compuestos volátiles se pueden usar si el procedimiento se realiza en una atmósfera saturada de dicho compuesto de jasmonato deseado, con el fin de forzar el equilibrio de líquido/gas para alcanzar la concentración deseada en el cultivo.

En una realización preferida, el compuesto de jasmonato se selecciona del grupo constituido por jasmonato de metilo, jasmonato de etilo y jasmonato de propilo, siendo altamente preferido el jasmonato de metilo aplicado en las pautas y a las concentraciones indicadas anteriormente.

El cultivo de células vegetales de la invención es obtenible por un procedimiento que comprende además la etapa de lisar el cultivo de células vegetales una vez que el periodo o la etapa que incluye la pauta de inducción (etapa b con tres dosis de un compuesto derivado de jasmonato) ha finalizado.

En una realización preferida, la lisis se realiza con un dispositivo de homogeneización y, después, la mezcla homogeneizada se filtra a través de un filtro con un diámetro del poro comprendido de 50 a 150 μm , preferentemente un filtro de diámetro de poro de 100 μm . El lisado del cultivo celular filtrado se puede someter a liofilización o desecación por pulverización con el fin de evaporar el agua (principalmente) o para conservar el lisado. Como alternativa, el lisado del cultivo celular se puede mantener a temperatura controlada en suspensión líquida y, en caso necesario, se añaden conservantes adecuados.

Como se ilustrará a modo de ejemplo, el cultivo de células vegetales de acuerdo con la invención, así como el lisado del cultivo de células vegetales, se pueden usar como medicamento.

Por tanto, el cultivo de células vegetales de la invención con el porcentaje en peso de madecasósido comprendido del 85 % al 95 % en peso, y una cantidad de asiaticósido del 5 % al 15 % respecto al peso total de los centelósidos

se puede aplicar directamente o como ingrediente de una composición farmacéutica. Las células vegetales se pueden añadir como células enteras, así como en forma del cultivo celular lisado. La composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del cultivo de células vegetales de la invención junto con cualquier excipiente y/o vehículo farmacéutico aceptable

5 En una realización, cultivo de células vegetales es, preferentemente, para usar como agente de reparación de tejidos. Este aspecto también se puede formular como procedimiento para tratar y/o prevenir el daño tisular, es decir el daño tisular tópico en la piel (epidermis) o en la mucosa, donde el procedimiento comprende administrar al sujeto que lo necesite un cultivo de células vegetales del género *Centella* que comprende una cantidad de madecasósido del 85 % al 95 % en peso, y una cantidad de asiaticósido del 5 % al 15 % en peso, siendo el % en peso del madecasósido y el asiaticósido respecto al peso total de los centellósidos en el cultivo celular, y obtenible por el procedimiento descrito más arriba. Este aspecto se puede formular alternativamente como el uso de un cultivo de células vegetales del género *Centella* que comprende una cantidad de madecasósido del 85 % al 95 % en peso, y una cantidad de asiaticósido del 5 % al 15 % en peso, siendo el % en peso del madecasósido y el asiaticósido respecto al peso total de los centellósidos en el cultivo celular, y obtenible por el procedimiento descrito más arriba para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención del daño tisular, es decir daño tisular tópico en la piel (epidermis) o en la mucosa.

20 El cultivo de células vegetales de acuerdo con la invención, así como el lisado del cultivo de células vegetales, también se pueden usar como agente cosmético. Por tanto, el cultivo de células vegetales de la invención con el porcentaje en peso de madecasósido comprendido del 85 % al 95 % y una cantidad de asiaticósido del 5 % al 15 % en peso, respecto al peso total de los centellósidos se puede aplicar directamente o como ingrediente de una composición cosmética. Las células vegetales se pueden añadir como células enteras, así como en forma del cultivo celular lisado. La composición cosmética comprende una cantidad cosméticamente eficaz del cultivo de células vegetales de la invención junto con cualquier excipiente y/o vehículo cosmético aceptable.

25 Adicionalmente, el cultivo de células vegetales de acuerdo con la invención, así como el lisado del cultivo de células vegetales, también se pueden usar como dispositivo médico una vez formulado como ingredientes en composiciones de dispositivos médicos. Por tanto, el cultivo de células vegetales de la invención con el porcentaje en peso de madecasósido comprendido del 85 % al 95 % y una cantidad de asiaticósido del 5 % al 15 % en peso, respecto al peso total de los centellósidos se puede aplicar directamente o como ingrediente de un dispositivo médico. Las células vegetales se pueden añadir como células enteras, así como en forma del cultivo celular lisado. La composición del dispositivo médico comprende una cantidad eficaz del cultivo de células vegetales de la invención junto con cualquier excipiente y/o vehículo aceptable y/o cualquier otro componente que define el dispositivo médico (es decir: cualquier soporte o tela tejida o no tejida).

30 A lo largo de la descripción y reivindicaciones, con la palabra “comprende” y variaciones de la palabra no se pretende excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Además, la palabra “comprende” abarca el caso de “constituido por”. Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones concretas y preferidas descritas en el presente documento.

EJEMPLOS

45 Ejemplo 1: Obtención de cultivos celulares vegetales de *Centella asiatica*.

50 Se obtuvieron callos usando medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con 25-40 g l-1 de sacarosa (por ejemplo, 35 g l-1), entre 2-4 mg l-1 de 6-benciladenina (BA) (por ejemplo 3,3 mg l-1) y entre 2-4 mg l-1 de ácido 1-naftalenoacético (NAA) (por ejemplo, 2,5 mg l-1), que proporcionó una buena inducción de callos. Como medio de crecimiento se usó medio MS suplementado con 25-40 g l-1 de sacarosa (por ejemplo, 40 g l-1), entre 1,5-4 mg l-1 de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (por ejemplo 2,5 mg l-1) y entre 2,5-4 mg l-1 de N1-(2-cloro-4-piridil)-N2 fenilurea (4PU-30) (por ejemplo 2,5 mg l-1) para obtener callos grandes y friables.

55 Para establecer cultivos en suspensión celular se inocularon piezas de callos (20 g) en matraces de 500 ml que contienen 200 ml de medio líquido MS suplementado con 2—30 g de sacarosa (por ejemplo, 20 g), entre 1-3 mg l-1 de 2,4-D (por ejemplo, 1 mg l-1) y entre 0,1-1 g l-1 de BA (por ejemplo, 0,8 g l-1) y se colocaron en un agitador rotatorio a 100 rpm en oscuridad a 25 °C. Los cultivos celulares se pasaron a través de un filtro de nylon de 60-µm cada 2 semanas durante 6 meses para obtener un cultivo en suspensión celular fina.

60 Para los ensayos de suspensión celular, se inocularon 20 g de células (peso fresco, PF) en 200 ml del medio líquido mencionado anteriormente en matraces de 500 ml con o sin el agente de inducción y se mantuvieron en un agitador rotatorio a 100 rpm en oscuridad a 25 °C. Tras 12 días de crecimiento (cuando se alcanzó la fase de crecimiento

estacionaria), la suspensión celular se provocó con jasmonato de metilo (MeJA) (100 µM) los días 12, 16 y 22 desde el inicio de la suspensión. Otros posibles días de inducción incluyen, una parte del día en el que se alcanza la fase de crecimiento estacionaria y se inicia el programa de inducción, los días comprendidos de 3 a 5 días después de la primera inducción; y los días comprendidos de 8 a 11 días después de la primera inducción.

5 Tras el periodo de inducción, el cultivo provocado se lisó con un homogeneizador a 10000-15000 rpm y se filtró a través de una malla de nylon con un diámetro de poro de 100 µm.

La mezcla contenía:

- 10 - compuestos del medio de cultivo no consumidos por las células;
 - compuestos secretados por las células al medio;
 - compuestos intracelulares solubles; y
 - compuestos no solubles de membrana celular con un tamaño inferior a 100 µm.

15 El producto final fue un lisado de cultivo celular, con un contenido elevado de madecasósido respecto a los centellósidos totales en las células de *C. asiatica*.

El análisis HPLC de lisado de cultivo celular indicó que la cantidad de madecasósido fue del 90 % en peso del peso total de los centellósidos (asiaticósido, ácido asiático y ácido madecásico que representan el 10 % en peso del peso total de los centellósidos).

20 Las cantidades de centellósidos se determinaron como se indica en el Ejemplo 2 más adelante. Las áreas bajo las curvas (o picos, AUC) de cada centellósido del análisis HPLC se calcularon y correlacionaron con la cantidad de cada compuesto. Por último, el porcentaje en peso de cada centellósido (madecasósido, asiaticósido, ácido madecásico y ácido asiático) en relación con el peso total de centellósidos en el lisado se determinó como:

$$\% = [(\text{a.u.c de un centellósido específico}) / (\sum \text{a.u.c de todos los centellósidos})] \times 100$$

25 En la FIG. 2, se muestra la cantidad (mg/l) de madecasósido (M) y de asiaticósido (A) obtenida en el cultivo de suspensión celular con jasmonato de metilo (100 µM). Las barras de la izquierda de la figura muestran la cantidad determinada con una (1X) adición (o tratamiento; (T)) de jasmonato de metilo. Las barras de la derecha corresponden a las cantidades de madecasósido (M) y asiaticósido (A) obtenidas con la pauta de inducción descrita anteriormente; es decir, tres adiciones (3X) los días 12, 16 y 22 desde el inicio de la suspensión y determinadas el día 27 desde el inicio de la suspensión. Los datos representados en la FIG. 2 se corresponden con las concentraciones totales de la fracción celular y la fracción del medio líquido del cultivo.

Como se puede ver, con las tres adiciones de jasmonato de metilo la cantidad absoluta de madecasósido fue de 8 a 9 veces mayor que la cantidad de asiaticósido, concretamente 8,5 veces mayor.

40 Ejemplo 2. Determinación de centellósidos (HPLC).

La cuantificación de los cuatro centellósidos (asiaticósido, madecasósido, ácido asiático y ácido madecásico) se llevó a cabo mediante cromatografía de líquido de alto rendimiento (HPLC).

45 Para la extracción celular, 1 g del polvo fino (liofilizado) se sonicó primero en metanol:agua (9:1, v/v; 2 × 25 ml) durante 2 horas a temperatura ambiente y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm (Waters Millipore). El filtrado se evaporó hasta sequedad. El extracto seco se disolvió en 1 ml de metanol y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm (Waters Millipore) y el filtrado transparente se usó para análisis HPLC.

50 El análisis HPLC-UV se realizó a temperatura ambiente con una columna Spherisorb 5 µm DOS2 4,6x250 mm (Waters, Milford, MA, EE.UU.) usando una elución por gradiente, cieno los eluyentes acetonitrilo (A) y agua con dihidrógenofosfato amónico 10 mM (pH 2,5 con ácido ortofosfórico) (B) de acuerdo con el siguiente perfil: 0–15 min, 80% de A; 15–30 min, 62 % de A; 30–37 min, 30 % de A; 37–40 min, 80 % de A. El caudal fue 1 ml min⁻¹ y el detector se fijó en 214 nm.

55 Ejemplo 3. Ensayo comparativo en un modelo in vitro

Con el fin de ilustrar los ventajosos efectos del cultivo de células vegetales de la invención, después se divulga un ensayo con composiciones diferentes que comprenden un lisado de cultivos celulares de *Centella asiatica* de acuerdo con la invención. La capacidad de las composiciones para inducir síntesis de colágeno de este lisado de cultivos celulares se analiza en un cultivo de fibroblastos dérmicos humanos.

La Tabla 1 muestra las características de las composiciones analizadas.

Tabla 1- Productos analizados

| Materia prima | Concentración (% en peso) | | | |
|--|---------------------------|---------|---------|---------|
| | PR/52/A | PR/53/A | PR/54/A | PR/55/A |
| Lisado de cultivo celular de <i>Centella asiatica</i> | 10,000 | 5,000 | 1,000 | 0 |
| Extracto de <i>Centella asiatica</i> con un 90 % en peso de madecasósido respecto a todos los centelósidos (de Guangxi Changzhou Natural products Development (China); extracto en polvo de la planta entera desecada) | 0 | 0 | 0 | 0,500 |
| Excipientes (disolventes, emolientes, tampones del pH, agentes de gelificación, antioxidantes y agentes conservantes). | csp 100 * | | | |

* "c.s.p" significa "necesario para".

- 5 El objetivo de este ensayo era ver el efecto de las formulaciones enumeradas en la Tabla 1. Tres de ellas (PR/52/A; PR/53/A; and PR/54/A) contenían un lisado de cultivo celular de *Centella asiatica* preparado como se expone en el Ejemplo 1. Contenían una cantidad de madecasósido comprendida del 8 % al 95 %, es decir 90 % en peso respecto del peso total de centelósidos, obtenidos tras el tratamiento con el agente de inducción jasmonato de metilo. La otra formulación (PR/55/A) contenía una cantidad de un extracto de *Centella asiatica*.
- 10 La prueba consistió en la evaluación del efecto en la síntesis de colágeno en fibroblastos de dermis humanos tras 24 horas de tratamiento con estas formulaciones, cada una aplicada a diferentes concentraciones no tóxicas (100, 250 y 500 µg/ml) previamente determinadas.
- 15 El colágeno se determinó con un ensayo colorimétrico usando el agente colorante Sirius Red (Direct red 80), que se une específicamente a una secuencia de triple hélice del colágeno nativo. Como control positivo (Control +) se usó el factor beta transformante de crecimiento (TGF-β). Como control negativo (Control -) se usó medio de cultivo.
- 20 Las células se cultivaron a 37 °C durante 24 horas (50 x10³ células/cm²). La formulación analizada se preparó y añadió a las células a las tres concentraciones indicadas anteriormente y se incubó a 37 °C durante 24 horas adicionales. Para cada concentración analizada se realizaron las determinaciones siguientes: a) cuantificación de colágeno, y b) cuantificación de células (tripsina: 0,2 % p/v).
- 25 Los resultados del ensayo se representan en la FIG. 1, en la que la cantidad de colágeno en términos de µg/10⁶ de fibroblastos humanos se indica en forma de barras para cada concentración (100, 250, y 500 µg/ml) analizada para cada formulación. Cuando se muestran tres barras para una formulación determinada, la barra de la izquierda muestra el resultado a una concentración final en el cultivo de 100 µg/ml; la barra del medio muestra los resultados a 250 µg/ml; y la barra de la derecha muestra los resultados a 500 µg/ml. Las líneas verticales muestran la desviación estándar de los resultados.
- 30 El crecimiento celular fue similar en el control negativo y en los cultivos tratados con las formulaciones, de modo que se confirma que las concentraciones analizadas (o dosis seleccionadas) de 100, 250 y 500 µg/ml eran no citotóxicas.
- 35 Como se puede deducir de esta FIG. 1, la formulación que contiene 10 % en peso del lisado de cultivo celular de *Centella asiatica* de la invención (PR/52/A) pudo estimular la secreción de colágeno en el medio de cultivo de 100 a 500 µg/ml, siendo máxima a 250 µg/ml. Esto significa 42 % más respecto al control negativo. La estimulación representó, a su vez, el 80 % de la estimulación del control positivo (TGF-β).
- 40 Por otro lado, la formulación que contiene 5 % en peso del lisado de cultivo celular de *Centella asiatica* de la invención (PR/53/A) estimuló la secreción de colágeno (síntesis) entre 100 y 500 µg/ml, siendo también máxima a 250 µg/ml. Esto representó un 65 % más respecto al control negativo. La estimulación fue un sobresaliente 127 % en relación con la inducción por el control positivo.
- 45 La formulación que contiene el 1 % en peso del lisado de cultivo celular de *Centella asiatica* de la invención (PR/54/A) estimuló la secreción de colágeno (síntesis) entre 100 y 250 µg/ml, siendo también máxima a 250 µg/ml. La cantidad de colágeno secretado representó un incremento del 31 % respecto al control negativo.

5 Por último, la formulación que comprende 0,5 % en peso de un extracto de *Centella asiatica* con 90 % de madecassósido (PR/55/A), es decir un polvo de un extracto de la planta entera desecada, purificado y titulado (TECA) estimuló la secreción de colágeno (síntesis) entre 100 y 500 µg/ml, siendo también máxima a 250 µg/ml. La cantidad de colágeno secretado representó un incremento del 55 % respecto al control negativo y el incremento fue comprable al del control positivo.

10 Todos estos datos permiten concluir que las cuatro formulaciones podían estimular la síntesis de colágeno, ya que la cantidad de colágeno obtenida en los fibroblastos cultivados con todas las concentraciones de las cuatro formulaciones analizadas obtenidas fue mayor que la cantidad en el control negativo. Es interesante que la formulación que comprende 5 % en peso del lisado de cultivo celular de *Centella asiatica* de la invención (PR/53/A) tenía un efecto similar al del control positivo, incluso mayor. Además, esta formulación (5 % en peso del lisado de cultivo celular de *Centella asiatica* de la invención) tenía un efecto mayor que la formulación que comprende el extracto de la planta.

15 Ejemplo 4. Composición con lisado de un cultivo de células vegetales de *Centella asiatica*

20 A continuación se proporciona un ejemplo de composición cualitativa que incluye un lisado de cultivo celular de *Centella asiatica* que se puede usar como agente de reparación tisular.

Esta composición incluye como agente activo el lisado de un cultivo de células vegetales de *Centella asiatica* de acuerdo con la invención y, como excipientes, disolventes (por ejemplo, agua), agentes de viscosidad, tampones del pH, conservantes, antioxidantes y emolientes. Un ejemplo no limitante se ilustra según sigue:

| |
|---|
| Ingrediente |
| AGUA |
| Lisado de un cultivo de células vegetales de <i>Centella asiatica</i> |
| Crospolímero de acrilatos/acrilato de alquilo C10-30 |
| TRIETANOLAMINA |
| IMIDAZOLIDINILUREA |
| EDETATO DISÓDICO |
| ÁCIDO ASCÓRBICO |
| PROPILENGLICOL |
| PROPILPARABEN |
| METILPARABEN |
| EXTRACTO DE CAMOMILA (extracto de <i>Chamomilla recutita</i>) |
| EXTRACTO DE MALVA (extracto de <i>malva sylvestris</i>) |

25 Todos los datos expuestos en el presente documento confirman que los cultivos de células vegetales de una planta del género *Centella* de la invención, son alternativas ventajosas, incluso opciones mejores, respecto a los extractos tradicionales de la planta. En primer lugar, dado que el procedimiento de obtención del cultivo de células vegetales es altamente reproducible y no tan complejo como un procedimiento de extracción. Después, porque en caso de que se desee una gran cantidad de uno de los compuestos producidos por la planta *Centella asiatica*, el cultivo de células vegetales de la invención y el procedimiento de obtención son más fáciles que cualquier proceso que implica la extracción en un medio adecuado y otras etapas para enriquecer el extracto en el compuesto deseado. Esto es así porque la invención proporciona una pauta de inducción con un agente de inducción específico que, de un modo inesperado, da lugar a un enriquecimiento selectivo en madecassósido con respecto a los centellósidos totales producidos durante dicha pauta de inducción.

REIVINDICACIONES

- 5 1. - Un cultivo de células vegetales de una planta del género *Centella*, comprendiendo dicho cultivo de células vegetales una cantidad de madecasósido comprendida del 85 % al 95 % en peso, y una cantidad de asiaticósido del 5 % al 15 % en peso, siendo el % en peso del madecasósido y el asiaticósido respecto al peso total de los centellósidos en el cultivo celular, y obtenible por:
- 10 a) cultivo mediante suspensión celular de una célula vegetal indiferenciada de una planta del género *Centella* en un medio de crecimiento adecuado durante un periodo comprendido de 8 a 15 días hasta que se alcanza la fase de crecimiento estacionario; para obtener un cultivo en fase estacionaria;
- 15 b) adición de 3 dosis de un compuesto de jasmonato al cultivo en fase estacionaria de la etapa a), en el que cada una de las dosis añadidas corresponde a una cantidad tal de compuesto de jasmonato que la concentración final al final de cada adición es de 80 µM a 150 µM; y donde las tres dosis del compuesto de jasmonato se añaden con la pauta siguiente:
- (i) la primera dosis una vez que el cultivo de la etapa a) ha alcanzado la fase de crecimiento estacionaria;
- (ii) la segunda dosis se añade de 3 a 5 días después con respecto a la primera adición;
- (iii) la tercera dosis se añade de 8 a 11 días después con respecto a la primera adición.
- 20 2. - El cultivo de células vegetales de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el madecasósido está en una cantidad del 90 % en peso con respecto al peso total de los centellósidos en el cultivo celular.
- 25 3. - El cultivo de células vegetales de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la planta del género *Centella* es *Centella asiatica*.
- 30 4. - El cultivo de células vegetales de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es un lisado y es obtenible mediante el lisado del cultivo de células vegetales después de la etapa (b).
- 5.- El cultivo de células vegetales de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto de jasmonato se selecciona del grupo constituido por jasmonato de metilo, jasmonato de etilo y jasmonato de propilo.
- 35 6.- El cultivo de células vegetales de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el compuesto de jasmonato es jasmonato de metilo.
- 7.- Un cultivo de células vegetales como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para usar como medicamento.
- 40 8.- El cultivo de células vegetales de la reivindicación 7 como agente reparador de tejidos.
- 9.- Una composición farmacéutica o cosmética que comprende una cantidad efectiva terapéuticamente o una cantidad efectiva cosméticamente del cultivo de células vegetales tal cual definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, junto con cualquier excipiente y/o vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable.

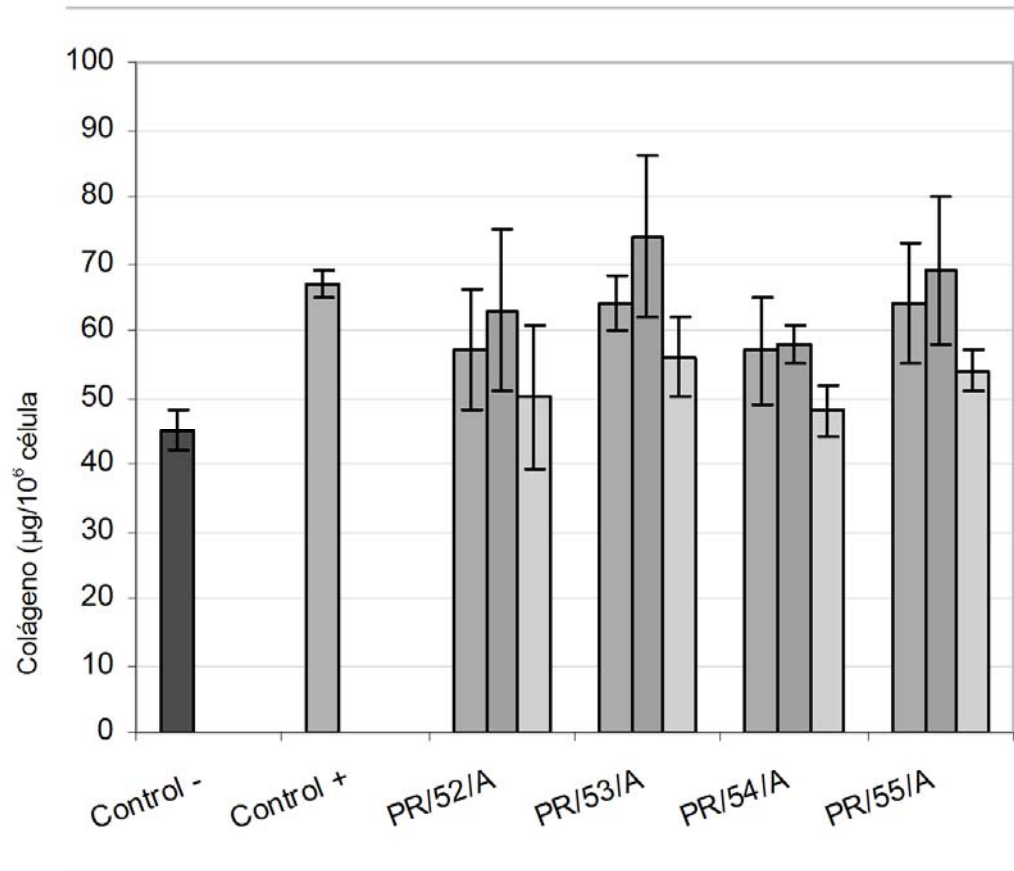


FIG. 1

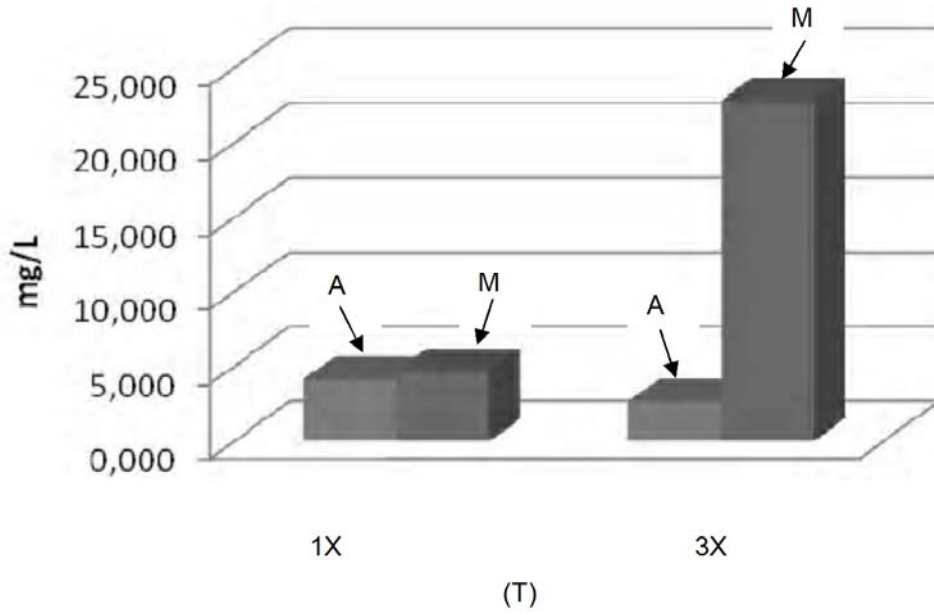


FIG. 2

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

Documentos de patentes citados en la descripción

10 • EP867447

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

15 • Maquart et al., "Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by a triterpene extracted from *Centella asiatica*". Conn. Tissue Res -1990, vol. 24, pág. 107-120.

20 • Mulabagal et al., "Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites", International Journal of Applied Science, Engineering and Technology-2004, Vol. 2, pág.: 101-153.

• Bonfill et al., "Production of centellosides and phytosterols in cell suspension cultures of *Centella asiatica*", Plant Cell Tiss Organ Cult – 2011, Vol. N° 104, pág.: 61-67.

25 Bonfill et al., 2010, Plant cell, tissue and organ culture, 104(1), 61-67