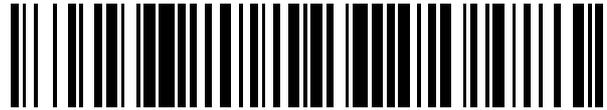


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 455**

51 Int. Cl.:

A61K 36/185 (2006.01)
A61K 36/23 (2006.01)
A61K 36/28 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012** **E 12382352 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016** **EP 2708232**

54 Título: **Composición que comprende un cultivo de células vegetales del género Centella**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.05.2017

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. y
BELLO NAVARRO, MARTA.

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 614 455 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

Composición que comprende un cultivo de células vegetales del género *Centella*.

5 La presente invención está relacionada con el campo de la farmacia, dispositivos médicos y cosmética, en particular con composiciones que comprenden un cultivo de células vegetales de una planta del género *Centella*. También está relacionada con métodos para obtener dichas composiciones, y con usos de estas composiciones como agentes de reparación tisular.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Existen varias composiciones que incluyen extractos de plantas del género *Centella*, concretamente de la especie *Centella asiatica* (*C. asiatica*), también llamada Gotu Kola, la hierba de los tigres y pennywort indio. Los extractos de esta planta se han usado ampliamente en el tratamiento de afecciones dermatológicas, para tratar heridas, rasguños, quemaduras superficiales, eccemas, o como agente anti-inflamatorio.

El uso extendido de extractos de *Centella asiatica* en composiciones cutáneas regenerantes, así como en preparaciones reparadoras de tejido dañado, se debe a la capacidad de algunos de los compuestos de la planta, que son capaces de promover la síntesis de colágeno. Algunos de estos constituyentes activos de *Centella asiatica* son triterpenoides pentacíclicos, encontrados como geninas (ácido asiático y madecásico) y heterósidos (asiaticósido y madecasósido) en la planta. Como estos compuestos están asociados con *Centella*, también se conocen como centellósidos. 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, describen, de hecho, que el asiaticósido, el ácido asiático y madecásico promueven la síntesis de colágeno de un modo dependiente de dosis.

25 Bonfill et al., 2010, *Plant cell, tissue and organ culture*, 104(1), 61-67 describe un procedimiento de elicitación de centellósidos de una suspensión celular de *Centella asiatica*, que emplea una única adición de jasmonato de metilo (MeJA), que resulta en la presencia en proporciones similares de madecasósido y asiaticósido. Las propiedades de cicatrización de los centellósidos se describen como conocidas.

30 Los centellósidos son un tipo de metabolitos secundarios presentes en *Centella asiatica*, y se consideran implicados en la respuesta a estímulos de estrés. Los metabolitos secundarios son compuestos sintetizados por las células vegetales, y aunque no tienen una función aparente en el metabolismo principal de la planta, desempeñan importantes tareas secundarias, por ejemplo actuando como repelentes de insectos, moléculas de defensa contra microorganismos, o contra estímulos externos (corte de algunas partes de la planta, presencia de venenos, etc.). Algunos de estos compuestos derivados de la planta son útiles como ingredientes farmacológicos activos. No obstante, la síntesis química de los mismos a veces es difícil y por esta razón se extraen de las plantas, y se concentran y purifican adicionalmente si se requiere.

40 Ejemplos de extractos de *Centella asiatica* incluyen extractos acuosos, extractos alcohólicos, y extractos con otros disolventes. La extracción se realiza habitualmente de diferentes partes de la planta incluyendo las hojas, tallos, frutos, semillas, ramas, etc.

45 El extracto titulado de *Centella asiatica* (TECA del inglés "Titrated Extract of *Centella asiatica*") es uno de los extractos más conocidos de esta planta. Incluye asiaticósido (40% en peso), y ácido asiático y madecásico (60% en peso). El madecasósido no está presente, ya que debido al procedimiento 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.

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

55 Los procedimientos de extracción, aunque estandarizados, tienen el problema de que llegan a ser bastante caros, especialmente cuando el objetivo es una composición enriquecida en un compuesto específico o grupo de compuestos de interés de la planta seleccionada.

60 Un modo alternativo de obtener un compuesto de interés de una planta que actúa como fábrica es usando la tecnología de cultivos de células vegetales. Los cultivos de células vegetales permiten el aislamiento de células de diferentes partes de la planta (hojas, frutos, tallo, raíces, brotes, etc.), dichas partes de la planta se cultivan adicionalmente en condiciones controladas para obtener un compuesto deseado. Con la tecnología de los cultivos de células vegetales, las células vegetales aisladas generalmente se someten a desdiferenciación celular hasta que

se alcanza la totipotencia. Estas células totipotentes desdiferenciadas entonces se convierten en cualquier tejido celular vegetal tras estimulación adecuada. Es por esta razón que estas células desdiferenciadas también se llaman células madre vegetales.

5 Estas células vegetales totipotentes se usan como fábricas de metabolitos o compuestos de interés una vez se han estimulado con compuestos específicos (también conocidos como agentes inductores). Esta tecnología se ejemplifica en el documento de 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. Mulabagal et al. describen métodos de cultivo en callo y suspensión para la producción de metabolitos secundarios bioactivos a partir de plantas medicinales.

La ventaja principal de la tecnología de cultivos de células vegetales es que permite proporcionar una fuente continua y fiable de agentes farmacéuticos derivados de plantas.

15 En el caso particular de *Centella asiatica*, se ha usado una suspensión de células totipotentes desdiferenciadas para obtener fitosteroles y centelósidos. El procedimiento se describe en 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. En este documento, se establecieron suspensiones celulares de *C. asiatica* y se trataron con dos concentraciones (100 y 200 µM) del agente inductor (estimulador) jasmonato de metilo (MeJA). La producción máxima de centelósido se observó en la fase de crecimiento estacionario, alcanzando 0,16 mg/g de peso seco en el día 25 del cultivo en el control y 1,11 mg/g en día 15 en los cultivos producidos con MeJA. Mediante esta metodología se obtuvo un porcentaje en peso del 54,5% de madecasósido y del 45,5% de asiaticósido respecto a la cantidad total de centelósidos.

25 Aunque todas las composiciones conocidas que comprenden componentes de *Centella asiatica* (principalmente extractos de la planta) tienen propiedades interesantes en términos de promoción de la reparación tisular, especialmente tejido dermatológico, sigue existiendo la necesidad de composiciones alternativas con alta capacidad para inducir la síntesis de colágeno.

30 EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La invención es como se expone en las reivindicaciones independientes. Todas las otras realizaciones se describen solo como ilustrativas y cualquier declaración de que podrían ser también parte de la invención, u otras declaraciones similares, ha de ser considerada en el contexto de la solicitud tal cual fue presentada y no altera el alcance de las reivindicaciones.

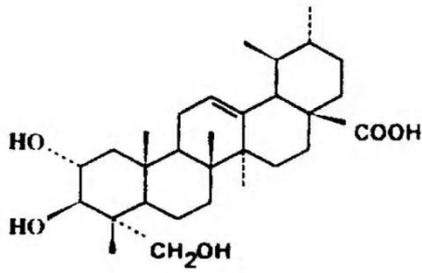
En este documento se proporciona una composición, que puede ser una composición farmacéutica, cosmética o de dispositivo médico, que tiene buenas propiedades como agente inductor de la síntesis de colágeno, y puede usarse como agente de reparación tisular o como agente cosmético de cuidado de la piel, comprendiendo dicha composición una cantidad eficaz del compuesto madecasósido, proporcionándose dicha cantidad de madecasósido por una preparación de una planta del género *Centella*.

En un primer aspecto, por tanto, la invención está relacionada con una composición que comprende una cantidad eficaz de un cultivo de células vegetales de una planta del género *Centella*, comprendiendo dicho cultivo de células vegetales una cantidad de madecasósido comprendida del 75% al 95% en peso respecto al peso total de centelósidos en el cultivo celular.

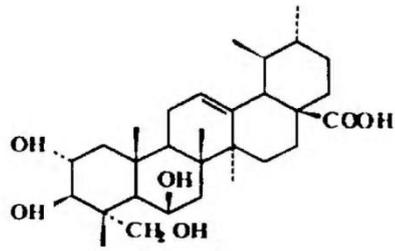
La reparación de los tejidos dañados es el resultado, como se ilustrará a continuación en los ejemplos, del cultivo de células vegetales de una planta del género *Centella* con la cantidad específica de madecasósido. Además, otros componentes de la composición actúan junto con el cultivo de células vegetales, y ayudan a promover también este efecto.

El efecto cosmético como agente de cuidado de la piel también se debe al cultivo de células vegetales de una planta del género *Centella* y puede mejorarse con otros ingredientes, fitosteroles, flavonoides, antioxidantes celulares naturales, etc.

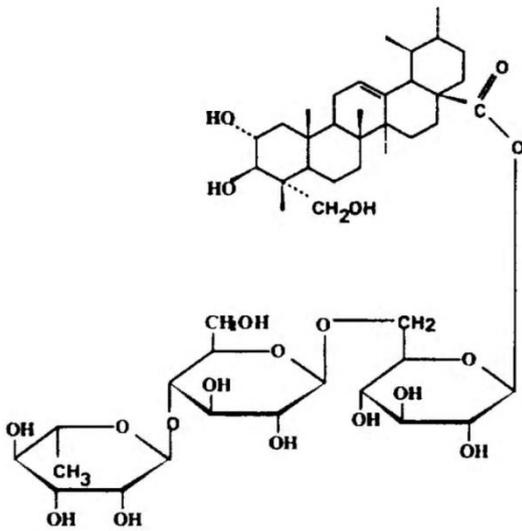
Los centelósidos principales son, como se ha indicado anteriormente, las geninas ácido asiático y madecásico, y también los heterósidos asiaticósido y madecasósido, los cuatro representados en las siguientes fórmulas (I) a (IV):



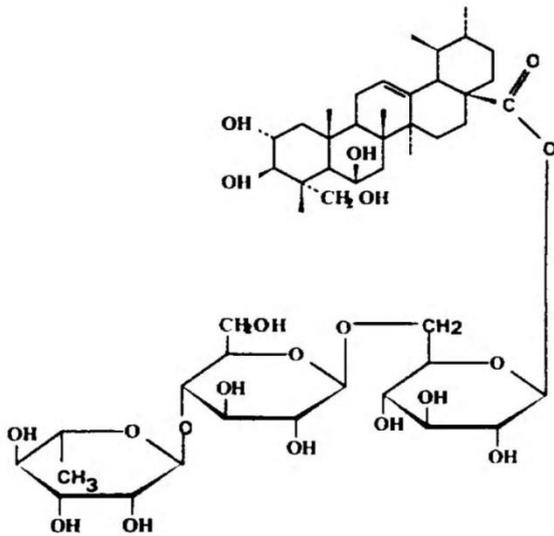
(I) Ácido asiático



(II) Ácido madecásico



(III) Asiaticósido



(IV) Madecasósido

Durante varios años se ha creído que el asiaticósido era el componente principal de los centellósidos derivados de las plantas del género *Centella* que tienen elevadas capacidades de restaurar tejidos dañados, tales como la epidermis, debido a sus efectos como inductor de la síntesis de colágeno. No obstante, los inventores proponen el uso de otro centellósido, concretamente el madecasósido como agente de reparación tisular.

Otro aspecto de la presente invención es un dispositivo médico que comprende la composición definida anteriormente. En otro aspecto, la invención está relacionada con la composición para su uso como dispositivo médico.

5 Un dispositivo médico permite la aplicación de la composición a una superficie deseada de un tejido para tratarlo o cuidarlo de forma cosmética, farmacéutica y/o mediante el propio dispositivo médico.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una composición cosmética tópica o del dispositivo médico definido anteriormente como agente de cuidado de la piel, donde el cuidado de la piel comprende mejorar al menos uno de los siguientes síntomas: aspereza, deshidratación, tirantez, y ausencia de elasticidad.

15 Todas las afecciones que pueden tratarse con la composición de la invención, de forma cosmética, farmacéutica y/o mediante un dispositivo médico, pueden estar causadas debido a intervenciones quirúrgicas, a otras patologías que conllevan la pérdida de síntesis de colágeno por parte de las células como síntoma secundario (estrés, tratamientos quimio y radioterapéuticos, etc.), así como debido al envejecimiento, en particular el envejecimiento de la piel.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 La FIG. 1, referida al Ejemplo 3, es un diagrama de barras que muestra la cantidad de colágeno ($\mu\text{g}/10^6$ células fibroblásticas humanas) sintetizado por fibroblastos humanos después de la adición, en el medio de cultivo, de diferentes composiciones según la invención incluyendo el cultivo de células vegetales del género *Centella*.

25 La FIG. 2, referida al Ejemplo 1, es otro gráfico con 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* sometida al método según la invención. T significa tratamiento o adición de jasmonato de metilo; 1X significa una adición de jasmonato de metilo; 3X significa tres adiciones de jasmonato de metilo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 Todos los términos como se usan aquí en esta solicitud, salvo que se indique otra cosa, se entenderán en su sentido habitual conocido en la técnica. Otras definiciones más específicas para ciertos términos usados en la presente solicitud son como se expone a continuación y se pretende aplicarlos de forma uniforme en toda la memoria descriptiva y reivindicaciones salvo que una definición establecida expresamente de otro modo proporcione una definición más amplia. Las siguientes definiciones se incluyen por motivos de facilitar la comprensión.

35 El término "enriquecido" significa en este documento que el madecasósido es el componente principal del total de centellósidos producidos por el cultivo de células vegetales del género *Centella*, concretamente que representa al menos el 75% en peso del total de centellósidos (asiaticósido, ácido madecásico y ácido asiático) en el cultivo de células vegetales. La cantidad en porcentaje ponderal de madecasósido en el cultivo celular es, de hecho, la representación de la cantidad de cualquier célula individual que constituye dicho cultivo, cualquier célula que contribuye a la cantidad absoluta final del compuesto.

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

45 En el sentido de la presente invención un "cultivo de células vegetales" son células vegetales obtenidas de tejido o células de plantas, que después se cultivan en un receptáculo o recipiente. Los cultivos de células vegetales incluyen tejidos callosos (callos), tejidos cultivados diferenciados o un tejido orgánico cultivado. Los callos son, a su vez, agregados de células vegetales cultivadas que constan de células desdiferenciadas (masa de células vegetales desdiferenciadas) 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, un brote, o un fruto.

55 "Callo" vegetal es una masa de células parenquimáticas desorganizadas obtenidas de tejido vegetal (explantos) para su uso en investigación biológica y biotecnología. En biología vegetal, las células callosas son aquellas células que cubren una herida en la planta. La formación de callos se induce a partir de tejidos vegetales después de esterilización superficial y siembra en un medio de cultivo tisular in vitro. El medio se suplementa con reguladores del

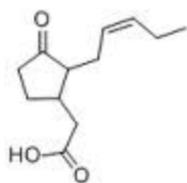
crecimiento vegetal, tales como auxinas, citoquinas y giberelinas, para iniciar la formación de callos o embriogénesis somática.

5 Un "lisado de cultivo de células vegetales" es un cultivo de células vegetales que se ha sometido a disgregación y alteración de las células, mediante sonicación o mecánicamente, mediante un agitador de corte. Con la alteración de las células, se libera el contenido del citoplasma al medio (sólido o líquido), conduciendo de este modo a una mezcla que comprende los diferentes componentes de la célula (compuestos del citoplasma, fragmentos de membrana y compuestos de la célula previamente liberados al medio). El lisado de cultivo de células vegetales también puede obtenerse mediante otros medios incluyendo, como ejemplo no limitante, congelación a muy baja temperatura.

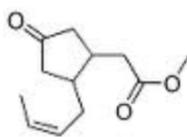
10 En el sentido de la invención un "cultivo de suspensión celular" o "suspensión celular" es un grupo de células desdiferenciadas dispersadas o en suspensión en un medio nutriente líquido (medio de cultivo líquido). La suspensión celular puede comprender células en diversas fases de agregación.

15 En el sentido de la invención un "cultivo en fase estacionaria" o "cultivo en crecimiento" usados en este documento de forma intercambiable, significa un cultivo de células (desdiferenciadas o diferenciadas) de una planta del género *Centella* que se cultiva 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 pueden aplicarse tratamientos adicionales.

20 La expresión "compuesto derivado de jasmonato" o "compuesto de jasmonato", usadas en este documento de forma intercambiable, abarca compuestos derivados del ácido jasmónico de fórmula (A), en el que uno o varios átomos de hidrógeno, concretamente el átomo de hidrógeno del compuesto hidroxilo, se han sustituido por un radical alquilo (C₁-C₃). Ejemplos de radicales alquilo (C₁-C₃) incluyen metilo, etilo, y propilo. Así, algunos de los compuestos derivados de jasmonato son jasmonato de metilo (fórmula (B)), jasmonato de etilo y jasmonato de propilo.



(A)



(B)

25 Un "agente de reparación tisular" debe entenderse como un compuesto o mezcla de compuestos (en esta invención un cultivo de células vegetales o un lisado de cultivo de células vegetales) que debido a su capacidad inherente para recuperar células dañadas, o estructuras intersticiales, concretamente células cutáneas o de la mucosa, promueve la recuperación de la funcionalidad completa del tejido. Un ejemplo de agente de reparación tisular es un compuesto o mezcla de compuestos que permite la síntesis de colágeno.

30 La expresión "un compuesto derivado de ácido hialurónico" o "hialurano" o "compuesto de ácido hialurónico" (usadas de forma intercambiable en este documento) significa el glucosaminoglucano aniónico, no sulfatado, que puede estar en forma ácida, así como en forma de una sal orgánica o inorgánica. El hialuronano es un ingrediente común en productos de cuidado de la piel. La presencia de ácido hialurónico en tejido epitelial ha demostrado promover la proliferación de queratinocitos y aumenta la presencia de ácido retinoico, causando la hidratación de la piel. Estos beneficios hacen del ácido hialurónico un humectante tópico muy eficaz.

35 La expresión "farmacéuticamente aceptable" como se usa en este documento, se refiere a compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, ser humano) sin excesivas toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una proporción razonable beneficio/riesgo. Cada vehículo, excipiente, etc., también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Los vehículos, excipientes, etc. adecuados pueden encontrarse en textos farmacéuticos convencionales, e incluyen, a modo de ejemplo, conservantes, aglutinantes, humectantes, emolientes, y antioxidantes.

40 La expresión "cantidad eficaz" como se usa en este documento, significa una cantidad de un agente activo suficientemente elevada para proporcionar el beneficio deseado (ya sea el tratamiento o la prevención de la enfermedad), pero suficientemente baja para evitar efectos adversos graves dentro del alcance del juicio médico.

45 La expresión "cosméticamente aceptable" o "dermatológicamente aceptable", que en este documento se usan de forma intercambiable, se refiere a los excipientes o vehículos adecuados para su uso en contacto con piel humana sin excesiva toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica, entre otras.

La expresión “agente hidratante” o “humectante” o “agente humectante” que se usan en este documento de forma intercambiable, se refiere a un material que aumenta el contenido de agua de la piel y ayuda a mantenerla suave y lisa.

5 El término agente “emoliente” se refiere a un material que suaviza y calma la piel para corregir la sequedad y escamación de la piel, lubricando la superficie de la piel, fomentando la retención de agua en la piel, y alterando las texturas del producto. Ejemplos no limitantes de emolientes incluyen derivados vegetales de malva (extractos) y derivados vegetales de manzanilla (extractos).

10 El término “disolvente” incluye cualquier líquido de naturaleza orgánica o inorgánica que puede disolver un soluto para obtener una solución. Ejemplos de disolvente inorgánicos incluyen agua. Disolventes orgánicos incluyen disolventes lipófilos y disolventes hidrófilos. El término disolvente “hidrófilo” se refiere a disolventes que son capaces de crear enlaces de hidrógeno, posibilitando que se disuelvan más fácilmente en agua, y en otros disolventes polares. El término disolvente “lipófilo” se refiere a disolventes no polares que tienen poca o ninguna capacidad de formar enlaces de hidrógeno, posibilitando que se disuelvan en grasas, aceites, lípidos, y otros disolventes no polares. Ejemplos de disolventes hidrófilos se refieren a glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol, butilenglicol, dietilenglicol, tetrametilenglicol, o 1,2,3-propanotriol (glicerina). Ejemplos de disolvente lipófilos incluyen derivados de triglicéridos, aceites vegetales, aceites minerales, grasas animales, sus fracciones y mezclas.

20 La expresión “agente de viscosidad” que se usa de forma intercambiable en este documento se refiere a un material que aumenta su viscosidad sin modificar sustancialmente sus otras propiedades.

El término “antioxidante” se refiere a un material que ralentiza o previene la oxidación de otras moléculas. Los antioxidantes incluyen eliminadores de radicales libres y agentes reductores. Ejemplos no limitantes de antioxidantes son ácido ascórbico y las sales del mismo, y ácido etilendiaminatetraacético (EDTA).

La expresión “agente regulador del pH” o “tampón de pH” (usadas de forma intercambiable en este documento) se refiere a ácidos o bases que pueden usarse para ajustar el pH del producto acabado al nivel deseado, sin afectar a la estabilidad de la solución.

30 La expresión “agente gelificante” se refiere a algunos agentes espesantes que forman un gel, disolviéndose en la fase líquida en forma de una mezcla coloidal que forma una estructura interna débilmente cohesiva.

35 El término “conservante” se refiere a un material que evita o reduce o ralentiza el crecimiento microbiano, con la condición de que no se vea afectada la estabilidad de la solución. Ejemplos no limitantes de conservantes incluyen parabenos, tales como metilparabeno, propilparabeno, y derivados de urea tales como imidazolidinil urea.

40 La expresión “dispositivo médico” significa, como se define en la directiva europea 2007/47/EC cualquier producto, instrumento, dispositivo, aparato, programa informático, material o artículo usado en el campo médico-sanitario y que está regulado 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. Los dispositivos médicos están incluidos 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 una protuberancia fisiológica; y para la regulación de la anticoncepción. Los dispositivos médicos de la presente invención se refieren a composiciones o formulaciones (“composiciones de dispositivo médico”), 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 madecasósido comprendida del 75% al 95% en peso respecto al peso total de centellósidos en el cultivo celular. La expresión “composición de dispositivo médico” se usa en este documento para identificar las composiciones según la invención, estando dichas composiciones, como tales (en sí mismas), catalogadas por las autoridades sanitarias competentes como dispositivos médicos.

50 Para los propósitos de la invención, cualquier intervalo dado incluye los puntos finales tanto inferior como superior del intervalo.

55 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la composición es una composición farmacéutica que comprende, junto con cualquier excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable, una cantidad eficaz de un cultivo de células vegetales de una planta del género *Centella*, comprendiendo dicho cultivo de células vegetales una cantidad de madecasósido comprendida del 75% al 95% en peso respecto al peso total de centellósidos en el cultivo celular.

60 La reparación de los tejidos dañados es el resultado, como se ilustrará en los siguientes ejemplos, del cultivo de células vegetales de una planta del género *Centella* con la cantidad específica de madecasósido. Además, otros

componentes de la composición actúan junto con el cultivo de células vegetales, y ayudan a promover también este efecto.

5 En otra realización preferida, la composición es una composición cosmética que comprende, junto con cualquier excipiente y/o vehículo cosméticamente aceptable, una cantidad eficaz de un cultivo de células vegetales de una planta del género *Centella*, comprendiendo dicho cultivo de células vegetales una cantidad de madecasósido comprendida del 75% al 95% en peso respecto al peso total de centellósidos en el cultivo celular.

10 El efecto cosmético como agente de cuidado de la piel también se debe al cultivo de células vegetales de una planta del género *Centella* y puede mejorarse con otros ingredientes, tales como fitosteroles, flavonoides, antioxidantes celulares naturales, etc.

15 En otra realización preferida más de la composición según la invención, el cultivo de células vegetales de una planta del género *Centella* está comprendido en una cantidad de aproximadamente el 1,0% al 10,0% en peso respecto al peso total de la composición. En una realización preferida, el cultivo de células vegetales está comprendido del 1,0% al 5,0% en peso respecto al peso total de la composición. En otra realización preferida, el cultivo de células vegetales está comprendido del 5,0% al 10,0% en peso respecto a la composición total. Porcentajes preferidos son el 1,0%, 2,0%, 3,0%, 4,0%, 5,0%, 6,0%, 7,0%, 8,0%, 9,0%, y 10,0%.

20 En otra realización, la composición según la invención, comprende adicionalmente un compuesto derivado de ácido hialurónico, que se selecciona entre el grupo compuesto por ácido hialurónico, una sal de ácido hialurónico, y mezclas de los mismos. El ácido hialurónico o derivados del mismo también pueden actuar en la composición como agentes humectantes debido a sus propiedades higroscópicas.

25 Las sales de ácido hialurónico incluyen sales inorgánicas como sales de metales alcalinos o alcalino-térreos. Ejemplos de sales alcalinas de ácido hialurónico incluyen la sal sódica y la sal potásica. Ejemplos de metales alcalino-térreos se refieren a la sal de calcio y sal de magnesio.

30 En una realización preferida, el compuesto derivado del ácido hialurónico está comprendido en una cantidad de aproximadamente el 0,05% al 0,50% en peso de la composición total. Cantidades preferidas incluyen el 0,05%, 0,10%, 0,15%, 0,20%, 0,25%, 0,30%, 0,35%, 0,40%, 0,45% y 0,50% en peso de la composición total.

35 En otra realización del primer aspecto de la invención, la planta del género *Centella* es *Centella asiatica*. El cultivo de células vegetales proviene preferiblemente de una célula desdiferenciada, aunque puede ser una célula de las hojas, el fruto, los brotes, las yemas, las raíces, los tallos, las ramas, las semillas, y las flores de la planta del género *Centella*. *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 Europa oriental, y países americanos, tales como Méjico.

40 Para la obtención del cultivo de células vegetales, el uso de la tecnología de cultivos de células vegetales es especialmente preferido, y especialmente siendo los cultivos de células vegetales el resultado de cultivos de suspensión, especialmente de cultivos de suspensión de células desdiferenciadas. Esta tecnología permite obtener los productos de interés, en este caso un cultivo de células vegetales enriquecido en madecasósido, de un modo altamente reproducible. Con esta tecnología, los lotes de fabricación son los más similares posible, y esto significa
45 una gran ventaja, porque la reproducibilidad es una condición obligada para agentes a aprobar por las autoridades reguladoras y a usar en composiciones farmacéuticas.

También es una realización preferida, el cultivo de células vegetales de una planta del género *Centella* como
50 ingrediente de la composición comprende el compuesto madecasósido en una cantidad comprendida del 85% al 95% en peso respecto al peso total de centellósidos en el cultivo celular. Las cantidades más preferidas son el 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, y 95% en peso respecto a la cantidad total de centellósidos en el cultivo celular. Es especialmente preferida una cantidad del 90% en peso de madecasósido respecto al peso total de centellósidos.

55 En otra realización preferida, el cultivo de células vegetales comprende una cantidad de madecasósido del 85% al 95% en peso respecto al peso total de centellósidos en el cultivo de células vegetales; y una cantidad de asiaticósido que va del 5% al 15% en peso respecto al peso total de centellósidos en el cultivo de células vegetales, representando de este modo ambos el 100% en peso de los centellósidos del cultivo celular. Más preferiblemente, el cultivo de células vegetales del género *Centella* comprende una cantidad del 90% en peso de madecasósido respecto al peso total de centellósidos, y una cantidad del 10% en peso de asiaticósido respecto al peso total de
60 centellósidos.

En otra realización, tanto el madecasósido como el asiaticósido representan la mayor parte 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 centelósidos en el cultivo celular, y donde la proporción de madecasósido es al menos el 75% en peso del peso total de centelósidos en el cultivo celular, preferiblemente el 85% y mucho más preferiblemente el 90%. Otros centelósidos que pueden estar presentes son ácido asiático y ácido madecásico, que en el cultivo celular están generalmente presentes en cantidades minoritarias.

5 Un ejemplo de un método para obtener el cultivo de células vegetales a usar como ingrediente en la composición farmacéutica, cosmética y/o de dispositivo médico de la invención comprende las etapas de:

10 a) cultivar una célula vegetal de una planta del género *Centella* en un medio adecuado durante un periodo comprendido de 8 a 15 días, hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionario, para obtener un cultivo en fase estacionaria;

b) añadir de 2 a 6 dosis de un compuesto de jasmonato al cultivo en crecimiento durante un periodo de tiempo comprendido de 13 a 18 días, donde 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 .

15 Como se ha indicado anteriormente, el cultivo de células vegetales se puede obtener preferiblemente cultivando por suspensión celular una célula vegetal desdiferenciada de una planta del género *Centella* en un medio adecuado. Los siguientes ejemplos muestran un método de obtención de un cultivo de células vegetales por suspensión de células desdiferenciadas, en el que se añaden 3 dosis de un compuesto de jasmonato (jasmonato de metilo) al cultivo en crecimiento durante un periodo de tiempo comprendido de 13 a 18 días. 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 .

20 Las células vegetales del género *Centella* pueden añadirse en la composición en forma de células completas, así como en forma de cultivo celular lisado. Así, otra realización está relacionada con la composición donde el cultivo de células vegetales está en forma de un lisado de cultivo de células vegetales.

El lisado de cultivo de células vegetales se obtiene preferiblemente por rotura mecánica de un cultivo de suspensión celular del cultivo de células vegetales, y filtración adicional a través de un tamiz de 50 a 150 μm de diámetro de poro. También son aplicables otros medios para lisar los cultivos de células vegetales con la condición de que la mezcla final sea apropiada para administrarse o usarse en productos derivados, tales como composiciones farmacéuticas o cosméticas. Ejemplos de dichos medios incluyen congelación a temperatura muy baja. Con la lisis, la mezcla del cultivo de células vegetales comprende compuestos del medio de cultivo no consumidos por las células; compuestos secretados por las células al medio; compuestos intracelulares solubles; y compuestos de membrana celular no solubles.

En otra realización preferida, la composición comprende adicionalmente un extracto de una planta del género seleccionado entre el grupo compuesto por manzanilla, malva, trébol violeta, y soja. Extractos preferidos incluyen extracto de *Malva sylvestris*, y extracto de *Matricaria Chamomilla*.

40 Las composiciones según la invención, que son composiciones farmacéuticas o cosméticas, o los dispositivos médicos (productos sanitarios) que comprenden las composiciones, comprenden excipientes y/o vehículos farmacéuticos o cosméticos seleccionados entre el grupo compuesto por un disolvente o vehículo, un agente de viscosidad, un agente hidratante, un agente gelificante, un emoliente, un agente regulador del pH, un antioxidante, un agente conservante, y una mezcla de los mismos.

45 Ejemplos de vehículos incluyen, aunque sin limitación, agua, propilenglicol, butileno glicol, etanol, isopropanol, o siliconas. Preferiblemente, el vehículo es agua. En otra realización preferida el vehículo es una mezcla de agua y propilenglicol, donde la cantidad de propilenglicol en la composición final es del 10% en peso. Como habitualmente se sabe, la cantidad del vehículo siempre se ajusta o añade para que las cantidades de los ingredientes de la composición produzcan el 100%, que es por lo que el vehículo se añade en una cantidad "suficiente para" (c.s.p).

50 Ejemplos de agentes de viscosidad apropiados incluyen, aunque sin limitación, celulosa o sus derivados tales como acrilatos, hidroxipropilmetilcelulosa, polietilenglicol, celulosa microcristalina, alcohol cetearílico, alginatos, polisacáridos ramificados, sílice pirógena, goma xantana, carbómero, y poliacrilatos. Preferiblemente, el agente de viscosidad se selecciona entre el grupo compuesto por celulosa microcristalina, alcohol cetearílico, celulosa, goma xantana, y carbómero. Preferiblemente, el agente de viscosidad es un acrilato. La cantidad de los agentes de viscosidad en las composiciones de la presente invención está comprendida del 0,5% al 2% en peso.

60 Ejemplos de emolientes incluyen, aunque sin limitación, hidroxiestearato de octilo, lanolina, triglicérido caprílico/cáprico, palmitato de cetilo, octildodecanol, alcohol cetílico, isoestearato de isopropilo, dilaurato de glicerilo, miristato de isopropilo, alcohol de palma, dimeticona, escualano, aceite de semilla de plukenetia volubilis, manteca de butirospermum parkii, cocoato de sacarosa, extractos vegetales o sus mezclas. Preferiblemente, el emoliente es un extracto vegetal seleccionado entre el grupo compuesto por derivados vegetales de malva (extractos), derivados

vegetales de soja (extractos), derivados vegetales de trébol violeta (extractos), y derivados vegetales de manzanilla (extractos) o sus mezclas. Los ejemplos más preferidos de extractos vegetales incluyen, como se ha indicado anteriormente, extracto de *Malva sylvestris*, y extracto de *Matricaria chamomilla* o sus mezclas. La cantidad de los emolientes en las composiciones de la presente invención está comprendida del 1,0% al 2,0% en peso.

Ejemplos de agentes reguladores del pH apropiados incluyen, aunque sin limitación, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, etanolamina, ácido fórmico, ácido oxálico, hidróxido potásico, hidróxido sódico, trietanolamina, o sus mezclas. Preferiblemente, el agente regulador del pH es trietanolamina. La cantidad de los agentes reguladores del pH en las composiciones de la presente invención está comprendida del 0,2% al 0,9% en peso.

Ejemplos de antioxidantes apropiados incluyen, aunque sin limitación, eliminadores de radicales libres o agentes reductores tales como, ácido ascórbico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) y las sales de los mismos, acetil cisteína, palmitato de ascorbilo, hidroxitolueno butilado, extracto de té verde, ácido cafeico, cisteína, tocoferol, ubiquinona, galato de propilo, hidroxitolueno butilado (BHT), y sus mezclas. Preferiblemente, el antioxidante se selecciona entre ácido ascórbico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) y sus mezclas. La cantidad de los agentes antioxidantes en las composiciones de la presente invención está comprendida del 0,001% al 0,1% en peso.

Ejemplos de agentes conservantes apropiados incluyen, aunque sin limitación, ácido benzoico, butilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, metilparabeno, ácido sórbico, sorbato potásico, benzoato sódico, fenoxietanol, triclosán, y derivados de urea o sus mezclas. Preferiblemente, el agente conservante se selecciona entre el grupo compuesto por metilparabeno, propilparabeno, y imidazolidinil urea. La cantidad de los agentes conservantes en las composiciones de la presente invención está comprendida del 0,02% al 0,32% en peso.

Cuando la composición es una composición farmacéutica definida anteriormente, es preferiblemente para su uso como medicamento.

Así, en una realización preferida, la presente invención se refiere a la composición farmacéutica definida anteriormente, para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de una enfermedad o afección que existe con daño tisular, en particular daño tóxico a la piel (epidermis) o al tejido mucoso. Así, la composición de la invención también es para su uso como medicamento.

Cuando la composición según la invención se usa como medicamento, es preferiblemente para su uso como agente de reparación tisular. Este aspecto también puede formularse como método para tratar y/o prevenir el daño tisular, concretamente el daño tóxico a la piel (epidermis) o al tejido mucoso, comprendiendo el método administrar una composición que comprende un cultivo de células vegetales del género *Centella*, comprendiendo dicho cultivo de células vegetales del 75% al 95% en peso de madecasósido, respecto al peso total de centellósidos en el cultivo celular, al sujeto que lo necesite. Este aspecto puede formularse alternativamente como el uso de una composición que comprende un cultivo de células vegetales del género *Centella*, comprendiendo dicho cultivo de células vegetales del 75% al 95% en peso de madecasósido respecto al peso total de centellósidos en el cultivo celular para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de daño tisular, concretamente daño tóxico a la piel (epidermis) o al tejido mucoso. El cultivo de células vegetales del género *Centella* en sí mismo puede ser también para su uso en el tratamiento o prevención de daño tisular, comprendiendo dicho cultivo de células vegetales del 75% al 95% en peso de madecasósido respecto al peso total de centellósidos en el cultivo celular.

Los siguientes ejemplos demuestran claramente que con la composición farmacéutica de la invención, se induce la síntesis de colágeno cuando se administra en un modelo de células cutáneas, concretamente en fibroblastos humanos.

En una realización preferida, la composición según la invención está en forma de una composición tópica.

Así, en una realización, la composición según la invención es una composición farmacéutica tópica, y comprende una cantidad eficaz de un cultivo de células vegetales de una planta del género *Centella*, comprendiendo dicho cultivo de células vegetales una cantidad de madecasósido comprendida del 75% al 95% en peso respecto al peso total de centellósidos en el cultivo celular, junto con uno o más excipientes y/o vehículos tópicos apropiados farmacéuticamente aceptables. Así, la composición farmacéutica es una composición que se puede administrar de forma tópica, que puede administrarse a la piel (epidermis) o a membranas mucosas (la vagina, el ano, la garganta, los ojos y los oídos).

Además, las composiciones de la presente invención pueden contener otros ingredientes, tales como fragancias, colorantes, y otros componentes conocidos en el estado de la técnica para su uso en formulaciones tópicos.

Las composiciones tópicos de la invención pueden formularse en diversas formas que incluyen, aunque sin limitación, soluciones, aerosoles y pulverizaciones no en aerosol, cremas de afeitado, polvos, mules, lociones,

geles, barras, pomadas, pastas, cremas, champúes, gel de dicha, lavados corporales o lavados faciales. Una formulación preferida es un gel. Así, en otra realización preferida, las composiciones están en forma de un gel.

5 Un "gel" es un material sólido, tipo gelatina que puede tener propiedades que varían de suave y débil a duro y resistente. Los geles se definen como un sistema reticulado sustancialmente diluido, que no muestra flujo cuando está en estado estacionario. En peso, los geles son principalmente líquidos, aunque se comportan como sólidos debido a una red reticulada tridimensional dentro del líquido. Son las reticulaciones dentro del fluido las que dan a un gel su estructura (dureza) y contribuyen a la adherencia (adhesividad). De este modo, los geles son una dispersión de moléculas de un líquido dentro de un sólido, en el que el sólido es la fase continua y el líquido es la fase discontinua.

15 Las composiciones tópicas de la presente invención pueden prepararse según métodos bien conocidos en el estado de la técnica. Los excipientes y/o vehículos apropiados, y sus cantidades, puede determinarlos fácilmente un especialista en la técnica según el tipo de formulación que esté preparando.

Aunque se prefiere la administración tópica, son posibles otras vías de administración, tales como administración oral. Por lo tanto, la composición que contiene la cantidad eficaz del cultivo de células vegetales del género *Centella* de la invención puede administrarse por vía oral en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, microcápsulas, gránulos, suspensiones, jarabes, polvos secados por congelación, preparaciones líquidas, etc. La selección de los excipientes y los métodos más apropiados para su formulación en vista del propósito particular de la composición (administración tópica, inyectable u oral) está dentro del alcance de los especialistas en la técnica de la tecnología farmacéutica.

25 La composición cosmética según la invención se usa como agente de cuidado de la piel, donde el cuidado de la piel comprende mejorar al menos uno de los siguientes síntomas: aspereza, deshidratación, tirantez, y ausencia de elasticidad.

30 Así, en una realización, la composición según la invención es una composición cosmética, que también está en forma de una composición tópica, y preferiblemente en forma de un gel. En otras realizaciones, la composición cosmética puede formularse en otras varias formas que incluyen, aunque sin limitación, soluciones, aerosoles y pulverizaciones no en aerosol, cremas de afeitado, polvos, mases, lociones, barras, pomadas, pastas, cremas, champúes, gel de dicha, lavados corporales o lavados faciales.

35 Las composiciones farmacéuticas, cosméticas y/o de dispositivo médico según la invención pueden declararse en sí mismas como un dispositivo médico. Por ejemplo, la propia formulación en gel puede usarse como dispositivo médico, es decir, catalogarse como dispositivo médico. Alternativamente, el dispositivo médico en el sentido de la invención incluyen cualquier otro dispositivo, que aparte de otros componentes, comprende una composición farmacéutica, cosmética y/o de dispositivo médico como se ha definido anteriormente. Es decir, una composición farmacéutica, cosmética y/o de dispositivo médico que comprende, a su vez, junto con cualquier excipiente y/o vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable, 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 comprendida del 75% al 95% en peso respecto al peso total de centellosidos en el cultivo celular.

45 Ejemplos de estos dispositivos médicos, que incluyen otros componentes y la composición según la invención, se refieren a telas tejidas o no tejidas, en que una capa o recubrimiento de la composición que comprende la cantidad eficaz de un cultivo de células vegetales de una planta del género *Centella*, está total o parcialmente distribuida sobre la superficie de la tela, obteniendo de este modo telas con las propiedades conferidas por la composición según la invención.

50 El dispositivo médico de la invención puede usarse como medicamento. Cuando se usa como medicamento, es preferiblemente para la reparación tisular.

55 En toda la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y variaciones de la misma, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Además, la palabra "comprende" abarca el caso de "compuesto por". Objetos, ventajas y características adicionales de la invención llegarán a ser evidentes para los especialistas en la técnica tras el examen de la descripción o pueden aprenderse por la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden ser limitantes de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas descritas en este documento.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Obtención de cultivos de células vegetales de *Centella asiatica*.

5 Se obtuvieron callos usando medio de 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 proporcionaron buena inducción de callos. Como medio de cultivo, 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 desmenuzables.

15 Para establecer cultivos de suspensión celular, se inocularon trozos de callos (20 g) en matraces de 500 ml que contenían 200 ml de medio líquido MS suplementado con 20-30 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 pusieron en un agitador rotatorio a 100 rpm en la 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 de suspensión celular fino.

20 Para los ensayos de suspensión celular, se inocularon 20 g de células (peso fresco, FW del inglés "fresh weight") en 200 ml del medio líquido mencionado anteriormente en matraces de 500 ml, con o sin el inductor, y se mantuvieron en un agitador rotatorio a 100 rpm en la oscuridad a 25°C. Después de 12 días de cultivo (cuando se alcanza la fase de crecimiento estacionario), la suspensión celular se indujo con jasmonato de metilo (MeJA) 100 µM en los días 12, 16 y 22 desde el inicio de la suspensión. Otros posibles días de inducción incluyen, aparte del día en que se alcanza la fase de crecimiento estacionario y se inicia la pauta de inducción, de 3 a 5 días después de la primera inducción; y de 8 a 11 después de la primera inducción.

25 Después, el cultivo provocado se lisó con un homogenizador a 10000-15000 rpm, y se filtró a través de un tamiz de nylon con un diámetro de poro de 100 µm.

La mezcla contenía:

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

35 El producto final fue un lisado de cultivo celular con altos contenidos de madecasósido respecto a los centelósidos totales en las células de *C. asiatica*.

40 El análisis de HPLC del lisado de cultivo celular indicó que la cantidad de madecasósido era el 90% en peso del peso total de centelósidos (asiaticósido, ácido asiático, y ácido madecásico representando el 10% en peso del peso total de centelósidos).

45 Las cantidades de centelósidos se determinaron como se indica en el siguiente Ejemplo 2. Las áreas bajo las curvas (o picos, a.u.c) de cada centelósido del análisis de HPLC se calcularon y correlacionaron con la cantidad de cada compuesto. Finalmente, se determinó el porcentaje en peso de cada centelósido (madecasósido, asiaticósido, ácido madecásico, y ácido asiático) en relación al peso total de centelósidos en el lisado como:

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

50 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 las cantidades determinadas 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 descrito anteriormente; es decir, tres adiciones (3x) en los días 12, 16 y 22 desde el inicio de la suspensión, y determinadas en el día 27 desde el inicio de la suspensión. Los datos representados en la FIG. 2 corresponden a las concentraciones totales de la fracción celular y la fracción de medio líquido de cultivo.

55 Como puede observarse, 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.

60 Como se deduce a partir de este ejemplo, el compuesto de jasmonato se añade tres veces con la siguiente pauta general:

- (i) la primera dosis una vez el cultivo en crecimiento ha alcanzado la fase de crecimiento estacionario;
 (ii) la segunda dosis se añade de 3 a 5 días después respecto a la primera adición;

(iii) la tercera dosis se añade de 8 a 11 días después respecto a la primera adición. La primera dosis generalmente es la dosis que inicia la etapa b) del método para obtener el cultivo de células vegetales de la planta del género *Centella*. La etapa en que se alcanza la fase estacionaria, o de crecimiento estacionario, generalmente se controla o viene seguida de ensayos turbidimétricos y determinación del volumen de compactación.

5 Ejemplo 2. Determinación de centelósidos (HPLC).

La cuantificación de los cuatro centelósidos (asiaticósido, madecacosido, ácido asiático y ácido madecásico) se realizó a través de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

10 Para la extracción de células, primero se sonicó 1 g de polvo fino (liofilizado) en metanol:agua (9:1, v/v; 2 x 25 ml) durante 2 h a temperatura ambiente y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm (Waters Millipore). El filtrado se evaporó a 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 de HPLC. El análisis de HPLC-UV se realizó a temperatura ambiente con una columna Spherisorb 5 µm ODS2 de 4,6x250 mm (Waters, Milford, MA, EEUU) usando elución con gradiente, siendo los eluyentes acetonitrilo (A) y agua con dihidrogenofosfato de amonio 10 mM (pH 2,5 con ácido ortofosfórico) (B) según 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 ajustó a 214 nm.

20 Ejemplo 3. Ensayo comparativo en un modelo *in vitro*

Para ilustrar los efectos ventajosos del cultivo de células vegetales de la invención, a continuación se describe un ensayo con diferentes composiciones que comprenden un lisado de cultivo celular de *Centella asiatica* según la invención. La capacidad de las composiciones de inducir la síntesis de colágeno de este lisado de cultivo celular se ensaya en un cultivo de fibroblastos dérmicos humanos.

25 La Tabla 1 muestra las características de las composiciones ensayadas.

Tabla 1. Productos ensayados

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% de madecacosido respecto a todos los centelósidos (de Guangxi Changzhou Natural products Development (China); extracto en polvo de la planta completa secada)	0	0	0	0,500
Excipientes (disolventes, emolientes, tampones de pH, agentes gelificantes, antioxidantes y agentes conservantes)	csp. 100 *			

30 * "c.s.p" significa cantidad "suficiente para".

El objetivo de este ensayo fue ver el efecto de las formulaciones enumeradas en la Tabla 1. Tres de ellas (PR/52/A; PR/53/A; y PR/54/A) contenían un lisado de cultivo celular de *Centella asiatica*, preparado como se ha expuesto en el Ejemplo 1. Contenían una cantidad de madecacosido comprendida del 75% al 95%, concretamente el 90% en peso respecto al peso total de centelósidos obtenidos después del tratamiento con el inductor jasmonato de metilo. La otra formulación (PR/55/A) contenía una cantidad de un extracto de *Centella asiatica*.

40 En ensayo consistía en la evaluación del efecto en la síntesis de colágeno en fibroblastos de la dermis humana después de 24 horas de tratamiento con estas formulaciones, cada una aplicada a diferentes concentraciones no tóxicas (100, 250 y 500 µg/ ml) previamente determinadas.

45 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 de crecimiento transformante beta (TGF-β). Como control negativo (Control -) se añadió medio de cultivo.

Las células se cultivaron a 37°C durante 24 horas (50 x10³ células/cm²). La formulación ensayada se preparó y añadió a las células a las tres concentraciones indicadas anteriormente y se incubaron a 37°C durante 24 horas adicionales. Para cada concentración ensayada, se realizaron las siguientes determinaciones: a) cuantificación de colágeno, y b) cuantificación de células (Tripsina: 0,2% p/v).

Los resultados del ensayo se representan en la FIG. 1, donde la cantidad de colágeno en términos de $\mu\text{g}/10^6$ células fibroblásticas humanas se indica en forma de barras para cada concentración (100, 250, y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ensayada 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$; la barra del centro muestra los resultados a 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$; y la barra de la derecha muestra los resultados a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las líneas verticales muestran la desviación típica de los resultados.

El crecimiento celular fue similar en el control negativo y en los cultivos tratados con las formulaciones, confirmado de este modo que las concentraciones ensayadas (o dosis seleccionadas) de 100, 250, y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eran no citotóxicas.

Como puede deducirse a partir de esta FIG. 1, la formulación que contenía un 10% en peso del lisado de cultivo celular de *Centella asiatica* de la invención (PR/52/A) era capaz de estimular la secreción de colágeno en el medio de cultivo de 100 a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, siendo el máximo a 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Esto significa un 42% más respecto al control negativo. La estimulación representó a su vez el 80% de la estimulación del control positivo (TGF- β).

Por otro lado, la formulación que contenía un 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$, siendo también máxima a 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Esto representó un 65% más respecto al control negativo. La estimulación fue notablemente del 127% en relación a la inducción por el control positivo.

La formulación que contenía un 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$, siendo también máxima a 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La cantidad de colágeno secretado representó un aumento del 31% respecto al control negativo.

Finalmente, la formulación que comprendía un 0,5% de un extracto de *Centella asiatica* con un 90% de madecacosido (PR/55/A), es decir, un polvo de un extracto de la planta completa secada, purificada y titulada (TECA), estimuló la secreción de colágeno (síntesis) entre 100 y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, siendo máxima a 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La cantidad de colágeno secretado representó un aumento del 55% respecto al control negativo, y el aumento fue comparable con el del control positivo.

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

Ejemplo 4. Composición de gel para su uso como formulación de reparación tisular.

La siguiente Tabla 2.1 muestra un ejemplo de composición farmacéutica tópica que comprende como uno de los ingredientes un lisado de un cultivo de células vegetales de *Centella asiatica* según la invención.

Además, las Tabla 2.2 muestra los intervalos de porcentaje en peso (%) de los componentes de una composición según la invención.

Tabla 2.1 Gel que comprende *C. asiatica*.

Ingrediente	Porcentaje en peso (%)
AGUA	80,96
Lisado de un cultivo de células vegetales de <i>Centella asiatica</i>	5,000
Acrilatos/ polímero reticulado de acrilato de alquilo C10-30	0,550
TRIETANOLAMINA	0,700
IMIDAZOLIDINIL UREA	0,200
EDETATO DISÓDICO	0,100
ÁCIDO ASCÓRBICO	0,030
HIALURONATO SÓDICO	0,100
PROPILENGLICOL	10,000
PROPILPARABENO	0,040
METILPARABENO	0,320
EXTRACTO DE MANZANILLA (extracto de <i>chamomilla recutita</i>)	1,000
EXTRACTO DE MALVA (extracto de <i>malva sylvestris</i>)	1,000

5 Tabla 2.2. Intervalos de los ingredientes que forman composiciones en forma de gel según la invención que comprenden *C. asiatica*.

Ingrediente	Porcentaje en peso (%)
AGUA	c.s.p** 100
Lisado de un cultivo de células vegetales de <i>Centella asiatica</i>	1 - 10%
Acrilatos/polímero reticulado de acrilato de alquilo C10-30	0,5 – 2,0%
TRIETANOLAMINA	0,2 - 0,9%
IMIDAZOLIDINIL UREA	0,03 -0,5%
EDETATO DISÓDICO	0,005 – 0,1%
ÁCIDO ASCÓRBICO	0,001 – 0,1%
HIALURONATO SÓDICO	0,05 -1%
PROPILENGLICOL	10%
PROPILPARABENO	0,02 - 0,1%
METILPARABENO	0,1 - 0,32%
EXTRACTO DE MANZANILLA (extracto de <i>chamomilla recutita</i>)	1,0%
EXTRACTO DE MALVA (extracto de <i>malva sylvestris</i>)	1,0%

** "c.s.p" significa cantidad "suficiente para".

10 Estas composiciones de gel se indican en varias circunstancias en que las mucosas vulvar y/o vaginal están alteradas particularmente debido a sequedad vaginal.

Las composiciones son capaces de promover la regeneración, flexibilidad y elasticidad de la mucosa vaginal durante la peri-menopausia o menopausia, en los últimos días del ciclo menstrual, en caso de sequedad ocasionada por algún producto anticonceptivo oral, durante el post-parto, y en sequedad relacionada con radioterapia.

15 Además, las composiciones de la invención pueden aplicarse a cualquier superficie cutánea o mucosa, y son capaces de acelerar el procedimiento de curación en caso de cirugía, por ejemplo, en caso de una episiotomía. La composición también es útil para reducir las arrugas y cicatrices, así como para promover la curación en caso de tejido quemado.

20 Así, se ha demostrado debidamente que la composición farmacéutica según la invención es para su uso como medicamento, en particular como medicamento para la reparación de tejidos, debido a la capacidad de la

composición de inducir la síntesis de colágeno. En otras palabras, la composición farmacéutica es útil en aquellas situaciones en las que se ha dañado un tejido (dermis, epidermis, tejido interno), por ejemplo, debido a un accidente o por cirugía. La composición farmacéutica de la invención promueve la curación de las heridas y por tanto es terapéuticamente eficaz.

5 Además, la composición también es cosméticamente aplicable como agente de cuidado de la piel, ya que la inducción de la síntesis de colágeno conduce al cuidado de la piel mejorando al menos uno de los siguientes síntomas: aspereza, deshidratación, tirantez, y ausencia de elasticidad, siendo todos ellos procedimientos en los que se necesitan nuevas fibras de colágeno.

10 La composición farmacéutica, cosmética y/o de dispositivo médico de los ejemplos puede aplicarse en una tela tejida o no tejida como una capa o recubrimiento a poner en contacto adicionalmente con el área deseada a cuidar. Así, puede suministrarse como una capa en una compresa, o toalla sanitaria, un pañuelo, una gasa o una banda.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una composición farmacéutica o cosmética tópica que comprende, junto con cualquier excipiente y/o vehículo farmacéuticamente o cosméticamente aceptable:
- 5 - un compuesto derivado de ácido hialurónico que se selecciona de entre el grupo compuesto por ácido hialurónico, una sal de ácido hialurónico, y mezclas de los mismos; y
- 10 - una cantidad efectiva de un cultivo de células vegetales de *Centella asiatica*, comprendiendo dicho cultivo de células vegetales una cantidad de madecasósido del 85% al 95% en peso respecto al peso total de centelósidos en el cultivo celular; y una cantidad de asiaticósido del 5 % al 15% en peso respecto al peso total de centelósidos en el cultivo celular; y
- donde el cultivo de células vegetales es obtenible por un procedimiento que comprende:
- 15 a) cultivar una célula vegetal indiferenciada de *Centella asiática* por suspensión celular en un medio adecuado durante un periodo comprendido de 8 a 15 días, hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionario, para obtener un cultivo en fase estacionaria;
- b) añadir de 2 a 6 dosis de un compuesto de jasmonato al cultivo en crecimiento durante un periodo de tiempo comprendido de 13 a 18 días, donde 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.
- 20 2.- La composición farmacéutica o cosmética tópica de acuerdo con la reivindicación 1, donde en la etapa (b) el compuesto de jasmonato se añade tres veces con la siguiente pauta:
- (i) la primera dosis una vez el cultivo de la etapa (a) ha alcanzado la fase de crecimiento estacionario;
- 25 (ii) la segunda dosis se añade de 3 a 5 días después respecto a la primera adición;
- (iii) la tercera dosis se añade de 8 a 11 días después respecto a la primera adición.
- 3.- La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el cultivo de células vegetales de *Centella asiatica* está comprendido en una cantidad del 1,0% al 10,0% en peso de la composición total.
- 30 4.- La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el compuesto derivado de ácido hialurónico está comprendido en una cantidad del 0,05% al 0,5% en peso de la composición total.
- 5.- La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el cultivo de células vegetales está en forma de un lisado de cultivo de células vegetales.
- 35 6.- La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende adicionalmente un extracto de una planta seleccionada del grupo que consiste en un extracto de *Malva sylvestris* y un extracto de *Matricaria Chamomilla*.
- 40 7.- La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que es un gel.
- 8.- Un dispositivo médico que comprende la composición definida en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 45 9.- La composición farmacéutica definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o el dispositivo médico de la reivindicación 8 para su uso como medicamento.
- 10.- La composición farmacéutica o el dispositivo médico para el uso de la reivindicación 9, en la que el medicamento es para reparación de tejido de la piel.
- 50 11.- Uso de una composición cosmética tópica definida en cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o el dispositivo médico de la reivindicación 8, como agente de cuidado de la piel, en el que el cuidado de la piel comprende mejorar al menos uno de los siguientes síntomas: aspereza, deshidratación, tirantez, y ausencia de elasticidad.

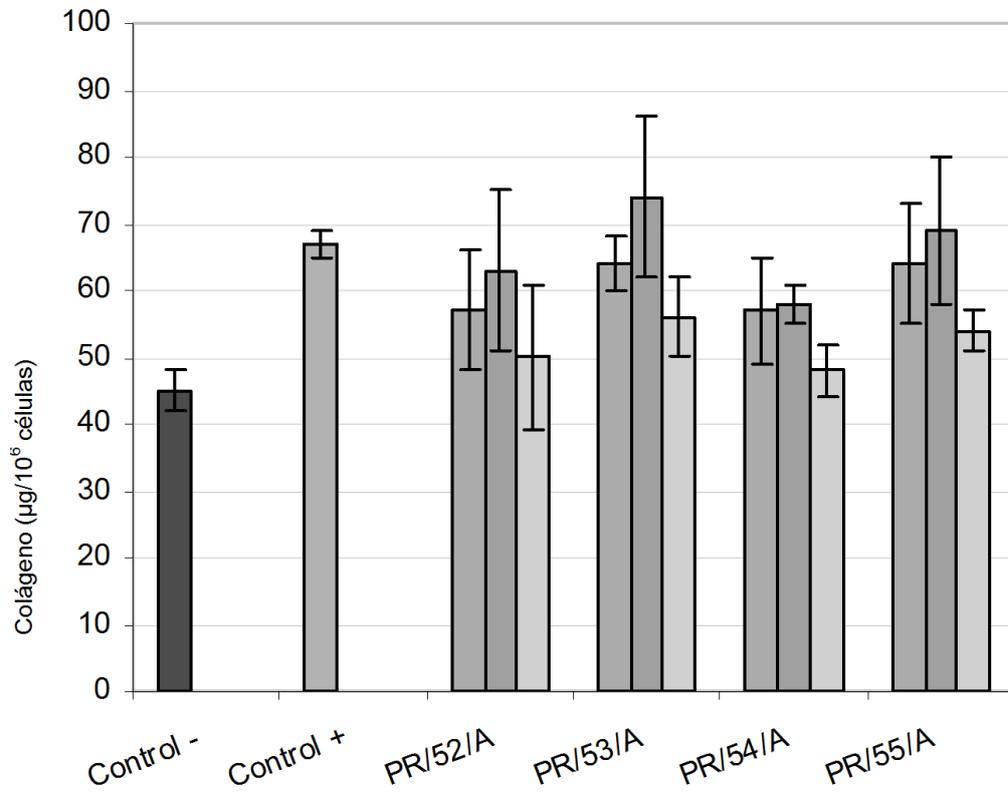


FIG 1

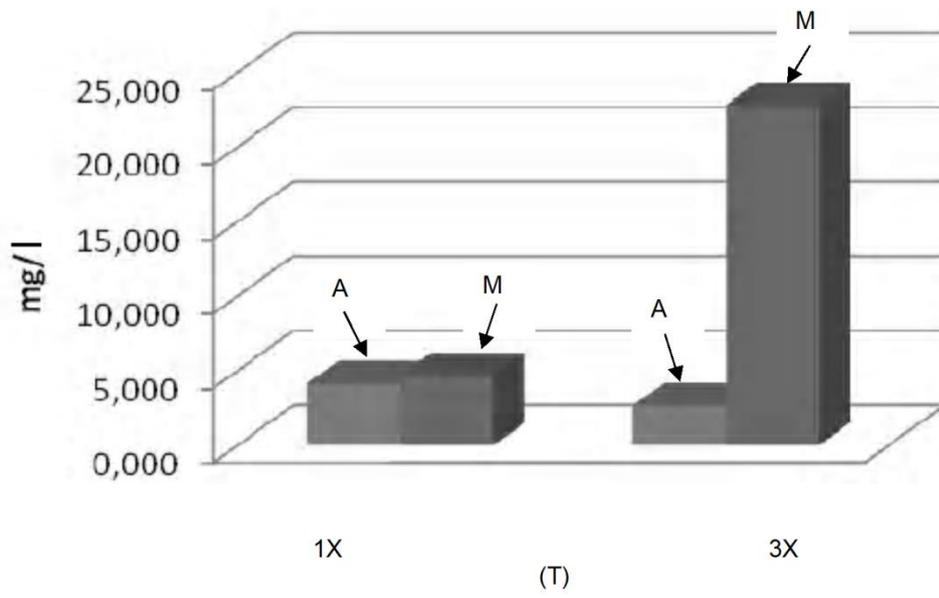


FIG 2

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.

25

- Bonfill et al., "Production of centellosides and phytosterols in cell suspension cultures of *Centella asiatica*", Plant Cell Tiss Organ Cult – 2011, Vol. Nº 104, pág.: 61-67.
- Bonfill et al., 2010, Plant cell, tissue and organ culture, 104(1), 61-67.