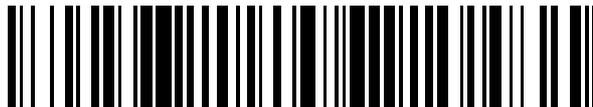


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 888**

51 Int. Cl.:

A61K 8/34 (2006.01)
A61K 8/36 (2006.01)
A61K 8/368 (2006.01)
A61K 8/66 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 8/97 (2007.01)
A61K 8/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2012 PCT/EP2012/055286**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12130783**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2012 E 12710725 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2691073**

54 Título: **Modulación de la metilación epigenética del AND para provocar que las células adopten patrones de metilación del ADN asociados con células jóvenes**

30 Prioridad:

27.03.2011 US 201161468053 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.10.2017

73 Titular/es:

ARCH CHEMICALS, INC. (100.0%)
90 Boroline Road, Suite 3
Allendale, New Jersey 07401-1629, US

72 Inventor/es:

GRUBER, JAMES VINCENT y
LUDWIG, PHILIP LEDETTE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 638 888 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

Modulación de la metilación epigenética del ADN para provocar que las células adopten patrones de metilación del ADN asociados con células jóvenes

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a composiciones eficaces para controlar la metilación del ADN en células de la piel humana. Más particularmente, la presente invención se refiere a composiciones tópicas que contienen un medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal derivado de las plantas de la familia *Poaceae*, y a la fabricación y al método de utilizar este tipo de composiciones.

Antecedentes de la invención

- 10 Las plantas son únicas entre los organismos vivos en la tierra para poder cultivar una nueva planta a partir de una sola célula tomada de una planta más vieja. Al proceso de cultivo de estas células vegetales se le alude como cultivo de tejidos vegetales y se conoce desde principios de 1900.

- Se han utilizado cultivos de células vegetales en aplicaciones tópicas. Por ejemplo, el documento US 2008/0299092 A1 describe el uso de células vegetales desdiferenciadas derivadas de manzanas en preparaciones cosméticas con el fin de influir en la salud de las células madre de la piel. Igualmente, el documento EP 1 736 167 A2 describe la aplicación tópica de medios de cultivo de células vegetales de *Syringa vulgaris* enriquecido en verbascósidos destinados a proporcionar influencias antioxidantes a la piel. El documento 2007/0015252 A1 describe la aplicación tópica de cultivos vegetales de *Ajuga reptans* que contienen fenilpropanoides para dar al extracto un alto nivel de antioxidantes. La patente de EE.UU. n° 6.551.625 describe que células vegetales no diferenciadas cultivadas como un cultivo en suspensión de *Salvia miltiorrhiza* pueden utilizarse en aplicaciones cosméticas y tópicas para ayudar a prevenir la formación de olores corporales. El documento EP 2 133 323 A1 describe el cultivo de *Centella asiatica* como un cultivo tisular para la producción de ácido 3,5-dicafeoil-4-malonilquinico que puede tener actividad inhibidora de metaloproteinasas cuando se utiliza en productos cosméticos para la piel. El documento EP 0 797 984 A2 describe cosméticos anti-envejecimiento con una disolución enzimolizada de extracto alcalino de extracto de arroz (grano). Es adecuado en el tratamiento anti-envejecimiento de la piel y el tratamiento anti-arrugas, y fomenta la producción de colágeno.
- 15
20
25

Sin embargo, hasta la fecha, según el conocimiento de la solicitante, no existe técnica anterior que divulgue tratamientos tópicos hechos a partir de cultivos celulares de plantas destinados a influir sobre el ADN epigenético o la metilación de cromatina en células de la piel.

- 30 La epigenética es el estudio de los cambios heredables en la expresión génica que son provocados por un mecanismo distinto de los cambios en la secuencia del ADN. Cualquier modificación que altere la actividad génica sin cambiar la secuencia del ADN y que también pueda transmitirse a las células hijas se consideraría una modificación epigenética. Los cambios epigenéticos se transmiten a las células hijas y pueden durar múltiples generaciones, aunque no haya cambios en la secuencia del ADN. Los factores y los cambios epigenéticos han demostrado que juegan un papel importante en la diferenciación celular, el desarrollo, el envejecimiento y las enfermedades (Cropley *et al.*, 2006; Weaver *et al.*, 2006; Rakyan *et al.*, 2003).
- 35

- Se ha demostrado que la metilación del ADN tanto a nivel global como genético desempeña un papel importante en lo que respecta a la memoria epigenética; se ha demostrado que los cambios en la metilación del ADN están relacionados con la edad (Gopisetty *et al.*, 2006, Ottaviano *et al.*, 1994, Feng *et al.*, 2006, Boks *et al.*, 2009). La metilación del ADN con respecto a los cambios epigenéticos se produce en la citosina-5 en los dinucleótidos CpG. El grupo metilo se une a una base citosina seguida por una base de dinucleótido guanina. El p representa el fosfato que une entre sí la C y la G. Esto ayuda a diferenciar CpG de un par de bases CG. La metilación del ADN también puede producirse en los sitios CpA, CpT y CpC, aunque actualmente la mayoría de los datos que enlazan la metilación de citosina y la transcripción génica provienen de datos CpG debido a razones tanto biológicas como técnicas.
- 40
45

- La metilación de las zonas promotoras ricas en CpG, denominadas islas CpG, se ha identificado como un mecanismo esencial en la regulación de la transcripción de genes (Metivier *et al.*, 2008, Bird, 2002). Las islas CpG han sido definidas por Takai y Jones (2002) como una región de 200 pares de bases con un contenido de GC de > 55%. Las islas CpG se encuentran en aproximadamente el 70% de promotores humanos (Saxonov *et al.*, 2006). Los promotores génicos son regiones del ADN aguas arriba de un gen en el que la ARN polimerasa se une inicialmente para iniciar la transcripción del gen. Además de asociarse con promotores, las islas CpG también están enlazadas a genes de control interno. Las islas CpG están típicamente no metiladas en células normales, permitiendo así a la maquinaria de transcripción el acceso al ADN. En determinadas enfermedades y con el envejecimiento, las islas CpG se vuelven aberrantemente metiladas, desregulando la actividad transcripcional usual del gen. La metilación se produce simétricamente sobre los restos citosina en ambas cadenas de los dinucleótidos de CpG. La metilación del ADN se establece en una fase temprana en un organismo durante la embriogénesis. Aproximadamente el 70-80% de los sitios CpG están metilados en células de mamíferos, pero los sitios CpG y sus grados de metilación están distribuidos de manera irregular en el genoma (Bird *et al.*, 1985). Los sitios CpG se encuentran principalmente dentro
- 50
55

de los promotores de ~ 70 de los genes humanos (Saxonov *et al.* 2006) y estos sitios tienden a ser no metilados. Cuando las islas CpG en un promotor están metiladas, esto da lugar a la represión transcripcional del gen adyacente. Generalmente, los genes expresados parecen tener una baja metilación en su región promotora y una alta metilación en su cuerpo del gen (Ball *et al.*, 2009). Se supone que la metilación del ADN cambia la densidad de cromatina y la accesibilidad del ADN a la maquinaria celular, influyendo así en el potencial transcripcional de la secuencia de ADN subyacente.

Los niveles de metilación del ADN dentro de una célula específica en genes específicos están sujetos a cambios a lo largo del tiempo. Al igual que los niveles de metilación del ADN cuando se comparan diferentes tipos de células tales como las células madre pluripotentes humanas y las células somáticas (Deng *et al.*, 2009). Los gemelos monocigóticos (idénticos) tienen el mismo genotipo, ya que se derivan del mismo cigoto. Estudios han demostrado que los patrones de modificación epigenética divergen en gemelos monocigóticos a medida que envejecen, lo que sugiere que pueden producirse pequeños defectos en la transmisión de información epigenética a través de sucesivas divisiones celulares (Fraga *et al.*, 2005). Este proceso, denominado "deriva epigenética", está asociado con el envejecimiento. Estudios de gemelos han estimado que los factores genéticos sólo determinan el 20-30% de la variación en la esperanza de vida humana. El 70-80% restante de la variación se debe al entorno y otros factores no genéticos (Fraga *et al.*, 2005; Mitchell *et al.*, 2001; Herskind *et al.*, 1996; Poulsen *et al.*, 2007).

Se conocen métodos para influir sobre la metilación del ADN. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 7.790.746 describe métodos para inhibir la metilación del ADN utilizando diversos derivados de quinolina. Sin embargo, esta patente no revela el uso de agentes activos derivados de vegetales como un medio para influir sobre la metilación del ADN, particularmente en el promotor del gen.

Lo que actualmente se necesita en la comunidad cosmética son ingredientes que mejoran las características del envejecimiento de la piel al influir sobre la metilación de las regiones de promotor de los diversos genes críticos asociados con el envejecimiento en células de la piel de mamíferos, especialmente humanas. La presente invención proporciona una respuesta a esa necesidad.

25 Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición tópica para controlar la metilación del ADN en células de la piel humana, que comprende: (a) un medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal, que es un extracto de la suspensión de células de meristemo vegetal derivado de las plantas del género *Oryza*, (b) un conservante presente en una cantidad suficiente para proporcionar una eficacia esterilizante o bioestática con respecto al componente (a); y (c) un vehículo dermatológicamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un concentrado de composición que contiene (a) un medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal (extracto de suspensión de células de meristemo vegetal) derivado de las plantas del género *Oryza*, y (b) un conservante presente en una cantidad suficiente para proporcionar una eficacia esterilizante o bioestática con respecto al componente (a), en donde el componente (a) está presente en una cantidad de 0,0000001% a 99% en peso del concentrado de la composición, prefiriéndose 90% a 99% y siendo más preferido 97% a 99%, y el componente (b) está presente en una cantidad de 0,01% a 10% en peso del concentrado de la composición, prefiriéndose 0,1% a 5% y siendo lo más preferido 0,4% a 2%.

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar la composición tópica descrita anteriormente. El procedimiento incluye las etapas de: (i) proporcionar células vegetales totipotentes e indiferenciadas derivadas de plantas del género *Oryza*; (ii) cultivar las células vegetales en un medio nutriente líquido en presencia o ausencia de tensiones químicas, gaseosas o energéticas destinadas a provocar la expresión de metabolitos de células vegetales secundarios para producir una mezcla que contiene componentes hidrosolubles e insolubles en agua, (iii) separar los componentes insolubles en agua para producir el medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal (extracto de suspensión de células de meristemo vegetal) y (iv) combinar el medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal (extracto de suspensión de células de meristemo vegetal) con un conservante y un vehículo dermatológicamente aceptable, haciendo de este modo la composición tópica.

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para controlar la metilación del ADN en células de la piel humana. El método incluye poner en contacto la piel con la composición tópica de la invención.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es un cromatograma HPLC de un medio nutriente acondicionado de meristemo estresado por ozono (extracto de suspensión de células de meristemo vegetal).

La Fig. 2 es un cromatograma HPLC de un medio nutriente acondicionado de meristemo de arroz no estresado por ozono (extracto de suspensión de células de meristemo vegetal).

La Fig. 3. es un gráfico que ilustra el efecto de un medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal (extracto de suspensión de células de meristemo vegetal) de la invención en el nivel de metilación en los promotores de genes de fibroblastos cultivados *in vitro*.

La Fig. 4 es un gráfico que ilustra el efecto de un medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal (extracto de suspensión de células de meristemo vegetal) de la invención en el nivel de metilación en promotores de genes 1A1 de colágeno de fibroblastos cultivados *in vitro*.

5 La Fig. 5 es un gráfico que ilustra el efecto de un medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal (extracto de suspensión de células de meristemo vegetal) de la invención en el nivel de metilación en el promotor del gen 1A2 de colágeno de fibroblastos cultivados *in vitro*.

La Fig. 6 es un gráfico que ilustra el efecto de un medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal (extracto de suspensión de células de meristemo vegetal) de la invención sobre los niveles de proteína de colágeno 1A de fibroblastos cultivados *in vitro*.

10 La Fig. 7 es un gráfico que ilustra el efecto de un medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal (extracto de suspensión de células de meristemo vegetal) de la invención sobre la expresión de la proteína dermatopontina de fibroblastos cultivados *in vitro*.

Descripción detallada de la invención

15 Se ha encontrado ahora, sorprendentemente, que medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal, que son extractos de suspensión de células de meristemo derivados de plantas del género *Oryza*, más preferiblemente de la especie *sativa*, cuando se aplican tópicamente a células de la piel humanas tales como, por ejemplo, fibroblastos, queratinocitos, melanocitos y similares, pueden modular la metilación del ADN en células de piel de mamíferos jóvenes y más particularmente intrínseca y extrínsecamente envejecidas, especialmente en la región del promotor de los genes. Las células tratadas muestran patrones de metilación del ADN más característicos de los encontrados en células jóvenes no envejecidas. Las composiciones tópicas que contienen estos medios nutrientes
20 acondicionados de meristemo vegetal son particularmente ventajosas para uso en terapia humana y veterinaria y para fines nutricionales y cosméticos.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona una composición tópica para controlar la metilación del ADN en células de la piel humana, que comprende: (a) un medio nutriente acondicionado de
25 meristemo vegetal (extracto de la suspensión de células de meristemo vegetal) derivado de las plantas del género *Oryza*, (b) un conservante presente en una cantidad suficiente para proporcionar una eficacia esterilizante o bioestática con respecto al componente (a); y (c) un vehículo dermatológicamente aceptable.

En relación con la composición tópica de la invención arriba descrita, el componente (a) está presente en una cantidad de 0,0000001% a 99% en peso de la composición, prefiriéndose 0,0001% a 50% y siendo más preferido
30 0,001% a 25% y siendo lo más preferido 0,01% a 10%, el componente (b) está presente en una cantidad de 0,01% a 10% en peso de la composición, siendo más preferida de 0,1% a 5% y siendo más preferida de 0,4% a 2%, y el componente (c) está presente en una cantidad de 1% a 98% en peso de la composición, siendo el más preferido 80% a 90%.

35 El componente (a), un medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal (extracto de suspensión de células del meristemo vegetal) adecuado para uso en la composición tópica de la invención se deriva de las plantas del género *Oryza*, preferiblemente de plantas *Oryza sativa*.

Los medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal (extractos de suspensión de células de meristemo vegetal) pueden prepararse mediante un procedimiento que incluye las etapas de (i) cultivar cultivos de meristemo vegetal derivados de las plantas del género *Oryza* en un medio nutriente líquido para producir una mezcla que
40 contiene componentes solubles en agua e insolubles en agua, y (ii) separar los componentes insolubles en agua para producir los medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal (extractos de suspensión de células de meristemo vegetal).

El método para crear cultivos de meristemos vegetales se conoce en la técnica. Típicamente, las plantas se esterilizan en primer lugar, a continuación se extirpa el meristemo de la planta y se coloca en un medio nutriente
45 sólido con el fin de que los tejidos de callo indiferenciados se formen a partir del meristemo.

Medios nutrientes sólidos son generalmente conocidos por una persona experta en la técnica. En una realización, contienen factores tales como medio Murashige & Skoog, sacarosa, vitaminas Gamborg, hormonas de crecimiento tales como IAA, cinetina, y agar.

50 Para los fines de la presente invención, es preferible mantener los tejidos del callo formados a partir del meristemo como células indiferenciadas. En los medios nutrientes, un nivel relativamente alto de auxina a cinetina favorece el enraizamiento, mientras que a la inversa puede conducir a la formación de brotes y niveles intermedios a la proliferación del callo. Por consiguiente, los niveles de auxina y cinetina en los medios nutrientes deben mantenerse de manera que sólo se produzcan células indiferenciadas.

55 Después de que el meristemo crezca en los medios sólidos durante un período de tiempo adecuado, los tejidos del callo se sub-cultivan dividiendo y transfiriéndolos a nuevos medios sólidos. Preferiblemente, este proceso se repite al

- 5 menos varias veces con el fin de obtener líneas celulares estables. Tal como se utiliza en esta memoria, líneas celulares estables significan las células que tienen rasgos constantes, producen una cantidad reproducible de agentes activos, crecen a una velocidad constante y se ven igual después de múltiples generaciones. Típicamente, los cultivos estabilizados tienen poca variación dentro del cultivo y a lo largo del tiempo y la replicación tendrá poca variación.
- 10 Tal como saben los expertos en la técnica, los cultivos de tejidos pueden producir variantes clonales. Dentro de un callo o tejido vegetal existe variación natural dentro de las células. Esta variación somaclonal depende de la variación en una población de células, ya sea pre-existente o inducida por el cultivo. La variación puede ser genética o epigenética. Estos cambios en el callo o cultivos en suspensión tienen un beneficio significativo en la producción de agentes activos metabólicos secundarios de los cultivos en suspensión. Por lo tanto, para los fines de la presente invención, se eligen líneas celulares de sub-cultivo que son de crecimiento rápido, tienen rasgos estables tales como color y tamaño, crecen a una velocidad constante y otras cualidades de interés.
- 15 Después de que se determina que una línea celular es estable, las células del medio sólido, es decir, células vegetales totipotentes e indiferenciadas, se inoculan en un medio líquido. Un medio líquido es conocido por una persona experta en la técnica. Contiene factores tales como el medio Murashige & Skoog, sacarosa, vitaminas Gamborg, hormonas de crecimiento tales como IAA y cinetina.
- 20 En una realización, se deja que las células crezcan en un medio nutriente líquido en presencia de tensiones químicas, gaseosas o energéticas destinadas a provocar la expresión de metabolitos de células vegetales secundarios.
- 25 Aunque puede utilizarse una diversidad de tensiones químicas o energéticas para inducir la producción de metabolitos secundarios, el ozono es un factor de estrés preferido, ya que se introduce fácilmente en los cultivos celulares a través de la alimentación de oxígeno utilizada para mantener las células en un ambiente oxigenado en el reactor.
- La exposición al ozono ayuda a las células a sintetizar más metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios de la presente invención incluyen, pero no se limitan a reguladores de crecimiento de plantas, citoquinas vegetales, flavonoides, carotenoides, fitoesteroides, saponinas, glucosinolatos, inhibidores de proteasa, fitoestrógenos, sulfuros, ácidos fítics, alcaloides, terpenoides, glicósidos, fenoles, fenazinas, policétidos, péptidos, polifenoles y similares.
- 30 Bajo un cierto umbral, un estrés leve del ozono puede ser compensado por la planta, provocando que produzca más agentes activos. Mientras que, a niveles más altos, los efectos perjudiciales del estrés severo pueden provocar daños irreversibles. Además, el umbral de tolerancia al estrés depende no sólo del tipo de factor de estrés, en el caso del ozono, ni del tiempo de exposición, sino también de la capacidad específica de resistencia al estrés de la especie. Es posible optimizar la cantidad de ozono aplicada al cultivo de suspensión de arroz para conseguir resultados específicos relacionados con el estrés. Niveles típicos de ozono útiles para la presente invención pueden estar en el intervalo de 0,0001 a 50 mM. Más preferidos son niveles de ozono de 0,01 mM a 5 mM. Los más preferidos son niveles de ozono de 0,1 mM a 0,5 mM. Las células vegetales pueden ser expuestas al ozono durante varios minutos a varios días, dependiendo de la especie vegetal, la concentración de ozono, las tasas de ventilación, la temperatura y similares.
- 35 Otra forma de vigilar el estrés oxidativo en las fermentaciones de medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal es aplicar el ozono hasta que haya muerto un cierto número de células vegetales. Métodos para medir la viabilidad de las células vegetales son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, el ensayo MTT que es un ensayo colorimétrico que demuestra funciones mitocondriales viables, demostrando así las células que viven de aquellas que están muertas. Un recuento de viabilidad celular preferido sería 50%, un nivel más preferido sería 75% y un nivel más preferido sería 80% de viabilidad de las células vegetales después de la aplicación del estrés de ozono.
- 40 Generadores de ozono comercialmente disponibles utilizados para el tratamiento con ozono de las células vegetales pueden encontrarse, por ejemplo, en Erwin Sander Elektroapparatebau GmbH, Uetze-Eltze, Alemania. En la mayoría de las circunstancias, se utiliza un detector de ozono además del generador de ozono. Detectores de ozono adecuados están disponibles de Dasibi, Glandiae, California.
- 45 Aunque el ozono se describe aquí como un factor de estrés preferido, pueden utilizarse también otros factores de estrés conocidos por los expertos en la técnica para inducir metabolitos secundarios. Estos factores de estrés incluyen, pero no se limitan a reguladores del crecimiento de plantas, proteínas de patógenos de plantas y polímeros tales como quitina y diversas formas de energía externa, que incluyen, pero no se limitan a calor y radiación UV.
- 50 Se deja que las células crezcan durante un cierto tiempo hasta que se obtenga una cantidad suficiente de biomasa. Si es necesario, se puede añadir medio líquido nutriente fresco. En una realización, se deja que las células crezcan hasta una densidad óptica de 100-400, después de lo cual, se recoge la biomasa y se realiza una extracción para proporcionar el medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal. El proceso de extracción es conocido por un experto en la materia, por ejemplo, se pueden separar por filtración los componentes insolubles y los componentes solubles obtenidos como el medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal (extracto de suspensión de células

de meristemo vegetal).

5 Sin estar ligado por teoría alguna, se cree que a través del crecimiento de las células vegetales, las células son capaces de acondicionar los medios nutrientes metabolizando compuestos en los medios y excretando en los medios algunos de estos metabolitos junto con otros diversos compuestos producidos en células vegetales. Dado que la fuente inicial de tejido vegetal procede del meristemo vegetal, para los fines de la presente solicitud de patente, los medios acondicionados se denominan "medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal".

Si es necesario, los medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal así obtenidos (extractos de suspensión de células de meristemo vegetal) pueden procesarse adicionalmente por métodos conocidos por los expertos en la técnica para mejorar el color o el olor o para concentrar o incluso secar completamente el producto.

10 La eficacia de los medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal (extractos de suspensión de células de meristemo vegetal) puede mejorarse adicionalmente incluyendo los medios en sistemas de suministro tales como, por ejemplo, liposomas, niasomas, polimerosomas, dendrimerosomas y similares, o a través de mecanismos de mejora de penetración tales como, por ejemplo, iontoforesis.

15 Los medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal (extractos de suspensión de células de meristemo vegetal) también pueden incluirse en sistemas anhidros por separación del disolvente de extracción mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica tales como, por ejemplo, liofilización, secado por pulverización, secado en cinta y similares. En la forma anhidra, los medios se pueden incluir en geles anhidros tales como, por ejemplo, geles de silicona o en polvos anhidros tales como, por ejemplo, bases y polvos prensados.

20 Los medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal (extractos de suspensión de células de meristemo vegetal) son adecuados para su uso en la composición tópica de la invención. Además, estos medios acondicionados pueden ser también la base para otras modificaciones a través de una fermentación adicional de plantas o microorganismos, en que el medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal se añade a un proceso de fermentación en curso como fuente secundaria de nutrientes de la fermentación.

25 El componente (b) de la composición tópica de la presente invención es un conservante presente en una cantidad suficiente para proporcionar una eficacia esterilizante o bioestática con respecto al componente (a), el medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal.

30 Conservantes son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, ingredientes tales como ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido salicílico o ácido sórbico, alcoholes orgánicos tales como, por ejemplo, fenoxietanol, alcohol bencílico, glicoles y etanol, ingredientes cuaternarios tales como, por ejemplo, Quaternium-15, enzimas tales como, por ejemplo, glucosa oxidasa y lactoperoxidasa en combinación con un sustrato tal como glucosa vendido comercialmente como Biovert por Arch Personal Care (South Plainfield, NJ) y similares, o combinaciones de estos conservantes.

35 Conservantes preferidos se seleccionan del grupo que consiste en ácido salicílico, ácido sórbico, fenoxietanol, alcohol bencílico, etanol, Quaternium-15, glucosa oxidasa y lactoperoxidasa en combinación con un sustrato, y combinaciones de los mismos.

40 El conservante debe ser añadido a los medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal (extractos de suspensión de células de meristemo vegetal) a una concentración suficiente para actuar como un antibiótico, que es esencialmente esterilizar los medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal, o como un agente bioestático, manteniendo los medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal en un estado tal que no se reproducen los microorganismos vivos presentes en los medios. Métodos para determinar la eficacia de un sistema conservante son bien conocidos por los expertos en la técnica. El método más popular para probar la eficacia del conservante se denomina prueba de desafío. En este método de ensayo, los microorganismos se introducen en los medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal líquidos de una manera controlada y se les permite tratar de crecer en los medios. Si los niveles de microorganismos disminuyen o permanecen inalterados a lo largo de un tiempo prescrito, se dice que el medio está adecuadamente protegido frente a una contaminación microbiana.

Un conservante particularmente preferido es fenoxietanol.

El conservante y, en particular, fenoxietanol, se utiliza preferiblemente a un nivel de al menos 0,5% en peso, más preferiblemente 1,0% en peso, lo más preferido 1,2% en peso de la composición.

50 Si el producto se aísla en forma de un sólido, es probable que todavía se requiera un conservante para mantener el producto el tiempo suficiente para permitir el secado y permanecerá en el producto en polvo después del evento de secado. Métodos de secado son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, secado por pulverización, liofilización, secado en tambor, secado de película, y similares. Un método de secado especialmente preferido de los métodos de secado por pulverización se describe, por ejemplo, en el documento US 2003/0198682 A1.

55 Los componentes (a) y (b) se han descrito anteriormente. El componente (c) de la composición de la invención es un

vehículo dermatológicamente aceptable. La frase "vehículo dermatológicamente aceptable", tal como se utiliza en esta memoria, significa que el vehículo es adecuado para aplicación tópica a la piel, tiene buenas propiedades estéticas, es compatible con los agentes activos de la presente invención y cualesquiera otros componentes y no provocará ninguna preocupación adversa de seguridad o toxicidad.

- 5 El vehículo puede estar en una amplia diversidad de formas. Por ejemplo, en esta memoria son útiles soportes de emulsión, incluyendo, pero no se limitan a emulsiones de aceite en agua, agua en aceite, agua en aceite en agua y aceite en agua en silicona. Estas emulsiones pueden cubrir una amplia gama de viscosidades, p. ej., de aproximadamente 100 cps a aproximadamente 200.000 cps. Estas emulsiones también pueden suministrarse en forma de pulverizaciones utilizando recipientes de bomba mecánica o recipientes de aerosol presurizados utilizando propelentes convencionales. Estos soportes también pueden ser suministrados en forma de una espuma. Otros soportes tópicos adecuados incluyen disolventes líquidos anhidros tales como aceites, alcoholes y siliconas (p. ej., aceite mineral, etanol, isopropanol, dimeticona, ciclometicona y similares); disolventes líquidos monofásicos de base acuosa (p. ej., sistemas de disolventes acuoso-alcohólicos); y versiones espesadas de estos disolventes monofásicos anhidros y de base acuosa (p. ej., en los casos en los que la viscosidad del disolvente se ha incrementado para formar un sólido o semisólido mediante la adición de gomas, resinas, ceras, polímeros, sales y similares apropiados). Ejemplos de sistemas de soportes tópicos útiles en la presente invención se describen en las siguientes cuatro referencias: "Sun Products Formulary" Cosmetics & Toiletries, vol. 105, págs. 122-139 (diciembre de 1990); "Sun Products Formulary", Cosmetics & Toiletries, vol. 102, págs. 117-136 (marzo de 1987); Patente de EE.UU. N° 4.960.764 expedida a Figueroa et al.; y patente de EE.UU. N° 4.254.105 expedida a Fukuda et al.
- 10
- 15
- 20 Una discusión más detallada de vehículos adecuados se encuentra en la Patente de EE.UU. N° 5.605.894 concedida a Blank et al., y la Patente de EE.UU. N° 5.681.852 expedida a Bissett. El vehículo también puede ser una composición tópica de tipo en polvo tal como, por ejemplo, una base en polvo.

Adicionalmente, la composición tópica de la presente invención puede contener opcionalmente otros ingredientes funcionales tales como agua, tensioactivos, emulsionantes, acondicionadores, emolientes, ceras, aceites, polímeros, espesantes, fijadores, colorantes, humectantes, hidratantes, estabilizadores, diluyentes, disolventes, fragancias y similares, así como ingredientes activos tales como, por ejemplo, agentes botánicos, nutracéuticos, cosmeceúticos, terapéuticos, farmacéuticos, antifúngicos, antimicrobianos, hormonas esteroides, agentes anticasma, componentes anti-acné, protectores solares, conservantes y similares.

25

La composición tópica de la invención puede estar en cualquier forma conocida por una persona experta en la técnica, por ejemplo, una crema, loción, gel, suero, jabón, bastón, polvo o similar. La composición se puede aplicar como un producto de reposición o como un producto destinado a ser enjuagado de la piel inmediatamente después de aplicaciones, incluyendo estos productos cosas tales como lavados corporales, champús y similares.

30

Se ha encontrado, sorprendentemente, que la aplicación de las composiciones tópicas de la presente invención puede influir en las alteraciones epigenéticas relacionadas con la edad y retrasar y aliviar ciertos aspectos del envejecimiento de la piel. A través de la aplicación tópica de composiciones que contienen medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal (extractos de suspensión de células de meristemo vegetal), se ha encontrado, sorprendentemente, que la modulación de la metilación del ADN puede ocurrir de tal manera que las células envejecidas experimentan una transformación y recuperan los patrones de metilación de CpG del ADN que tenían sus células más jóvenes, no envejecidas. Patrones de metilación del ADN, tanto al nivel genómico como al de genes específicos pueden ser modulados a través de la aplicación de medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal. La identificación de que tanto el genoma como los genes individuales tienen estados de metilación reversibles y que los medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal pueden influir en el estado de metilación de las células de la piel resulta en nuevas oportunidades terapéuticas tópicas.

35

40

Aunque el genoma puede ser exactamente el mismo en dos individuos, la regulación de la expresión génica a través de modificaciones epigenéticas puede jugar un papel en grandes diferencias entre la longevidad y la aptitud del organismo o tejido. Mediante la modulación de los patrones de metilación del ADN celular se pueden lograr oportunidades para tratar la pérdida del cabello, estados inflamatorios de la piel, pigmentación y manchas de la edad, arrugas, sequedad de la piel relacionada con el envejecimiento y pérdida de elasticidad y textura de la piel, entre otras dolencias.

45

El patrón epigenético y el mantenimiento son de gran importancia para el funcionamiento celular normal. Mediante el perfil de metilación CpG de tejidos de la piel jóvenes y envejecidos, se puede observar la caracterización del papel del envejecimiento y la exposición a los UVB en cuanto a la variación de la metilación. Debido a que la correlación positiva más fuerte entre el envejecimiento y la metilación se produce en loci en las islas CpG en las regiones de promotor del gen, los estudios sobre la eficacia de los medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal se centraron en estos sitios importantes de metilación.

50

55

En otra realización, la presente invención se refiere también a un concentrado de composición que comprende: (a) un medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal que es un extracto de suspensión de células de meristemo vegetal derivado de plantas del género *Oryza*, (b) un conservante presente en una cantidad suficiente para proporcionar una eficacia esterilizante y bioestática con respecto al componente (a), en donde el componente (a)

está presente en una cantidad de 0,0000001% a 99% en peso de la composición, prefiriéndose 90% a 99% y siendo más preferido 97% a 99%, y el componente (b) está presente en una cantidad de 0,01% a 10% en peso de la composición, prefiriéndose 0,1% a 5% y siendo lo más preferido 0,4% a 2%.

5 En una realización preferida, el componente (a) del concentrado de la composición es un medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal que es un extracto de suspensión de células de meristemo vegetal derivado de plantas de *Oryza sativa*.

El concentrado de composición de la presente invención se puede incorporar adecuadamente en una composición tópica tal como se ha descrito anteriormente por cualesquiera métodos conocidos por una persona experta en la técnica.

10 Aún otra realización de la invención es un procedimiento para preparar la composición de la invención, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de

- (i) proporcionar células vegetales totipotentes, indiferenciadas, derivadas de plantas del género *Oryza*;
- (ii) cultivar las células vegetales en un medio nutriente líquido en presencia o ausencia de tensiones químicas, gaseosas o energéticas destinadas a provocar la expresión de metabolitos de células vegetales secundarios para producir una mezcla que contiene componentes solubles en agua e insolubles en agua
- 15 (iii) separar los componentes insolubles en agua para producir el medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal, que es un extracto de suspensión de células de meristemo vegetal, y
- (iv) combinar el medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal con un conservante y un vehículo dermatológicamente aceptable, haciendo de este modo la composición de la invención.

20 En una realización preferida del procedimiento, las células vegetales de la etapa (i) se derivan de plantas de *Oryza sativa*.

En otra realización preferida del procedimiento, las células vegetales se cultivan en presencia de ozono en la etapa (ii).

25 En una realización particularmente preferida del procedimiento, las células vegetales de la etapa (i) se preparan mediante un método, que comprende las etapas de

- (1) hacer crecer meristemos vegetales derivados de las plantas del género *Oryza* en un medio nutriente sólido; y
- (2) seleccionar cultivos estabilizados, produciendo de este modo dichas células vegetales.

30 Todavía otra realización de la invención es un método para controlar la metilación del ADN en células de la piel humana, que comprende poner en contacto la piel con una composición tópica que comprende:

- (a) medios nutrientes acondicionados de meristemo vegetal derivados de plantas del género *Oryza*,
- (b) un conservante presente en una cantidad suficiente para proporcionar una eficacia esterilizante o bioestática con respecto al componente (a); y
- (c) un vehículo dermatológicamente aceptable.

35 El método anterior para controlar la metilación de ADN en células de la piel humana es preferiblemente no terapéutico, p. ej., es cosmético.

La invención se describe adicionalmente en los Ejemplos dados a continuación. Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar el alcance de la presente invención. Todos los porcentajes dados aquí son porcentajes en peso basados en el peso total de la composición, a menos que se indique lo contrario.

40 **Ejemplo 1:**

Producción de un medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal de *Oryza sativa* (arroz)

45 Cultivos de meristemos de arroz se cultivaron en un medio sólido (Murashigie & Skoog con vitaminas Gamborg 1X, 30 g/L de sacarosa, 1 mg/L de cinetina, 0,2 mg/L de IAA y agar al 1% a pH 5,6) y se sub-cultivaron durante al menos tres meses. El callo de la misma línea de cultivo se inoculó en múltiples matraces de 250 mL que contenían aproximadamente 60 mL del medio anterior sin agar. Después de dos semanas, el cultivo se introdujo en un matraz de 500 mL que contenía aproximadamente 130 mL de medio líquido, que contenía medio Murashigie & Skoog, vitaminas Gamborg 1X, 30 g/L de sacarosa, 1 mg/L de cinetina, 0,2 mg/L de IAA a pH 5,6. Después de dos semanas, el cultivo se cambió a un matraz de 1 L que contenía aproximadamente 300 mL de medio líquido. Después de la fermentación durante 14 días, se introdujeron 600 mL de cultivo en un biorreactor de 3 L con un

volumen de trabajo de 2,3 L. Después de tres semanas de fermentación, se trasladaron 5 L de cultivo a un biorreactor de 30 L con un volumen de trabajo de 22 L. Después de la fermentación durante tres semanas, se trasladaron 40 L de cultivo a un biorreactor de 250 L con un volumen de trabajo de 200 L. Después de cuatro semanas de fermentación, 200 L se trasladaron a un biorreactor de 1000 L con un total de 400 L de medio líquido. Después de 2 semanas de fermentación, se añadieron 350 L de medio reciente para llevar el volumen total a 750 L. Se dejó crecer el cultivo durante 2 semanas, después de lo cual se añadieron 0,5 ppm de ozono al conducto de aire. El cultivo creció durante una semana adicional para producir metabolitos secundarios, después de lo cual el cultivo se homogeneizó utilizando un homogeneizador Niro y se filtró para separar el material sólido. Al material resultante se le aludió como medio nutriente acondicionado de meristemo de arroz (extracto de suspensión de células de meristemo vegetal) o como cultivo de arroz para abreviar.

Ejemplo 2:

Cromatograma de HPLC de medio nutriente acondicionado de meristemo de arroz estresado con ozono del Ejemplo 1

El análisis de HPLC se realizó en el extracto de medio nutriente acondicionado de meristemo del Ejemplo 1. Se observaron picos múltiples, pero sólo uno era de biotina, lo que denota que el ozono provoca la producción de metabolitos secundarios por los cultivos de arroz. El análisis se realizó utilizando una columna Phenomenex Kinetex de 2,6 µm, 100 x 4,6 mm. El disolvente A era metanol. El disolvente B era fosfato sódico 50 mM (pH 4,5). Se utilizó disolvente A al 10% y el disolvente B se utilizó al 90% isocráticamente. El caudal era de 1,0 mL por minuto y la temperatura de la columna era de 30°C. La detección se realizó a una longitud de onda de 200 nm. El resultado del análisis HPLC se muestra en la Figura 1.

Ejemplo 3

Cromatograma de HPLC de medio nutriente acondicionado de meristemo de arroz no estresado con ozono

Se preparó un extracto de meristemo de arroz de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1, excepto que no se añadió ozono. El análisis por HPLC se realizó en las condiciones descritas en el Ejemplo 1. El resultado se muestra en la Fig. 2. Tal como se muestra en la Fig. 2, se observaron muy pocos picos de metabolitos secundarios en el cromatograma de HPLC.

Ejemplo 4

La metilación media de CpG en todos los promotores de genes de todo el genoma en fibroblastos cultivados *in vitro* disminuye con la aplicación de medio nutriente acondicionado de meristemo de arroz ozonizado del Ejemplo 1

Tal como se describió arriba, un rasgo importante de las células jóvenes es que tienen bajos niveles de metilación en comparación con las células más viejas. Este ejemplo demuestra que la aplicación de 2% de medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal del Ejemplo 1 aplicado a fibroblastos cultivados *in vitro* provocó que las células tuvieran un nivel disminuido de metilación en los promotores de genes de todo el genoma en comparación con el control no tratado.

Sumario del Método de Ensayo

Para este estudio, se tomaron fibroblastos dérmicos humanos a lo largo de un período de envejecimiento intrínseco y extrínseco combinado (pasajes secuenciales de células y exposición repetida a UVB) o no envejecidos. Para el procedimiento de envejecimiento intrínseco los fibroblastos se tomaron a través de 8 pasajes de cultivo celular (3 semanas en cultivo). Las células se cultivaron en placas de 12 pocillos y se cultivaron hasta confluencia (cada 48 a 72 horas) y se cosecharon y se sembraron nuevamente a un 50% de la densidad celular original, de manera que cada uno de los pasajes representaba aproximadamente una duplicación de la población. Para el aspecto de envejecimiento extrínseco, las células se irradiaron con UVB tres veces por semana. Si bien la intención original del estudio era llevar a este grupo a través de 8 pasajes, esto no fue posible. En el tercer pasaje la velocidad de replicación celular se había ralentizado hasta el punto en el que ya no era posible pasar las células. Este grupo se mantuvo en cultivo durante 3 semanas y se sometió a 9 exposiciones a UVB.

Además de los tratamientos de envejecimiento, los fibroblastos también se trataron con materiales de ensayo que estaban presentes durante todo el proceso de envejecimiento. La lista de grupos de tratamiento es la siguiente:

1. Células No Envejecidas (cosechadas después de unos pocos días en cultivo)
2. Envejecimiento Intrínseco + Envejecimiento Extrínseco
3. Envejecimiento Intrínseco + Envejecimiento Extrínseco + 2% de cultivo de arroz del Ejemplo 1

Al final del período de cultivo, el medio de cultivo celular se recogió y se analizó para detectar cambios.

Métodos

Preparación y Tratamiento de Fibroblastos

Los fibroblastos se sembraron en los pocillos individuales de una placa de 12 pocillos en 1 mL de Medio de Crecimiento de Fibroblastos (MGF) y se incubaron a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $5\pm 1\%$ de CO_2 , cambiándose los medios cada 48 a 72 horas. Al alcanzar la confluencia, las células se cosecharon y luego se sembraron nuevamente a un 50% de su densidad original. Para las exposiciones a UVB en los grupos de envejecimiento intrínseco más extrínseco, el medio de cultivo celular se reemplazó con solución salina tamponada con fosfato y las células se expusieron a 5-7 mJ/cm^2 de UVB. Esta exposición se aplicó tres veces a la semana con al menos 24 horas entre las exposiciones.

Las células se cultivaron durante 3 semanas como se ha descrito anteriormente. Durante este tiempo, el grupo de envejecimiento intrínseco más extrínseco pasó por 3 duplicaciones de población y 9 exposiciones a UVB. Al final del período de tres semanas, el medio de cultivo celular y las células se recogieron 48 horas después del último cambio de medio. Las células se enjuagaron con solución salina tamponada con fosfato para separar cualquier material residual de ensayo y luego se añadieron a cada uno de los pocillos 200 μL de tampón de lisis (EDTA 1 mM, Triton X-100 al 0,5%, NaF 10 mM, NaCl 150 mM, β -glicerofosfato 20 mM, DTT 1 mM, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de leupeptina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pepstatina, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de aprotinina preparada en solución salina tamponada con fosfato). Las células se incubaron durante aproximadamente 15 minutos en hielo para permitir una lisis completa. Los lisados se recogieron a continuación y se almacenaron a -75°C hasta su análisis.

Protocolo de matriz de metilación

El chip de matriz de metilación de CpG del ADN es de Agilent y cubre 27.627 islas CpG. Para la matriz, ADN genómico total (5 μg) fue aislado de fibroblastos *in vitro*, y luego se cortaron en fragmentos (aproximadamente 400 a 800 bases de longitud). A partir de esta muestra de 5 μg de ADN genómico cortado, se separó 1 μg de ADN genómico total, mientras que los 4 μg restantes se utilizaron para aislar ADN metilado. El ADN metilado se separó utilizando inmunoprecipitación con un anticuerpo específico para ADN metilado. El 1 μg de ADN genómico total y el ADN metilado fueron entonces marcados por fluorescencia y se aplicó a la matriz de metilación del ADN. Después de hibridar, se escaneó la matriz y se determinó entonces la intensidad de fluorescencia de las características de la matriz. Los valores para todos los sitios CpG en todos los promotores de genes se promediaron para determinar la media. Los resultados se reseñan en la Fig. 3.

Los datos en la Fig. 3 demuestran que la aplicación tópica de 2% del medio nutriente acondicionado de meristemo de arroz muestra una reducción en la metilación global de CpG en la región de promotor en fibroblastos intrínseca y extrínsecamente envejecidos en comparación con células similares sin tratamiento.

Ejemplo 5

La metilación media de CpG en el promotor de colágeno 1A1 en fibroblastos cultivados *in vitro* disminuye con la aplicación de medio nutriente acondicionado de meristemo de arroz ozonizado del Ejemplo 1

Uno de los genes que ha incrementado la metilación del promotor durante el envejecimiento es colágeno 1A1 (Takatsu *et al.*, 1999). Este ejemplo ilustra que la aplicación de 2% de medios nutrientes acondicionados de meristemo de arroz del Ejemplo 1 a fibroblastos cultivados *in vitro* provocó que las células tuvieran un nivel disminuido de metilación en el promotor del gen de colágeno 1A1 en comparación con células similares sin tratamiento. El ensayo se realizó tal como se ha descrito anteriormente. Los niveles de metilación en todos los sitios CpG en el promotor de colágeno 1A1 se promediaron y se encontró la media. Los resultados se reseñan en la Fig. 4.

Los datos en la Fig. 4 demuestran que la aplicación tópica de 2% de medio nutriente acondicionado de meristemo de arroz del Ejemplo 1 demuestra una reducción en la metilación de CpG del ADN en el promotor del gen de colágeno 1A1 en células que han sido envejecidas intrínseca y extrínsecamente comparadas con células similares sin tratamiento.

Ejemplo 6

La metilación media de CpG en el promotor de colágeno 1A2 en fibroblastos cultivados *in vitro* disminuye con la aplicación de medios nutrientes acondicionados de meristemo de arroz ozonizado del Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra que la aplicación de 2% de medio nutriente acondicionado de meristemo de arroz a células de fibroblastos cultivadas *in vitro* provocó que las células tuvieran un nivel disminuido de metilación en el promotor del gen de colágeno 1A2. El ensayo se realizó como se ha descrito anteriormente. Los niveles de metilación en todos los sitios CpG en el promotor de colágeno 1A2 se promediaron y se encontró la media. Los resultados se reseñan en la Fig. 5.

Los datos en la Fig. 5 demuestran que la aplicación tópica de 2% de medio nutriente acondicionado de meristemo de arroz del Ejemplo 1 demuestra una reducción en la metilación de CpG del ADN en el promotor del gen de colágeno 1A2 en células que han sido envejecidas intrínseca y extrínsecamente comparadas con células similares cultivadas

sin tratamiento.

Ejemplo 7

Los niveles de proteína de colágeno en fibroblastos cultivados *in vitro* aumentan con la aplicación de medio nutriente acondicionado de meristemo de arroz ozonizado del Ejemplo 1

5 Este ejemplo ilustra que la aplicación de 2% de medio nutriente acondicionado de meristemo de arroz a células de fibroblastos *in vitro* provocaron que las células aumentaran su producción de colágeno. Las células se cultivaron y se trataron como arriba. El ensayo de colágeno se realizó tanto en muestras de medios recogidas a las 24 horas como en medios recogidos en el instante de 48 horas. Para el ensayo, se preparó una serie de patrones de péptidos C de tipo I que oscilaban entre 0 ng/mL y 640 ng/mL. A continuación, se preparó una microplaca ELISA separando cualesquiera tiras innecesarias del marco de la placa seguido de la adición de 100 µl de anticuerpo peptídico de tipo I-C anti-procolágeno marcado con peroxidasa a cada uno de los pocillos utilizados en el ensayo. Después se añadieron veinte (20) µL de cualquiera de las muestras (medio de cultivo de tejido recogido) o patrón a los pocillos apropiados y la microplaca se cubrió y se dejó incubar durante $3 \pm 0,25$ horas a 37°C. Después de la incubación, los pocillos fueron aspirados y lavados tres veces con 400 µL de tampón de lavado. Después de retirar el último lavado, se añadieron 100 µL de disolución de sustrato de peroxidasa (peróxido de hidrógeno + tetrametilbencidina como cromógeno) a cada uno de los pocillos y la placa se incubó durante 15 ± 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadieron 100 µL de disolución de parada (ácido sulfúrico 1 N) a cada uno de los pocillos y se leyó la placa utilizando un lector de microplacas a 450 nm. Los resultados se reseñan en la Fig. 6.

20 Los datos en la Fig. 6 demuestran que la aplicación tópica de 2% de medio nutriente acondicionado de meristemo de arroz del Ejemplo 1 demuestra un aumento en el colágeno de Tipo 1A en células que han sido envejecidas intrínseca y extrínsecamente comparadas con células semejantes cultivadas sin tratamiento.

Ejemplo 8

Los niveles de proteína dermatopontina en fibroblastos cultivados *in vitro* aumentan con la aplicación de medio nutriente acondicionado de meristemo de arroz ozonizado del Ejemplo 1

25 Este ejemplo ilustra que la aplicación de 2% de medio nutriente acondicionado de meristemo de arroz del Ejemplo 1 a células de fibroblastos cultivadas *in vitro* provocó que las células aumentaran su producción de dermatopontina. Las células se cultivaron y se trataron como anteriormente. Los niveles de proteína dermatopontina se ensayaron utilizando inmunotransferencia.

Transferencia de Microfiltración de Lisado de Células e Inmunodetección

30 Se equilibró una membrana en solución salina tamponada con Tris (TBS: Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) y se ensambló en un aparato de microfiltración Bio-Dot. Después del ensamblaje, se añadieron 200 µL de TBS a cada uno de los pocillos utilizados en el Bio-Dot y se aplicó vacío para asegurar que hubiera un flujo adecuado a través de todos los pocillos. A continuación, se asignó a cada una de las muestras de lisado de células (aproximadamente 5 µg) un pocillo en el aparato y se aplicó al pocillo apropiado. Las muestras se filtraron en bajo vacío. Se añadió TBS a los pocillos a los que no se asignó una muestra para asegurar que la membrana no se secase durante el proceso. Al final del proceso de transferencia, se aplicaron 200 µL adicionales de TBS y se filtró a través de cada uno de los pocillos. La membrana se retiró entonces del aparato Bio-Dot, se lavó en TBS durante 5-10 minutos y después se colocó en disolución de bloqueo (solución salina tamponada con Tris [Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, leche en polvo sin grasa al 0,1%]) y se dejó incubar durante al menos 1 hora a temperatura ambiente en una plataforma oscilante.

Incubación y Detección de Anticuerpos

45 Después de bloquear, la membrana se transfirió a 20 mL de TBST (TBS con Tween-20 al 0,1%) y leche en polvo sin grasa al 0,1% con una dilución apropiada del anticuerpo de detección y se dejó incubar durante la noche a 4°C en una plataforma oscilante. Después de esta incubación, la membrana se lavó 3 veces (1 vez durante 15 minutos y 2 veces durante 5 minutos) en TBST. El anticuerpo secundario (conjugado con un fluoróforo) se incubó entonces con la membrana en 15 mL de TBST con leche en polvo sin grasa al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente y después se lavó 3 veces con TBS (1 vez durante 15 minutos, 2 veces durante 5 minutos).

50 Después del lavado final, la membrana se colocó en un aparato BioRad Molecular Imager FX y se escaneó utilizando una combinación de láser de excitación y filtro de emisión apropiada para el fluoróforo. Las imágenes producidas por el escáner se analizaron a continuación utilizando el software de análisis de imágenes ImageJ. Los resultados se reseñan en la Fig. 7.

Los datos en la Fig. 7 demuestran que la aplicación tópica de 2% de medio nutriente acondicionado de meristemo de arroz del Ejemplo 1 provocó un aumento significativo en la expresión de dermatopontina en células envejecidas frente a células no tratadas cultivadas bajo condiciones similares.

Ejemplo 9**Emulsiones de aceite en agua**

El medio nutriente acondicionado de meristemo de arroz del Ejemplo 1 ("cultivo de arroz") se formuló en una emulsión de aceite en agua utilizando la siguiente formulación y procedimiento:

5 Emulsión de Aceite en Agua que contiene Extracto del Ejemplo 1

Ingrediente	Nomenclatura INCI	%
Agua	Agua	c.s.
Versene 100	EDTA Tetrasódico	0,10
Glicerina	Glicerina	2,00
Carbopol Ultrez 10	Carbómero	0,20
Brookswax D	Alcohol Cetearílico y Cetearéth-20	2,00
Liquiwax DIADD **	Dodecanodioato de Dioctildodecilo	5,00
Loronate TMP-TC	Tricaprilato / Tricaprato de Trimetilolpropano	2,00
Arlacel 60	Estearato de Sorbitán	1,50
Alcohol Estearílico	Alcohol Estearílico	0,20
Alcohol Cetílico	Alcohol Cetílico	0,50
Ácido Esteárico	Ácido Esteárico	0,50
Myritol 318	Triglicérido Caprílico / Cáprico	2,00
DC 200/100 cst	Dimeticona	0,75
Agua	Agua	5,00
TEA 99	Trietanolamina	0,25
Cultivo de Arroz del Ejemplo 1	-	1,00
Mikrokill COS	Fenoxietanol y Caprilil-Glicol y Clorofenesina	0,75

Procedimiento:

Combinar la fase A y calentar a 75 °C. Mezclar hasta que sea uniforme.

Combinar la fase B y calentar a 75 °C. Mezclar hasta que sea uniforme.

10 Con mezcladura lenta, añadir la Fase B a la Fase A. Mezclar durante 20 minutos.

Agregar la Fase C de Premezcla y mezclar hasta que sea uniforme. Desconectar el calor.

En la caldera pre-mezclar la Fase D y agregar a la tanda por debajo de 40 °C. Mezclar hasta que sea uniforme.

Añadir Mikrokill COS y fragancia de la Fase E, y mezclar hasta que sea uniforme.

Ejemplo 1015 **Emulsiones de agua en aceite**

El cultivo de arroz del Ejemplo 1 se formuló en emulsiones de agua-en-aceite utilizando la siguiente formulación y proceso:

Agua en Emulsión de Aceite que contiene medios nutrientes acondicionados de meristemo de arroz

Ingrediente	Nomenclatura INCI	%
Agua	Agua	c.s. hasta 100
Glicerina	Glicerina	3,00
Cloruro Sódico	Cloruro Sódico	1,00
Cultivo de Arroz del Ejemplo 1		1,00
Mikrokill COS	Fenoxietanol y Caprilil-Glicol y Clorofenesina	0,75
SF1328	Ciclometicona y Dimeticona Copoliol	10,00
SF 1202	Ciclometicona	8,50
Gel Base Sil	Ciclometicona y Dimeticona	1,50
Gel Base BSM-PE	Ciclometicona y Dimeticona y Fenil-Trimeticona y Polietileno	1,50
		100,00

Procedimiento:

Mezclar todos los ingredientes de la Fase A juntos.

- 5 Combinar los ingredientes de la Fase B en el orden indicado, mezclando a fondo cada uno de los componentes hasta homogeneizar antes de agregar los siguientes ingredientes.

Añada lentamente la Fase A a la Fase B con una buena mezcladura. Gradualmente, aumentar la agitación hasta una alta cizalladura a medida que la mezcla se espesa. Continuar la agitación durante 10 minutos.

Ejemplo 11

10 Composiciones de gel de ojos

El cultivo de arroz del Ejemplo 1 se encapsuló en una composición liposómica, a continuación el extracto encapsulado se incorporó en una composición de gel para los ojos utilizando el siguiente proceso:

GEL DE OJOS que contiene liposoma de medios nutrientes acondicionados con meristemo de arroz

Ingrediente	Nomenclatura INCI	%
Agua	Agua	c.s.
Carbopol Ultrez 21	Polímero Cruzado de Acrilatos/Acrilato de Alquilo C10-30	0,50
Keltrol CG-SFT	Goma xantano	0,10
Butilenglicol	Butilenglicol	5,00
Mikrokill COS	Fenoxietanol y Caprilil-Glicol y Clorofenesina	1,00
Tensioactivo Dow Corning 193	Dimeticona Copoliol	0,30
EDTA Disódico	EDTA Disódico	0,10
AMP 95	Aminometilpropanol	0,45
Cultivo de arroz que contiene liposomas del Ejemplo 1	--	1,00

Procedimiento:

1. Dispersar el Carbopol Ultrez 21 en agua a 50 °C y añadir el Keltrol CG-SFT. Mezclar hasta que sea uniforme.
2. Añadir el Butilenglicol, Mikrokill COS, AMP, EDTA y Silicona 193. Mezclar hasta que sea uniforme.
3. Añadir el liposoma de medios nutrientes acondicionados con meristemo de arroz con agitación de barrido a 40 °C. Mezclar hasta que sea uniforme.
5. Ajustar el pH a 5,5, si es necesario.

Ejemplo 12

Extracto Encapsulado del Ejemplo 1

- 10 El cultivo de arroz del Ejemplo 1 se encapsuló en una matriz polimérica utilizando las técnicas descritas en la Publicación de la Solicitud de Patente de EE.UU. Nº 2003/0198682 A1.

Ejemplo 13

Composiciones de Lápiz Labial

El cultivo de arroz del Ejemplo 1 se encapsuló en la matriz polimérica del Ejemplo 12, que luego se formuló en un lápiz labial utilizando la siguiente formulación y procedimiento:

- 15 LÁPIZ LABIAL que contiene medio nutriente acondicionado con meristemo de arroz

Ingrediente	Nomenclatura INCI	%
<i>Fase (A)</i>		
Aceite de Ricino	Aceite de Semillas de Ricinus Communis (Ricino)	31,45
Schercemol TISC	Citrato de triisoestearilo	15,00
Liquiwax PolyIPL	Dilinoleato Dímero de Estearil-PPG-3-Miristil-Éter	5,00
Liquiwax PolyEFA	Dilinoleato Dímero de Octildecil-PPG-3-Miristil-Éter	15,00
Cera de Candelilla	Cera de Euphorbia Cerifer (Candelilla)	6,00
Ozokerite 170D	Ozoquerita	2,50
Microwax SP 19	Cera Microcristalina	3,50
Cera de Carnauba	Cera de Copernicia cerifera (carnauba)	1,50
Metilparabeno	Metilparabeno	0,20
Propilparabeno	Propilparabeno	0,10
<i>Fase (B)</i>		
Mezcla de Colores		
Rojo 7 Lago c19-7711	Rojo 7 Lago	0,04
Rojo 6 Lago c 19-7712	Rojo 6 Lago	0,17
Óxido de Hierro Rojo A-1205	Óxidos de Hierro	2,00
Dióxido de Titanio Ultra-Fino 70110	Dióxido de Titanio	2,00
Óxido de Hierro Negro c33-134	Óxidos de Hierro	0,05
Liquiwax PolyEFA *	Dilinoleato Dímero de Octildodecil-PPG-3-Miristil-Éter	4,44
<i>Fase (C)</i>		
Palmitato de Ascorbilo	Palmitato de Ascorbilo	0,05
Rojo Flamenco	Mica y Dióxido de Titanio	10,00
Cultivo de arroz en polvo del Ejemplo 12	--	1,00

Procedimiento:

Combinar Ceras, Aceites y Conservantes (Fase A) y calentar a 83-87 °C.

Mantener la temperatura y agitar hasta que sea homogéneo.

Bajar la temperatura a 75-80 °C y agregar la Fase B; mezclar hasta que sea homogéneo

- 5 Agregar Perla, medios nutrientes acondicionados de meristemo de arroz y Palmitato de Ascorbilo (Fase C).

Verter en moldes.

Ejemplo 14

Composiciones tonificantes

- 10 El cultivo de arroz del Ejemplo 1 se formuló en un tónico alcohólico acuoso utilizando la siguiente formulación y procedimiento:

Tonificador que contiene medios nutrientes acondicionados de meristemo de arroz

Ingrediente	Nomenclatura INCI	%
Agua	Agua	c.s. hasta 100
Betafin BP - 20 *	Betaína	3,00
Cultivo de Arroz del Ejemplo 1	--	1,00
Hamamelis con 14% de alcohol	Agua y Etanol y Hamamelis	25,00
Mikrokill COS	Fenoxietanol y Caprilil-Glicol y Clorofenesina	0,75

Procedimiento:

1. Cargar Agua y añadir Betafin BP-20 y medios nutrientes acondicionados de meristemo de Arroz. Mezclar hasta que sea uniforme.

- 15 2. Agregue Hamamelis y Mikrokill COS, mezclar hasta que sea uniforme.

Ejemplo 15

Composiciones de lavado corporal

El cultivo de arroz del Ejemplo 1 se formuló en un lavado corporal utilizando la siguiente formulación y procedimiento.

- 20 Lavado Corporal que contiene medios nutrientes acondicionados de meristemo de Arroz

Ingrediente	Nomenclatura INCI	%
Agua	Agua	c.s.
Hamp-ene Na2	EDTA Disódico	0,10
Glicerina	Glicerina	2,00
Standapol WAQ-Special	Lauril-Sulfato de Sodio	30,00
Standapol ES-2	Laureth-Sulfato de sodio	25,00
Cerasynt IP	Estearato de Glicol y Ácido Esteárico y Aminometil-Propanol	0,50
Velvetex BA-35	Cocoamidopropil-Betaína	7,00
Cocamide MEA	Cocamida MEA	2,00
Mikrokill COS	Fenoxietanol y Caprilil-Glicol y Clorofenesina	0,75
Cultivo de Arroz del Ejemplo 1		1,00

Procedimiento

1. Calentar Agua a 70 °C y agregar EDTA Disódico, Glicerina, y mezclar hasta que sea uniforme.
- 5 2. Mantener la temperatura por encima de 70 °C y agregar Standapol WAQ Special, Standapol ES-2, Cerasynt IP, Cocamida MEA, Velvetex BA-35, y mezclar hasta que sea uniforme.
3. Enfriar a 45 °C y añadir Mikrokil COS y extracto de naranja Osage.
4. Mezclar hasta que sea homogéneo.

Ejemplo 16

Levadura/Ejemplo 1 Extracto de productos de fermentación

- 10 El cultivo de arroz del Ejemplo 1 se incluyó como parte de medios de fermentación que contenían la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Una muestra del extracto del Ejemplo 1 se dispuso en una mezcla acuosa de medios de cultivo de levaduras de Baker, obtenido de Red Star Yeast (Milwaukee, WI). Los medios se inocularon con un cultivo de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* activo, también obtenidos de Red Star y la mezcla se dejó fermentar bajo condiciones aerobias controladas para proporcionar un Derivado de Célula de Levadura Vivo (LYCD) obtenido al utilizar condiciones de estrés tal como se describe en patente de EE.UU. 2.239.345.
- 15

Ejemplo 17

Concentrados en emulsión sub-micrónicos

Este ejemplo ilustra un concentrado en emulsión sub-micrónico que contiene cultivo de arroz preparado como se describe en el Ejemplo 1.

Ingrediente	% en peso
Tricaprilato/tricaprato de trimetilolpropano	18,0
Glicerina	8,0
Alcohol cetearílico	2,0
Ceteareth 20	2,0
Estearato de glicerilo	2,0
BHT	0,01
Cultivo de arroz del Ejemplo 1	1,0
Agua	hasta 100,0

20 Referencias

- Ball MP, Li JB, Gao Y, Lee JH, LeProust EM, Park IH, Xie B, Daley GQ, Church GM (2009) Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol* 27(4): 361-368.
- Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D (1985) A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 40: 91-99.
- 25 Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6-21.
- Boks MP, Derks EM, Weisenberger DJ, Strengman E, Janson E, Sommer IE, Kahn RS, Ophoff RA. (2009) The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. *PLoS One*. 4(8): e6767.
- Cropley JE, Suter CM, Beckman KB, Martin DI (2006) Germ-line epigenetic modification of the murine A_v allele by nutritional supplementation. *Proc Natl Acad Sci* 103: 17308-17312. Deng J, Shoemaker R, Xie B, Gore A, LeProust
- 30 EM, Antosiewicz-Bourget J, Egli D, Maherali N, Park IH, Yu J, et al. (2009) Targeted bisulfate sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat Biotechnol* 27: 353-360.

- Feng YQ, Desprat R, Fu H, Olivier E, Lin CM, et al. (2006) DNA methylation supports intrinsic epigenetic memory in mammalian cells. *PLoS Genet* 2: e65.
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, et al. (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci* 102: 10604-10609.
- 5 Gopisetty G, Ramachandran K, Singal R (2006) DNA methylation and apoptosis. *Mol Immunol* 43: 1729-1740.
- Herskind AM, McGue M, Holm NV, Sorensen TI, Harvald B, Vaupel JW (1996) The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900. *Hum Genet* 97: 319-323.
- Metivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le PC, Jurkowska RZ, et al. (2008) Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452: 45-50.
- 10 Mitchell BD, Hsueh WC, King TM, Pollin TI, Sorkin J, Agarwala R, Schaffer AA, Shuldiner AR (2001) Heritability of life span in the old order Amish. *Am J Med Genet* 102: 346-352.
- Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF, Smith HS, Baylin SB, et al. (1994) Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 54: 2552-2555.
- 15 Poulsen P, Esteller M, Vaag A, Fraga MF (2007) The epigenetic basis of twin discordance in age-related diseases. *Pediatr Res* 61: 38R-42R.
- Rakyan VK, Chong S, Champ ME, Cuthbert PC, Morgan HD, et al. (2003) Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin(Fu) allele occurs after maternal and paternal transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2538-2543.
- 20 Saxonov S, Berg P, Brutlag DL (2006) A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1412-1417.
- Takatsu M, Uyeno S, Komura J, Watanabe M, Ono T (1999) Age-dependent alterations in mRNA level and promoter methylation of collagen alpha1(I) gene in human periodontal ligament. *Mech Ageing Dev* 110: 37-48.
- Takai D, Jones PA (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(6): 3740-3745.
- 25 Weaver IC, Meaney MJ, Szyf M (2006) Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 3480-3485.

REIVINDICACIONES

1. Una composición tópica para controlar la metilación del ADN en células de la piel humana, que comprende:
 - (a) un medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal, que es un extracto de la suspensión de células de meristemo vegetal derivado de las plantas del género *Oryza*,
 - 5 (b) un conservante presente en una cantidad suficiente para proporcionar una eficacia esterilizante o bioestática con respecto al componente (a); y
 - (c) un vehículo dermatológicamente aceptable.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde el componente (a) está presente en una cantidad de 0,0000001% a 99% en peso de la composición, prefiriéndose 0,0001% a 50% y siendo más preferido 0,001% a 25% y siendo lo más preferido 0,01% a 10%, el componente (b) está presente en una cantidad de 0,01% a 10% en peso de la composición, siendo más preferida de 0,1% a 5% y siendo más preferida de 0,4% a 2%, y el componente (c) está presente en una cantidad de 1% a 98% en peso de la composición, siendo el más preferido 80% a 90%.
3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en donde el componente (a) se deriva de plantas de *Oryza sativa*.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el componente (a) ha sido preparado (i) cultivando meristemos vegetales derivados de las plantas del género *Oryza* en un medio nutriente líquido para producir una mezcla que contiene componentes solubles en agua e insolubles en agua, y (ii) separar los componentes insolubles en agua, produciendo con ello el medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las células de meristemo vegetal han sido cultivadas en un medio nutriente líquido en presencia de tensiones químicas, gaseosas o energéticas destinadas a provocar la expresión de metabolitos de células vegetales secundarios.
6. La composición de la reivindicación 5, en donde las células de meristemo vegetal han sido cultivadas en un medio nutriente líquido en presencia de ozono.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el conservante se selecciona del grupo que consiste en ácido salicílico, ácido sórbico, fenoxietanol, alcohol bencílico, etanol, Quaternium-15, glucosa oxidasa y lactoperoxidasa en combinación con un sustrato, y combinaciones de los mismos.
8. La composición de la reivindicación 7, en donde el conservante es fenoxietanol.
9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el conservante está presente en una cantidad de al menos 0,5% en peso, basado en el peso total de la composición.
10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende, además, al menos un ingrediente seleccionado del grupo que comprende agua, tensioactivos, emulsionantes, acondicionadores, emolientes, ceras, aceites, polímeros, espesantes, fijadores, colorantes, humectantes, hidratantes, estabilizadores, diluyentes, disolventes, fragancias, agentes botánicos, nutracéuticos, cosmeceúticos, terapéuticos, farmacéuticos, antifúngicos, antimicrobianos, hormonas esteroideas, agentes anticaspa, componentes anti-acné, protectores solares, conservantes y combinaciones de los mismos.
11. Un concentrado de composición que comprende:
 - (a) un medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal que es un extracto de suspensión de células de meristemo vegetal y se deriva de las plantas del género *Oryza*, y
 - (b) un conservante presente en una cantidad suficiente para proporcionar una eficacia esterilizante y bioestática con respecto al componente (a),
- en donde el componente (a) está presente en una cantidad de 0,0000001% a 99% en peso del concentrado de la composición, prefiriéndose 90% a 99% y siendo más preferido 97% a 99%, y el componente (b) está presente en una cantidad de 0,01% a 10% en peso del concentrado de la composición, prefiriéndose 0,1% a 5% y siendo lo más preferido 0,4% a 2%.
12. El concentrado de composición de la reivindicación 11, en donde el componente (a) se deriva de plantas de *Oryza sativa*.
13. Un procedimiento para preparar la composición de la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
 - (i) proporcionar células vegetales totipotentes e indiferenciadas derivadas de plantas del género *Oryza*;
 - (ii) cultivar las células vegetales en un medio nutriente líquido en presencia o ausencia de tensiones químicas, gaseosas o energéticas destinadas a provocar la expresión de metabolitos de células vegetales

- (iii) secundarios para producir una mezcla que contiene componentes solubles en agua e insolubles en agua, separar los componentes insolubles en agua para producir el medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal que es un extracto de suspensión de células de meristemo vegetal y
 - (iv) combinar el medio nutriente acondicionado de meristemo vegetal con un conservante y un vehículo dermatológicamente aceptable, haciendo de este modo la composición de la reivindicación 1.
- 5
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que las células vegetales de la etapa (i) se derivan de plantas de *Oryza sativa*.
15. El procedimiento de la reivindicación 13 o 14, en el que las células vegetales se cultivan en presencia de ozono en la etapa (ii).
- 10
16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que las células vegetales de la etapa (i) se preparan mediante un método, que comprende:
- (1) hacer crecer meristemas vegetales derivados de las plantas del género *Oryza* en un medio nutriente sólido; y
 - (2) seleccionar cultivos estabilizados, produciendo de este modo dichas células vegetales.

Figura 1

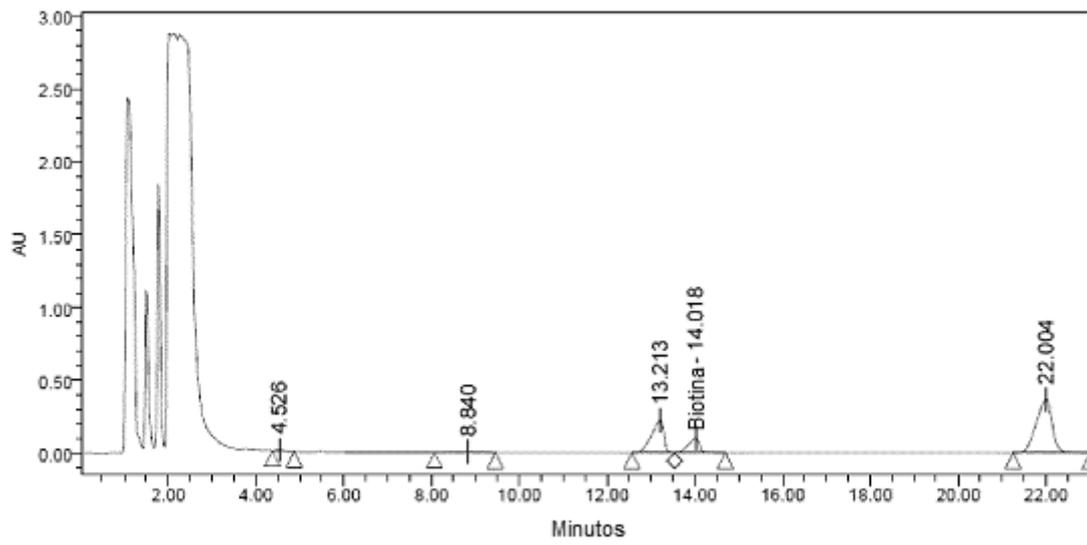


Figura 2

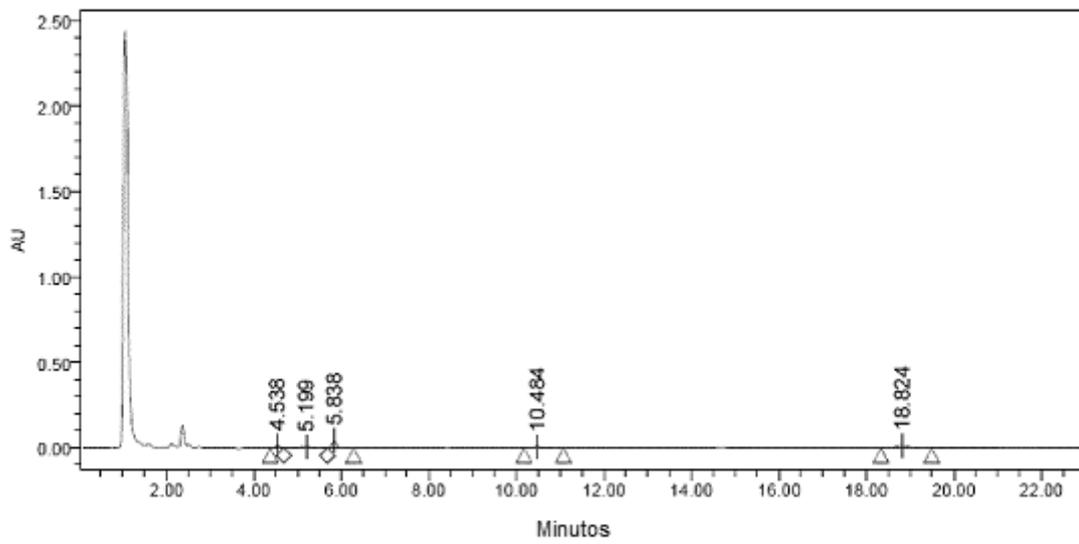


Figura 3

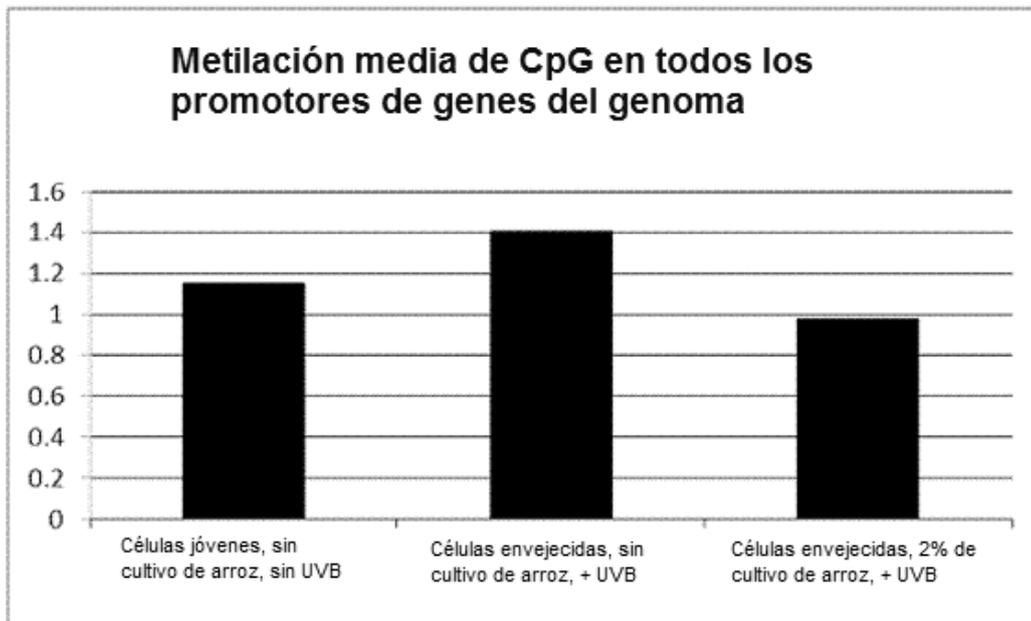


Figura 4

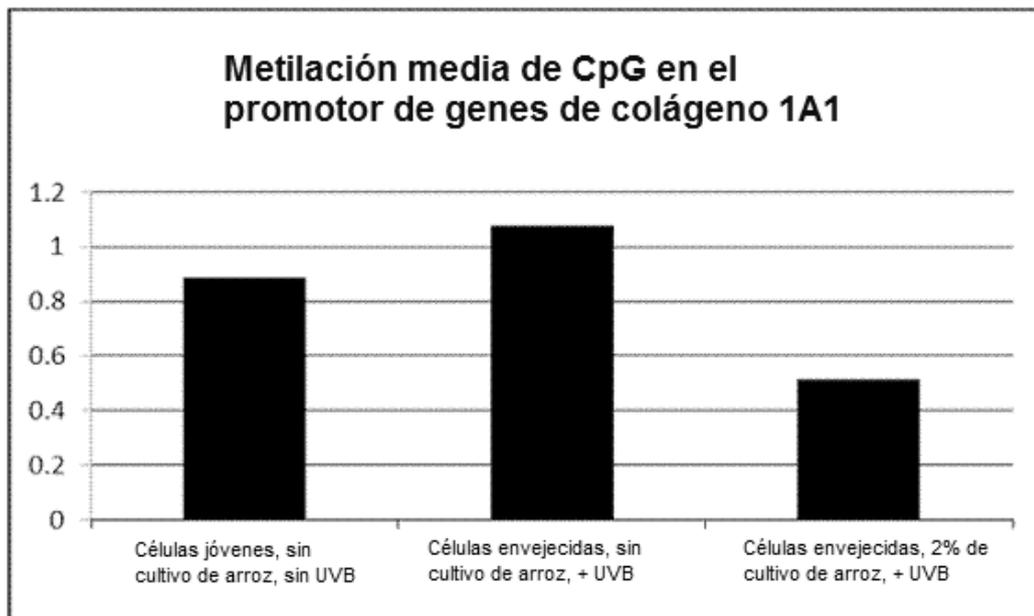


Figura 5

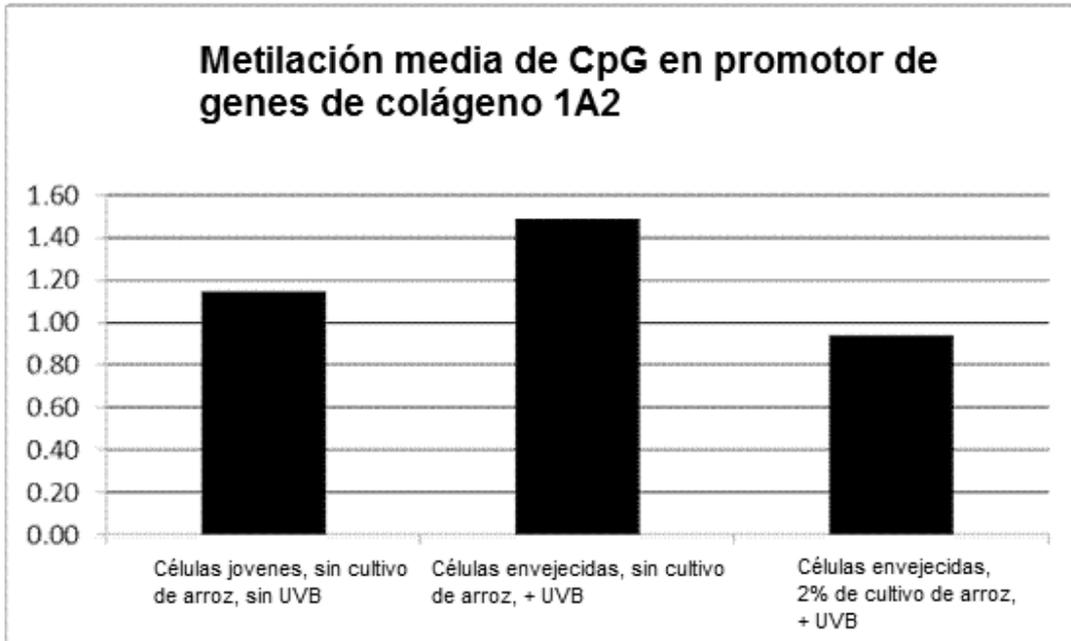


Figura 6

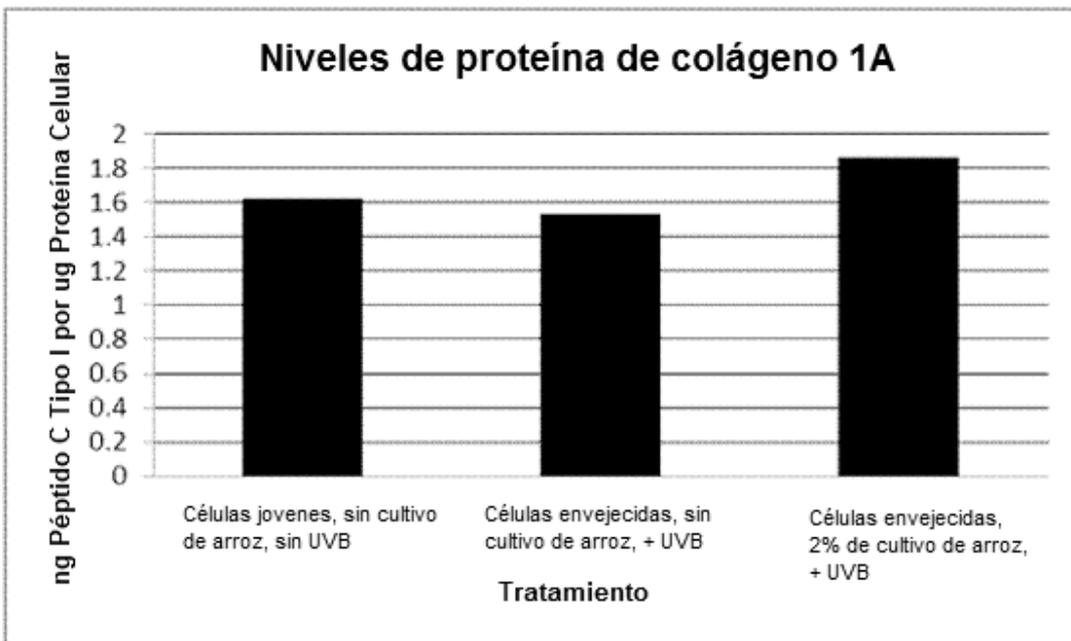


Figura 7

