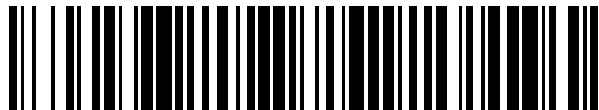


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 058**

51 Int. Cl.:

A61K 8/97 (2007.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 8/96 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2011 PCT/EP2011/054965**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2011 WO11121051**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2011 E 11711557 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2552401**

54 Título: **Utilización de una preparación procedente de un cultivo in vitro de células desdiferenciadas no elicitadas de argán en el tratamiento del envejecimiento cutáneo**

30 Prioridad:

31.03.2010 FR 1001327

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

28.12.2017

73 Titular/es:

**PIERRE FABRE DERMO-COSMÉTIQUE (100.0%)
45, place Abel-Gance
92100 Boulogne-Billancourt, FR**

72 Inventor/es:

**STEWART, NICOLAS;
MANDEAU, ANNE y
CASTEX-RIZZI, NATHALIE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 648 058 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

Utilización de una preparación procedente de un cultivo *in vitro* de células desdiferenciadas no elicitadas de argán en el tratamiento del envejecimiento cutáneo.

5

La presente invención tiene por objeto una preparación procedente de un cultivo *in vitro* de células desdiferenciadas no elicitadas de argán, una composición cosmética o dermatológica que comprende dicha preparación, y sus utilidades para el tratamiento del envejecimiento cutáneo, de la inflamación de la cicatrización, la utilización de una preparación procedente de un cultivo *in vitro* de células desdiferenciadas no elicitadas de argán o de una composición cosmética o dermatológica que la comprende, en el tratamiento terapéutico del envejecimiento cutáneo.

10

El argán es un árbol que pertenece a la familia botánica de las Sapotáceas, y su denominación científica es *Argania spinosa* (L.) Scelles.

15

Su aspecto es similar al del olivo, y su tronco es corto, retorcido. La madera es muy dura y densa. Las ramas son muy espinosas, y tienen pequeñas hojas, lanceoladas, alternadas, estrechas, cortas (aproximadamente 2 cm) y a menudo están agrupadas en masas. Las hojas son perennes pero, en tiempos de gran sequía, se vuelven caducas y caen. Las flores son hermafroditas y pentámeras. Se agrupan en glomérulos, y se abren en mayo/junio. Son de color amarillo verdoso.

20

El argán fructifica desde los 5 años de edad. El fruto es una baya sésil, amarilla, oval, de 4 a 5 cm de longitud. Está constituido por una pulpa que rodea una falsa nuez constituida por 2 a 3 semillas planas pegadas entre sí y conteniendo cada una de ellas una almendra oleaginosa.

25

El argán es endémico de Marruecos, y se sitúa principalmente en el sudoeste de Marruecos, entre Essaouira y Agadir. El arganal se extiende en aproximadamente 830000 ha.

30

Las poblaciones marroquíes explotaron el argán, en primer lugar, por su madera particularmente dura como suministro de combustible. La otra gran utilización tradicional es el aceite extraído inicialmente de forma manual, pero en la actualidad, es extraído principalmente con prensa. La primera utilización de este aceite es alimenticia; en la actualidad, conoce una explotación importante en cosmética. Las pulpas y las tortas residuales procedentes de esta producción de aceite normalmente se utilizan para alimentación para animales.

35

La cosmetología ha desarrollado numerosos productos a partir del argán. El aceite procedente de las semillas ha sido objeto de varias patentes de invención: obtención del aceite mediante solvente (Patente FR 2 553 788), el aceite de argán enriquecido en insaponificables (patente FR 2 724 663).

40

Se han patentado asimismo sustancias diferentes del aceite. Es el caso de péptidos procedentes de las tortas de las semillas obtenidas tras la extracción del aceite: asociación del aceite y de péptidos de tortas para el tratamiento de los trastornos relacionados con el envejecimiento cutáneo (patente FR 2 756 183). La hoja del argán, las proteínas y las saponinas de tortas también han sido objeto de patentes de invención: extractos de hojas (patente EP 1 213 025), proteínas de tortas (patente EP 1 213 024), saponinas de tortas (patente EP 1 430 900). Más recientemente, se presentó la solicitud de patente EP 1 968 536, que se refiere a la utilización en cosmética anti-envejecimiento de un extracto realizado a partir de pulpas del fruto de argán.

45

El argán en su conjunto presenta por lo tanto una composición de interés para un uso dermatológico y/o cosmético. El argán es una planta importante de recursos desde el punto de vista ecológico en primer lugar ya que es una planta "ecosistema". Adaptada perfectamente a la sequía, protege los suelos contra erosiones hídricas y eólicas y se opone así al avance del desierto en Marruecos. Pero también desde un punto de vista económico, ya que es un árbol con múltiples usos.

50

Es la planta insignia de Marruecos. Por eso, un *dahir* (decreto) fechado en 1925 protege el arganal, poniendo el principio del derecho superior del Estado sobre el bosque de arganales, pero el usufructo (frutos, madera muerta, cultivos bajo los arganales) se deja a la población local. La UNESCO ha clasificado recientemente el bosque de arganes como una reserva de la biosfera.

55

Esta es la razón por la cual la utilización de la madera o de sus hojas para un uso cosmético podría tener graves consecuencias sobre esta planta protegida.

60

Otro medio para obtener unas moléculas de interés a partir de una planta es la preparación de cultivos de células desdiferenciadas, totipotentes. La utilización de células vegetales desdiferenciadas permite evitar además algunos problemas de industrialización hallados cuando tiene lugar el desarrollo de productos cosméticos. Efectivamente, con el cultivo celular, la diferencia de concentración en sustancias de interés que existe entre los diferentes lotes o cosechas de la planta desaparece. Además, es una técnica no destructiva y su implantación es relativamente fácil y económica. Finalmente, elimina la necesidad de extracción, ya que las células se presentan

65

en un medio de cultivo, y los compuestos activos se presentan o bien en el medio de cultivo, o bien en el líquido intracelular. Por lo tanto, estos compuestos se pueden obtener con una simple molienda.

5 El documento EP 1 213 025 describe la utilización de un extracto de hojas de argán en el tratamiento de los signos de envejecimiento cutáneo.

10 La solicitud de patente WO 03077881 describe una composición para aplicación tópica que contiene por lo menos un triturado de células vegetales desdiferenciadas y elicitadas en cultivo *in vitro*, para sintetizar por lo menos una fitoalexina. El material vegetal procede preferentemente de la vid.

15 Por lo tanto, este documento enseña la valorización cosmética de las células vegetales susceptibles de ser desdiferenciadas y elicitadas, conduciendo la elicitación a la acumulación de metabolitos secundarios para permitir la actividad biológica en el uso tópico.

20 Ahora bien, de manera sorprendente e inesperada, el solicitante ha demostrado que una preparación procedente de un cultivo *in vitro* de células desdiferenciadas pero no elicitadas de argán, tiene buena actividad cosmética y/o dermatológica en el campos del antienvjecimiento.

25 Los resultados obtenidos demuestran que, en el caso específico del argán, es posible otra valorización de cultivos celulares de argán, en este caso no elicitadas, en el contexto mencionado con anterioridad.

30 Además, la obtención de la preparación en el sentido de la presente invención permite librarse de la etapa de elicitación, etapa difícil y costosa desde un punto de vista industrial; provocando la elicitación un rendimiento de biomasa mucho menor, debido a una ralentización del crecimiento celular.

35 La solicitud WO 03077881 menciona diversas maneras de efectuar esta elicitación, por ejemplo, con radiación UV durante 3 días; gas carbónico durante 24 horas a 2 días; radiación UV y gas carbónico durante 5 días.

40 El procedimiento realizado en el marco de la presente invención consiste en la desdiferenciación celular a partir de material vegetal procedente de argán, y después en el cultivo de las células en suspensión; permite obtener con rapidez una biomasa fina, abundante, homogénea y estéril de esta planta. El cultivo celular hace manipulables las vías de biosíntesis de esta planta directamente a escala celular.

45 Por lo tanto, la presente invención prevé la utilización de una preparación procedente de un cultivo *in vitro* de células desdiferenciadas no elicitadas de argán, y de una composición cosmética o dermatológica que comprende dicha preparación para el tratamiento no terapéutico del envejecimiento cutáneo.

50 Más en general, los cultivos *in vitro* de tejidos vegetales en suspensión permiten producir unos compuestos orgánicos activos procedentes directamente del metabolismo primario o secundario de las células.

55 Las células vegetales en suspensión se encuentran en un estado de desdiferenciación similar al de las células madre para los cultivos de células animales. Por lo tanto, estas células vegetales son teóricamente capaces de producir todos los metabolitos observados en la planta entera. La desdiferenciación provoca una perturbación de las vías de biosíntesis de orden genético o epigenético, de tal manera que los perfiles químicos son cuantitativa y cualitativamente diferentes entre la planta entera y las cepas celulares resultantes. En consecuencia, en teoría, unos intermedios de reacción no observados en la planta entera pueden aparecer en la suspensión celular. Esto proporciona una nueva riqueza y permite acceder a la biodiversidad química "latente".

60 En el estado actual de la técnica, en general, las elicitaciones (químicas, físicas, biológicas) del cultivo celular permiten estimular y producir más metabolitos secundarios. En el presente procedimiento de la invención, se demostrará que, contrariamente a la mayoría de los casos, y de modo sorprendente, la elicitación no es necesaria, sino detrimental para el crecimiento de la biomasa y para las actividades biológicas buscadas.

65 Por "células vegetales desdiferenciadas" se entiende cualquier célula vegetal que no presenta ningún carácter de una especialización particular, es decir en un estado fisiológico parecido a los tejidos meristemáticos de la planta en el estado natural. Estas células son capaces de vivir por sí mismas, y no en dependencia con otras células.

Las células desdiferenciadas de *Argania spinosa* se obtienen a partir de material vegetal vivo recogido del árbol o de un brote joven, ya sea la hoja, los peciolos, el tallo, la corteza, la raíz, el fruto, la semilla, la flor y sus órganos, o el brote, y más en particular, a partir de la hoja.

El procedimiento de obtención del cultivo de células desdiferenciadas se obtiene *in vitro* mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, por ejemplo, se hará referencia a Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-496. *Plant Culture Media, Vol-1 Formulations and Uses*, E. F. George, D. J. M. Puttock, y H. J. George (1987) Exegetics Ltd. Edington, Westbury, Wilts, BA134QG England.

La preparación de acuerdo con la presente invención se puede obtener realizando las etapas sucesivas siguientes:

- 5 a) esterilización del material vegetal;
- b) puesta en desdiferenciación de las células;
- c) puesta en suspensión celular con un medio de cultivo sin elicitador;
- d) cultivo de propagación y producción de biomasa con un medio de cultivo sin elicitador;

10 y obtención de la preparación.

La preparación puede efectuarse en un Erlenmeyer, si se trata de producir pequeñas cantidades de biomasa, o en un biorreactor, para cantidades mayores. Por ejemplo, en un matraz de Erlenmeyer con 500 ml de suspensión celular, se recogen 100 g de biomasa escurrida como media (o sea, 200 g de biomasa/l de suspensión celular),
15 mientras que en un biorreactor de 10 l se recogen 3000 g de biomasa escurrida como media (300 g/l de biomasa).

Existen tres modos principales para el cultivo de células vegetales en un biorreactor:

- 20 1. el cultivo discontinuo o en lotes;
2. el cultivo recarga/recolección o cultivo fed-batch; y
3. el cultivo continuo.

a. Etapa de esterilización del material vegetal

25 Se extraen unos explantes de *Argania spinosa*, y más particularmente, unos explantes de hojas, y se descontaminan con soluciones de hipoclorito de sodio o de calcio o con soluciones de cloruro de mercurio a temperatura ambiente durante varios minutos. Los tejidos se enjuagan con agua destilada estéril y después se lavan por lo menos una vez con agua destilada estéril al final de la descontaminación.

30

b. Etapa de desdiferenciación de las células

Las explantes descontaminados se colocan bajo campana de flujo laminar en contacto con un medio gelosado nutritivo de Murashige & Skoog, complementado con sacarosa y con factores (u hormonas) de crecimiento. Estos
35 últimos condicionarán la maquinaria celular de los explantes, de manera que provoquen unas divisiones celulares y conduzcan a unas masas celulares o callos desdiferenciados (calogénesis). Los callos obtenidos se transferirán a un medio nutritivo de desdiferenciación nuevo cada 3 a 4 semanas. Algunos constituyentes de este medio gelosados pueden ser metabolizados por los callos, o bien degradados por la acción del aire.

40 En general, con el fin de obtener una desdiferenciación rápida y completa de los tejidos en forma de callos frágiles (calogénesis) para favorecer un paso a un medio líquido, se ensayó con éxito una composición hormonal a base de auxina (ácido 2-4-diclorofenoxiacético) y de citoquinina (quinetina). Los explantes foliares estériles pueden depositarse sobre la cara adaxial en contacto con el medio gelosado, compuesto por un medio de Murashige y Skoog (Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with
45 tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-496), con 30 g/l de sacarosa, 8 g/l de agar, complementado con 0,5 mg/l de quinetina y 0,75 mg/l de ácido 2-4-dicloro-fenoxiacético (24D) y ajustado a pH 6 antes de los 20 minutos en la autoclave a 121°C (1 bar). Las placas de Petri que contienen las explantes se dejan incubar en la oscuridad a 28°C. Los primeros callos aparecen al cabo de 2 semanas. Los callos obtenidos se transfieren a un nuevo medio cada 3-4 semanas, dividiendo los callos con escalpelo para mantener un tamaño de 2 a 3 cm.
50 Estas transferencias se suceden durante 2 a 6 meses hasta obtener unos callos frágiles.

c. Etapa de puesta en suspensión celular en un medio de cultivo sin elicitador

La desdiferenciación celular dependiendo de las transferencias sucesivas de los callos a un medio gelosado conduce a la formación de callos frágiles. Este descenso de la cohesión entre las células es una consecuencia
55 de la desdiferenciación que puede aparecer entre los dos y seis meses, según la planta. Este estado es propicio para el paso a un medio líquido, ya que garantiza una desintegración de los callos en suspensión celular, minimizando al mismo tiempo los estreses mecánicos inducidos. En consecuencia, se introduce una colección de callos frágiles (10-20% del volumen) en el medio nutritivo líquido preparado según la misma formulación que el medio gelosado de diferenciación, pero sin agente gelificante.
60

Los callos frágiles, por lo tanto, se desintegran en un medio líquido por la acción de una mesa de agitación durante 2 a 3 días, y la suspensión celular obtenida se libera de las partes de callo no desintegradas formando así una suspensión celular homogénea. Esta suspensión se mantiene en cultivo de manera que se obtenga una
65 población celular suficientemente densa. En este estadio, la suspensión es (repicada o) diluida en un medio nutritivo nuevo y puesta cultivo de la misma manera.

5 Se puede realizar la puesta en suspensión celular inicial depositando aproximadamente 20 a 40 g de callos frágiles en un Erlenmeyer de 500 ml que contiene 200 ml de medio. Los callos frágiles se desintegran así en medio líquido por la acción de una mesa de agitación durante 2 a 3 días a 115 rpm, en la oscuridad, a 29°C. El sobrenadante celular se recoge a continuación con pipeta, dejando de lado las masas de callos residuales no desintegrados. El sobrenadante celular forma así una suspensión celular homogénea. Esta suspensión se mantiene en cultivo de manera que se obtenga una población celular "suficientemente" densa. La suspensión celular obtenida se cultiva durante 15 días, y después se propaga por dilución a 1/5 en un nuevo medio, durante el mismo tiempo. Se han realizado unos ajustes de la composición del medio de cultivo (nutrientes, factores de crecimiento, etc.), con el fin de maximizar la productividad en biomasa. El resultado es el medio de propagación de la biomasa ARGMS (véase la tabla 1) optimizado para la suspensión celular líquida. Este medio es una versión modificada del medio de Murashige & Skoog para la callogénesis. Este medio se ajusta a pH 6 mediante la adición de KOH, seguida de 20 minutos en la autoclave a 121°C (p = 1 bar), o de una filtración este rilizante a 0,2 µm.

15 Tabla 1: Medio ARGMS que es una versión modificada del medio de Murashige & Skoog (ARGMS) que sirve para el cultivo en condiciones óptimas de las células de argán en suspensión en Erlenmeyer o en biorreactor.

Medio ARGMS - optimizado para el crecimiento celular			
NH ₄ NO ₃	2	g/l	Macroelementos
KNO ₃	2	g/l	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,33	g/l	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25	g/l	
KH ₂ PO ₄	0,3	g/l	
KI	0,83	mg/l	Microelementos
H ₃ BO ₃	6,2	mg/l	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	mg/l	
ZnSO ₄ .1H ₂ O	6,61	mg/l	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	mg/l	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	mg/l	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	mg/l	
FeSO ₄ .7H ₂ O	41,7	mg/l	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	55,95	mg/l	
Mioinositol	150	mg/l	
Ácido nicotínico	0,75	mg/l	
Piridoxina-HCl	0,75	mg/l	
Tiamina-HCl	0,75	mg/l	
Glicina	2	mg/l	
24D	0,75	mg/l	Factores (hormonas de crecimiento)
Quinetina	0,5	mg/l	
Sacarosa	35	g/l	Fuentes carbonadas
Piruvato de Na	3	g/l	

20 d. Cultivo de propagación y producción de biomasa con un medio de cultivo sin elicitador

Después de varios repicados la suspensión celular se estabiliza cuando la densidad de células obtenida durante el período es constante. Entonces son posibles unos ajustes de la composición del medio de cultivo (nutrientes, factores de crecimiento, etc.) con el fin de maximizar la productividad en biomasa. En un modo de realización particular de la invención, el medio optimizado empleado como medio de producción de biomasa es el medio descrito en la tabla 1.

La suspensión celular se filtra con el fin de separarla del medio extracelular o sobrenadante de cultivo, y la biomasa recogida es puesta nuevamente en suspensión en agua destilada y triturada a 0°C. El triturado obtenido se liofiliza o bien se centrifuga para clarificarlo antes de ser liofilizado.

El cultivo celular en condición "óptima" establecido de este modo se estabiliza y se mantiene en Erlenmeyer (cultivo de propagación) a razón de una dilución de la suspensión celular a 1/5 cada 15 días. Esto equivale a un cultivo celular inoculado con aproximadamente 60 g/l de biomasa fresca que produce una suspensión celular de aproximadamente 300 g/l al cabo de 15 días de cultivo, o inoculado en biorreactor según las necesidades.

Ya sea en Erlenmeyer o en biorreactor, la preparación obtenida puede consistir en:

- una suspensión celular (por "suspensión celular" se entiende en el sentido de la presente invención, las células o biomasa en su medio de cultivo);

- biomasa (por "biomasa" se entiende en el sentido de la presente invención una masa celular separada del medio de cultivo; o sea, la suspensión celular tras la filtración);
- biomasa triturada tras la nueva puesta (o no) en suspensión en agua destilada;
- un zumo clarificado o sobrenadante de biomasa triturada por centrifugación o por filtración;
- una sobrenadante de cultivo (por "sobrenadante de cultivo" se entiende en el sentido de la presente invención, el medio de cultivo en el que las células han permanecido en el cultivo, o medio extracelular).

Ya sea la suspensión celular, la biomasa o el sobrenadante de biomasa triturada, se pueden conservar tal cuales en forma congelada o mediante la adición de sustancias conservantes tales como el fenoxi-2-etanol, el alcohol bencílico o cualquier otro conservante que aparece en el anexo VI de la directiva de la UE relativa a los productos cosméticos titulada "Liste des agents conservateurs que peuvent contenir les produits cosmétiques ". Además, pueden ser diluidos sobre un soporte cosmetológicamente aceptable del tipo glicol (propilenglicol, butilenglicol, polietilenglicoles, etc.) en proporciones que varían de 10 a 60%. La suspensión celular o la biomasa pueden ser trituradas además y conservadas después tal cual congeladas, o mediante la adición de sustancias conservantes o de soporte como se ha descrito anteriormente.

Trituradas o no, la suspensión celular, la biomasa o el sobrenadante de biomasa también se pueden secar por liofilización o atomización, y conservar tal cual o secar sobre un soporte de tipo maltodextrina, lactosa, sílice, o cualquier otro soporte cosmetológicamente aceptable.

Finalmente, la suspensión celular puede ser enriquecida con compuestos de interés por cromatografía de afinidad: absorción sobre resina (copolímeros de poliestireno de tipo Amberlite® XAD®-21a, etc.) y la elución con un solvente apropiado tal como el etanol.

La biomasa fresca, obtenida con el procedimiento según la presente invención representa aproximadamente 100 a 500 g por litro de suspensión, y más preferentemente, entre 200 y 350 g por litro de suspensión en la fecha de recolección óptima (o sea, aproximadamente 15 días como media).

La siguiente tabla expresa los rendimientos obtenidos (rendimiento en gramos de producto obtenido/l de suspensión celular):

Producto	Biomasa fresca		Biomasa fresca triturada liofilizada		Sobrenadante de biomasa fresca triturada liofilizada	
	Producciones (preferido)	Productividades (preferido)	Producciones (preferido)	Productividades (preferido)	Producciones (preferido)	Productividades (preferido)
Erlenmeyer	150 - 300 g.l ⁻¹ en 15 días (200 g.l ⁻¹ en 15 días)	10-20 g.l ⁻¹ .d ⁻¹ (13 g.l ⁻¹ .d ⁻¹)	7,1 - 15 g.l ⁻¹ en 15 días (9,5 g.l ⁻¹ en 15 días)	0,4-1 g.l ⁻¹ .d ⁻¹ (0,6 g.l ⁻¹ .d ⁻¹)	4,5 - 9 g.l ⁻¹ en 15 días (6 g.l ⁻¹ en 15 días)	0,3-0,6 g.l ⁻¹ .d ⁻¹ (0,4 g.l ⁻¹ .d ⁻¹)
Biorreactor 10 l- Batch	200 - 500 g.l ⁻¹ en 15 días (300 g.l ⁻¹ en 15 días)	13-34 g.l ⁻¹ .d ⁻¹ (20 g.l ⁻¹ .d ⁻¹)	9,5 - 24 g.l ⁻¹ en 15 días (14,3 g.l ⁻¹ en 15 días)	0,65-1, 14 g.l ⁻¹ .d ⁻¹ (0,95 g.l ⁻¹ .d ⁻¹)	6 - 15 g.l ⁻¹ en 15 días (9 g.l ⁻¹ en 15 días)	0,4-1 g.l ⁻¹ .d ⁻¹ (0,6 g.l ⁻¹ .d ⁻¹)
Biorreactor 10 l-Fed Batch de 80%	200 - 500 g.l ⁻¹ (300 g.l ⁻¹ en cada recogida de 6 días)	32-80 g.l ⁻¹ .d ⁻¹ (48 g.l ⁻¹ .d ⁻¹)	9,5 - 24 g.l ⁻¹ (14,3 g.l ⁻¹ en cada recogida de 6 días)	1,5-3,85 g.l ⁻¹ .d ⁻¹ (2,28 g.l ⁻¹ .d ⁻¹)	6 - 15 g.l ⁻¹ (9 g.l ⁻¹ en cada recogida de 6 días)	0,96-2,4 g.l ⁻¹ .d ⁻¹ (1,44 g.l ⁻¹ .d ⁻¹)
Biorreactor 10 l- cultivo continuo $\mu=0,2$ d ⁻¹	100 - 500 g.l ⁻¹ (140 g.l ⁻¹ en continuo)	20-100 g.l ⁻¹ .d ⁻¹ (28 g.l ⁻¹ .d ⁻¹)	4,8 - 24 g.l ⁻¹ (6,6 g.l ⁻¹ en continuo)	1-5 g.l ⁻¹ .d ⁻¹ (1,33 g.l ⁻¹ .d ⁻¹)	3 - 15 g.l ⁻¹ (4,2 g.l ⁻¹ en continuo)	0,6-3 g.l ⁻¹ .d ⁻¹ (0,84 g.l ⁻¹ .d ⁻¹)

La presente invención se refiere asimismo a una composición cosmética o dermatológica que comprende a título de principio activo una preparación procedente de un cultivo de células desdiferenciadas no elicitadas de argán tal como la descrita anteriormente.

5 Preferentemente, la cantidad de dicha preparación está comprendida entre 0,1 y 10% con respecto al peso total de la composición. Y más preferentemente, dicha cantidad de extracto está comprendida entre 0,2% y 5%.

10 La composición cosmética según la presente invención se puede presentar ventajosamente en cualquier forma galénica empleada normalmente en el campo cosmético para una aplicación tópica u oral, y preferentemente tópica. Para una administración por vía tópica, la forma galénica puede ser una crema, un gel, una pomada, una pulverización. La fórmula oral se selecciona de entre el grupo que comprende comprimidos, cápsulas blandas y polvos para suspensiones bebibles.

15 La composición cosmética de acuerdo con la invención comprende además unos excipientes habituales cosméticamente compatibles.

20 Los excipientes habituales compatibles con la composición cosmética pueden ser cualquier excipiente de entre los conocidos por el experto en la materia, para obtener una composición cosmética para una aplicación tópica en formas tales como las descritas anteriormente.

25 La composición cosmética o dermatológica de acuerdo con la invención, en particular, puede contener aditivos y auxiliares de formulación tales como los tensioactivos de tipo emulsionante, de limpieza, espumante, etc., agentes complejantes, espesantes, gelificantes, estabilizantes, conservantes que incluyen antimicrobianos y antioxidantes, acondicionadores, acidificantes, alcalinizantes, emolientes, solventes, colorantes, perfumes.

30 Los inventores han demostrado que unas preparaciones procedentes de cultivo de células desdiferenciadas no elicitadas de argán tienen las siguientes actividades:

- 35 - una actividad antioxidante, antirradicalaria, para limitar el proceso de oxidación relacionado con el envejecimiento intrínseco y extrínseco y el proceso inflamatorio.
- 40 - una actividad sobre la matriz extracelular para mejorar las propiedades mecánicas de la piel madura (firmeza, elasticidad, tonicidad) a través de la inhibición de metaloproteasas que degradan el colágeno.

35 Los siguientes ejemplos se proporcionan a título indicativo no limitativo.

Ejemplos de obtención de la preparación según la presente invención

Ejemplo 1. Biomasa fresca/procedimiento efectuado en Erlenmeyer

40 Se esterilizan unas hojas de argán de 3 a 4 meses de edad preferentemente, mediante los baños sucesivos siguientes: alcohol al 70% durante 1 minuto; hipoclorito de sodio al 2%, durante 3 minutos; y después se enjuagan con dos baños sucesivos de agua desmineralizada de 8 minutos y 10 minutos.

45 Las explantes foliares esterilizados se depositan sobre la cara adaxial en contacto con el medio gelosado compuesto por un medio de Murashige y Skoog (Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-496), con 30 g/l de sacarosa, 8 g/l de agar, complementado con 0,5 mg/l de quinetina y 0,75 mg/l de ácido 2-4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D), y ajustado a pH 6 antes de los 20 minutos de autoclave a 121°C (1 bar). Las placas de Petri que contienen los explantes se dejan incubar en la oscuridad a 28°C y se propagan hasta obtener callos frágiles y estabilizados.

50 La puesta en suspensión celular inicial se realiza depositando aproximadamente 40 g de callos frágiles en Erlenmeyer de 500 ml que contiene 200 ml de medio sometido a autoclave, cuya composición se describe en la tabla 1 mencionada anteriormente.

55 El cultivo se realiza durante una semana sobre una mesa de agitación a 115 rpm., en la oscuridad, a 29°C. El sobrenadante celular se recoge a continuación con pipeta dejando las masas de callos residuales. La suspensión celular obtenida se cultiva durante 15 días, y luego se propaga por dilución a 1/5 en nuevo medio durante la misma duración.

60 La suspensión se filtra entonces bajo vacío, y se recupera la biomasa. El rendimiento de biomasa fresca obtenido es de 168 g/l.

65 La biomasa se conserva a -20°C.

Ejemplo 2. Biomasa seca

Ejemplo 2a. Biomasa seca/procedimiento efectuado en biorreactor en cultivo de lotes

- 5 Cuatro Erlenmeyer de suspensión celular de 500 ml obtenidos tal como se describe en el ejemplo 1 se colocan juntos en un dispositivo inoculador, y forman un inóculo de 2 l que se vierte estérilmente en un biorreactor de 10 l. Este biorreactor se llena con 8 l de medio óptimo (véase la tabla 1), complementado con 30 mg/l de antiespumante previamente esterilizado y después se enfría y se mantiene a 29,5°C mediante una circulación de agua termostataada en circuito cerrado en la envuelta del biorreactor.
- 10 Se calibra una sonda de oxígeno por saturación, e informa en tiempo real a un dispositivo informatizado de regulación de la pO₂. Éste permite mantener la pO₂ al 80% por inyección de oxígeno puro estéril en el dispositivo de aireación. Este biorreactor está equipado asimismo con un dispositivo de medición en línea del CO₂ a nivel de los gases efluentes (head space) que informa en tiempo real a un dispositivo informatizado de regulación de la pCO₂ de manera que la pCO₂ se mantenga al 6%. Esto se realiza por inyección de aire atmosférico estéril en el dispositivo de aireación mezclado con el oxígeno. El biorreactor está equipado asimismo con un sistema de agitación de pala marina que gira a 75 rpm de manera suficiente para agitar la suspensión celular y evitar que sedimente. Aguas abajo del biorreactor está instalado un dispositivo automático que permite un muestreo estéril de la biomasa y un seguimiento de la misma.
- 15
- 20 El cultivo en lotes se mantiene en estas condiciones de temperatura y gases disueltos constantes durante 15 a 17 días de manera que se alcance una densidad celular de 280 a 320 g/l de biomasa fresca. Al final de este cultivo en lotes, el biorreactor se vacía y la biomasa se recoge por filtración en un filtro con la ayuda de un embudo Büchner.
- 25 La biomasa fresca recogida recuperada en el mismo volumen de agua destilada se tritura en frío con la ayuda de un sonicador y después se liofiliza.

Ejemplo 2b. Biomasa seca/procedimiento efectuado en biorreactor en cultivo Fed-batch

- 30 Se usan cuatro Erlenmeyer de suspensión celular de 500 ml como inóculo tal como el descrito en el ejemplo 2a. Se prepara el biorreactor como se ha indicado en el ejemplo 2a. Los dispositivos de regulación de los gases disueltos, de la temperatura y de la agitación se preparan según se indica en el ejemplo 2a.
- 35 El cultivo inicial se mantiene en estas condiciones de temperatura y de gases disueltos constantes durante 15 a 17 días de manera que se alcance una densidad celular de 280 a 320 g/l de biomasa fresca. Al final de este cultivo inicial, se vacía el biorreactor de 10 l al 80%. Se recogen entonces 8 l de suspensión celular. La biomasa de esta suspensión se recoge por filtración sobre un filtro con la ayuda de un embudo Büchner. Se recogen 2240 g a 2560 g de biomasa fresca. La biomasa fresca recogida en el mismo volumen de agua destilada se tritura en frío con la ayuda de un sonicador y después se liofiliza. Se obtienen 100 a 130 g de biomasa liofilizada.
- 40 Simultáneamente a la recolección parcial del 80%, se vierten 8 l de medio ARGMS previamente sometido a autoclave y enfriado en el biorreactor que contiene entonces 2 l de suspensión celular de manera que se restablezca el volumen de cultivo de 10 l. El cultivo Fed-batch se mantiene en estas condiciones de temperatura y de gas disuelto constantes durante 5 a 7 días de manera que se alcance una densidad celular de 280 a 320 g/l de biomasa fresca. Este cultivo es más corto (mayor productividad) que el cultivo inicial ya que la biomasa se encuentra en un estado fisiológico de división celular sostenida, de tal modo que el vertido de medio nutritivo nuevo se caracteriza por una fase de latencia de menos de 24 horas y una expansión inmediata de la biomasa. Al final de este cultivo de Fed-batch, el biorreactor de 10 l se vacía al 80%. Se recogen entonces 8 l de suspensión celular. La biomasa de esta suspensión se recoge por filtración en un filtro con la ayuda de un embudo Büchner. El cultivo se reinicia a continuación como anteriormente.
- 45
- 50

Ejemplo 2c. Biomasa seca/procedimiento llevado a cabo en biorreactor en cultivo continuo

- 55 Se usan cuatro Erlenmeyer de suspensión celular de 500 ml como inóculo tal como se describe en el ejemplo 2a. El biorreactor se prepara según lo indicado en el ejemplo 2a. Los dispositivos de regulación de los gases disueltos, de la temperatura y de la agitación se preparan según lo indicado en el ejemplo 2a.
- 60 El cultivo inicial se mantiene en estas condiciones de temperatura y de gas disuelto constantes durante 10 días de manera que se alcance una densidad celular de 150 g/l y una tasa de crecimiento instantáneo de biomasa fresca de 0,2 d⁻¹. En este estadio, el biorreactor de 10 l se vacía al 1,2% cada 1 hora 20 min. Este muestreo se compensa automáticamente por el vertido del mismo volumen de medio ARGMS nuevo en el biorreactor. Este método permite mantener las células en un estado fisiológico y una densidad celular constante.
- 65 Se recogen entonces 100 a 120 ml de suspensión celular. La biomasa de esta suspensión se recoge por filtración en un filtro, usando un embudo Büchner. Se recogen 15 g a 18 g de biomasa fresca en cada muestreo. La biomasa fresca recogida recuperada en el mismo volumen de agua destilada se tritura en frío usando un

sonicador, y después se liofiliza. Se obtienen 0,71 a 0,85 g de biomasa liofilizada en cada muestreo. El cultivo se mantiene así durante por lo menos 60 días. Es teóricamente posible mantenerlo sin límite de tiempo.

5 La ventaja del cultivo continuo con respecto a los modos anteriores es la ausencia de una nueva preparación del biorreactor, que consiste en una limpieza y una esterilización de éste así como la ausencia de fase de latencia celular. Efectivamente, el muestreo de 1 a 1,5% de la suspensión celular seguido automáticamente por la compensación con medio nuevo en el biorreactor causa mínimas variaciones en la composición del medio de cultivo en curso en el biorreactor. Por eso, la población celular no procede a los reajustes metabólicos de la fase de latencia responsable de una pérdida de productividad de volumen en biomasa observada en otros modos de cultivo.

10 **Ejemplo 3. Sobrenadante de biomasa fresca, siendo dicha biomasa obtenida según el ejemplo 2a**

15 Se centrifugan 20 g de biomasa fresca y triturada obtenida según el ejemplo 2a a 10000 g durante 15 minutos, y se recoge el sobrenadante. A continuación se liofiliza.

El rendimiento medio es de 30 mg de sobrenadante liofilizado por g de biomasa fresca.

20 **Ejemplos de composiciones cosméticas**

Ejemplo 4: Fórmula O/W

Componentes	%
Biomasa fresca (ejemplo 1)	5
Glicerina	10,0
Na ₂ EDTA	0,1
Goma de xantano	0,3
Benzoato de alquilo C12-C15	10,0
Palmitato de octilo	5,0
Conservantes	cs
Alcohol esteárico	2,5
Monoestearato de glicerol	2,5
Cetil fosfato de potasio	1,8
Agua desmineralizada	CSP 100

25 **Ejemplo 5. Fórmula W/O**

Componente	%
Sobrenadante (ejemplo 3)	0,5
Glicerina	4,0
Na ₂ EDTA	0,1
MgSO ₄	1,0
Goma de xantano	0,1
Benzoato de alquilo C12-C15	12,5
Isohexadecano	3,5
Ciclometicona	3,0
Conservantes	cs
Ésteres de poliglicerol y de sorbitán	4,0
Miret-3 miristato	2,0
Agua desmineralizada	CSP 100

Ejemplo 6. Evaluación de la actividad antioxidante

Quimioluminiscencia

30 Es un método que genera unos radicales libres (radical superóxido O₂^{•-}) por una señal fotoquímica. La intensidad de la oxidación es 1000 veces superior a la obtenida en condiciones normales. La detección se realiza por quimioluminiscencia y permite la evaluación de extractos o moléculas lipo o hidrosolubles. Los resultados se expresan respectivamente como cantidad equivalente de vitamina C o de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). La sensibilidad es del orden del nanomol.

35 El análisis de los resultados depende de 2 criterios: forma de la curva (integración) y valor numérico en nanomoles proporcionado por el programa informático (Igor Popov y Gudrun Lewin. *Methods in enzymology* [44] vol 300. 437-456; Maibach I Howard *et al.* *Journal of Cosmetic Dermatology*, Vol 7 (2) 96-100 (2008)).

Los resultados se expresan en µg de muestra necesaria para obtener una actividad equivalente a la actividad detectada para 1 µg de estándar (= Trolox). (Kit ACL).

5 Resultados

La actividad antioxidante estudiada en este ensayo representa la capacidad para capturar específicamente los aniones superóxidos por quimioluminiscencia.

10 Tabla 2. Evaluación y cuantificación del poder antioxidante en equivalente Trolox.

Muestra ensayada	ACL
	µg de muestra para 1 µg de Trolox
Trolox (referencia)	1
Sobrenadante (ejemplo 3)	171
Coenzima 10 = Molécula antioxidante de referencia	272
Biomasa (ejemplo 2a)	278

15 La biomasa liofilizada preparada según el ejemplo 2a y el sobrenadante de biomasa triturada liofilizada preparada según el ejemplo 3 tienen una actividad con respecto a la captura antirradicalaria globalmente equivalente.

Son necesarios 278 µg de biomasa liofilizada para obtener una actividad equivalente a la actividad detectada para 1 µg de Trolox: actividad equivalente a la coenzima Q10, molécula antioxidante de referencia.

20 Son necesarios 171 µg de sobrenadante de biomasa triturada liofilizada para obtener una actividad equivalente a la actividad detectada para 1 µg de Trolox.

25 Los radicales libres, cuya producción se incrementa como consecuencia de las agresiones exteriores (frío, contaminación, tabaco, rayos UV), son responsables de las alteraciones del ADN de las células cutáneas, pero también de las membranas celulares y mitocondriales. Estos radicales libres desempeñan una función muy importante asimismo en el proceso de inflamación. Estos metabolitos tan reactivos son unos segundos mensajeros de la señalización celular del estrés oxidativo y, por lo tanto, mediadores precoces de la inflamación (A. Van Der Vliet *et al.*, Chem. Biol. Interaction, 85: 95-116, 1992).

30 La actividad antirradicalaria de las preparaciones descritas en los ejemplos 2a y 3 permiten luchar contra el envejecimiento cutáneo intrínseco y extrínseco y contra la inflamación.

Ejemplo 7. Evaluación de la inhibición de la actividad metaloproteásica sobre el colágeno que constituye la matriz extracelular

35 La matriz extracelular (MEC) es una estructura dinámica que tiene una función estructural y reguladora para los tejidos. Proporciona a la piel su turgencia y sus propiedades mecánicas. A nivel de la epidermis, ocupa el espacio intercelular y desempeña una función de mantenimiento para la estructura epidérmica. Además, asegura los intercambios entre las células de la epidermis y desempeña una función en la actividad celular. Está constituida por fibras, en particular por colágeno y por sustancias fundamentales (agua, sales, glicoproteínas, glicosaminoglicanos). Los colágenos son unas proteínas fibrosas, formadas por tres cadenas de polipéptidos, idénticas o diferentes, unidas por unos enlaces covalentes e hidrógenos. Los colágenos constituyen el componente esencial de la red fibrosa, y desempeñan una función mecánica que confiere resistencia y elasticidad a la piel.

45 Cuando una célula es senescente, los componentes de la MEC son mayoritariamente degradados por unas enzimas del tipo endopeptidasas de zinc denominadas metaloproteinasas matriciales o MMP (Hideaki Nagase § y J. Frederick Woessner., J. Biol. Chem., Vol. 274, Fascículo 31, 21491-21494, 30 de julio de 1999). Son membranas o secretadas. Todas las MMP tienen una fuerte homología de secuencia y de estructura, pero se distinguen por la especificidad del sustrato. La MMP1 o "colagenasa intersticial" degrada mayoritariamente el colágeno de tipo I (presente al 80% en la dermis de una piel normal), y además, degrada los colágenos II, VII, VIII y X.

55 En un modelo de enzima recombinante humana con la ayuda de un sustrato peptídico específico, Mca - Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-DPA-Ala-Arg-NH₂, se ha analizado el efecto de los extractos sobre la actividad enzimática directa mediante una dosificación fluorimétrica (David Leppert *et al.*, Analytical Biochemistry, 328 (2004) 166-17).

La enzima activada es preincubada con las diferentes preparaciones, y después es puesta en presencia del sustrato. La enzima escinde el péptido separando el fluoróforo Mca (7-metoxicumarina-4-il)acetilo del templador

Dpa (N-3-(2,4-Dinitrofenil)-L-2,3 diaminopropionilo). El péptido emite entonces una fluorescencia de una longitud de onda de 405 nm, cuando es excitado a 320 nm. De esta manera, se mide la actividad enzimática de la MMP-1 y es proporcional a la fluorescencia emitida.

5 Con este ensayo *in vitro*, se pueden detectar potenciales inhibidores de actividad MMP1, enzima que desempeña una función crucial en la iniciación de la degradación de los colágenos. Se miden los porcentajes de inhibición de actividad MMP1.

Cálculo del porcentaje de inhibición enzimática relacionada con el inhibidor o con el producto:

10

$$\% \text{ inhibición} = 100 \times \frac{(\text{Actividad enzimática neta máxima} - \text{Actividad enzimática neta en presencia de inhibidor})}{\text{Actividad enzimática neta máxima}}$$

Resultados

15 El sobrenadante preparado según el ejemplo 3 inhibe la actividad MMP1 de manera significativa y dependiente de la dosis de 60 a 500 µg/ml.

Tabla 3: Sobrenadante de biomasa triturada liofilizada (preparada según el ejemplo 3), resultados de la inhibición de la MMP1 en porcentaje (%).

Media % de inhibición	Concentración en µg/ml
100	500
58	300
41	150
20	60

20

La biomasa liofilizada preparada según el ejemplo 2a se evaluó de 60 a 1000 µg/ml. Debido a interferencias fisicoquímicas de la biomasa en su conjunto, no se pudo medir la actividad inhibidora. Sin embargo, un extracto muy similar que se evaluó mostró inhibiciones significativas de 60 µg/ml a 1000 µg/ml.

25 El extracto preparado según el ejemplo 3 permite luchar contra la actividad incrementada de las MMP cuando se produce la senescencia y contribuir a la conservación de la función mecánica del colágeno, que confiere resistencia y elasticidad a nivel de la piel.

Ejemplo 8. Medición de la síntesis de TGF-β1 en los queratinocitos HaCaT

30

El TGF-β1 (Transforming Growth Factor-beta 1) pertenece a la superfamilia de los TGF-β que son secretados por diferentes tipos celulares y que desempeñan una importante función en el control del crecimiento celular y la regulación de múltiples respuestas celulares y procesos biológicos. Las citoquinas de esta superfamilia poseen las actividades principales siguientes: modulan la proliferación de la mayoría de las células, estimulan la proliferación de los fibroblastos y aumentan la formación de la matriz extracelular (Lawrence, 1996). Por otro lado, el TGF-β1 está implicado en la reparación de las heridas, en los procesos de cicatrización (Cullen *et al.*, 1997), en particular, induciendo una reorganización del citoesqueleto celular (actina) y promoviendo la migración de las células epiteliales (Boland *et al.*, 1996). La población celular más representada a nivel del tejido cutáneo es la población queratinocitaria. Constituye una fuente importante de factores de crecimiento susceptibles de regular e influenciar el comportamiento de las células dérmicas: los fibroblastos (Ghahary *et al.*, 2001).

35

40

Materiales y métodos

Producción de biomasa no elicitada: según el ejemplo 2a. Preparación de biomasa elicitada

45

Se prepara medio de Murashige & Skoog sin factores de crecimiento (quinetina y 24D). Este medio se ajusta hasta pH 6 mediante la adición de KOH, seguida de 20 minutos de autoclave a 121°C (1 bar). Este medio se inocula a continuación a 1/5 del volumen, con la ayuda de suspensión celular procedente de un cultivo de propagación. Las condiciones de elicitación se realizan inmediatamente después mediante la adición estéril de una solución concentrada en DMSO de quinetina, de 6-bencilaminopurina (BAP o (N-(fenilmetil)-7H-purin-6-amina) y de agentes elicitadores: ácido acetilsalicílico y metil-jasmonato. El resultado es un medio EMS de elicitación (véase la tabla 4). El cultivo elicitado se mantiene entonces durante 15 días sobre una mesa de agitación a 115 rpm en la oscuridad a 29°C. Entonces se recoge la biomasa fresca, y se ocurre en un embudo Buchner antes de ser triturada centrifugada, y el sobrenadante estabilizado por liofilización.

50

55

Tabla 4. Medio EMS que es el medio de Murashige & Skoog modificado que sirve para el cultivo en condición elicitada de las células de argán en suspensión en Erlenmeyer.

Medio EMS - medio de elicitación			
NH ₄ NO ₃	1,650	g/l	Macroelementos
KNO ₃	1,900	g/l	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,44	g/l	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,37	g/l	
KH ₂ PO ₄	0,17	g/l	
KI	0,83	mg/l	Microelementos
H ₃ BO ₃	6,2	mg/l	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	mg/l	
ZnSO ₄ ·1H ₂ O	6,62	mg/l	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	mg/l	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	mg/l	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	mg/l	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	mg/l	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,8	mg/l	
Mioinositol	100	mg/l	
Ácido nicotínico	0,5	mg/l	
Piridoxina-HCl	0,5	mg/l	
Tiamina-HCl	0,5	mg/l	
Glicina	2	mg/l	
6-Bencilaminopurina (BAP)	1	mg/l	Factores (hormonas de crecimiento)
Quinetina	1	mg/l	Agentes elicitadores
Ácido acetilsalicílico	100	µM	
Metil jasmonato	100	µM	
Sacarosa	35	g/l	Fuentes carbonadas
Piruvato de Na	3	g/l	

- 5 Se tratan los queratinocitos HaCaT durante 5 h con los diferentes extractos, y después las células se incuban durante 24 h en DMEM a 37°C. Se dosifica el TGF-β1 en los sobrenadantes de cultivo con un kit ELISA.

Los efectos de la biomasa de argán no elicitada preparada según el ejemplo 2a y de biomasa de argán obtenida tras la elicitación, sobre la síntesis de TGF-β1 en los queratinocitos humanos HaCaT se muestran en la figura 1 adjunta. Muestran que, en los queratinocitos HaCaT, la biomasa de argán no elicitada preparada según el ejemplo 2a (50 µg/ml) estimula la síntesis de TGF-β1 en un 48% mientras que la biomasa de argán elicitada inhibe la síntesis de TGF-β1 en un 26%.

Ejemplo 9. Medición de la proliferación y migración celular de los queratinocitos humanos

Ejemplo 9.a. Medición de la proliferación celular de queratinocitos humanos

La cicatrización de las heridas es un proceso biológico complejo y dinámico que involucra la interacción de numerosos factores locales y sistémicos en la reparación normal de los tejidos. La progresión de la cicatrización comprende cuatro fases interdependientes: la hemostasis, la inflamación, la proliferación y la remodelación. La proliferación implica tres procesos claramente observables: la granulación, la contracción y la reepitelización.

Durante la granulación, se observa la proliferación y la migración hacia el lecho de la herida de las células que intervendrán en el resto del proceso de reparación. De esta manera, se encuentran unos macrófagos, unos fibroblastos y unas células endoteliales. Los macrófagos liberan constantemente unos factores quimiotácticos y unos factores de crecimiento. Los fibroblastos construyen la nueva matriz celular necesaria para el crecimiento de las células en el fondo de la herida. Este andamiaje favorece la migración celular.

La contracción de la herida es un mecanismo de reducción del tamaño de la herida y los fibroblastos desempeñan una función principal en esta contracción.

La reepitelización consiste en la regeneración de una epidermis que recubre una herida para reformar una barrera eficaz contra el entorno exterior, capaz de pigmentarse y de reencontrar sus funciones sensoriales e inmunitarias. Por lo tanto, implica los procesos celulares de migración y de proliferación celular de los queratinocitos, pero también la diferenciación de este neopitelio y la restauración de una membrana basal que reconecta la dermis y la epidermis. Cuando la migración de las células basales en dirección al centro de la herida permite que los dos bordes de la herida se junten, se produce una ola de mitosis celular para llenar los espacios dejados por la migración y proporcionar unas células para el tejido epitelial en regeneración tridimensional.

Las etapas de proliferación de las células queratinocitarias, de fibroblastos o de células endoteliales se pueden considerar como uno de los fenómenos funcionales que atestiguan la actividad cicatrizante de un activo. Un aumento de la proliferación de los fibroblastos o de las células endoteliales participaría en la cicatrización de la dermis, mientras que el aumento de la proliferación de los queratinocitos participaría en la reepitelización.

Materiales y métodos: proliferación celular

La técnica utilizada permite medir la incorporación de un nucleótido, la 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), análogo de la timidina, en el ADN de las células en fase S.

Los queratinocitos, aislados de desechos quirúrgicos cutáneos, son cultivados en KSFM (BPE, 25 µg/ml; EGF, 1,5 mg/ml). Las células se incuban en presencia de las moléculas a evaluar durante 48 h a 37°C, en una atmósfera al 5% de CO₂.

La incorporación del BrdU, proporcional a la tasa de proliferación celular, es evaluada por un sistema de anticuerpos anti-BrdU acoplados a peroxidasa. La adición de un sustrato de la peroxidasa desarrolla una reacción coloreada (Biotrak Elisa System). La absorbancia correspondiente (DO) se mide a 450 nm. Por lo tanto, este dato es proporcional a la tasa de proliferación celular.

El porcentaje de proliferación se determina entonces según la fórmula:

$$\% \text{ proliferación} = \frac{\text{DO (tratada)} - \text{DO (control}_{\min})}{\text{DO (control}_{\max}) - \text{DO (control}_{\min})} \times 100$$

Nota:

- Control_{min} = células incubadas con el medio mínimo
- Control_{max} = células incubada con el medio completo

Por lo tanto, Control_{min} corresponde a 0% de proliferación, y el Control_{max} al 100% de proliferación.

Los resultados sobre la proliferación celular se reúnen en la figura 2 que ilustra el efecto de biomasa de argán preparada según el ejemplo 2a sobre la proliferación de queratinocitos humanos.

Muestran que la biomasa de argán preparada según el ejemplo 2a a 0,1 µg/ml, estimula la proliferación de los queratinocitos humanos en un 25%. No se mide ningún efecto cuando la biomasa se ensaya a 0,01 µg/ml.

Ejemplo 9.b. Medición de la migración celular de los queratinocitos humanos

Materiales y métodos: migración celular de los queratinocitos HaCaT

El protocolo empleado para estudiar la migración celular se basa en la utilización de un equipo de 96 pocillos. El principio de este ensayo consiste en estudiar la migración de las células hacia el centro del pocillo (placa de 96 pocillos). Para ello, se coloca un obturador en el centro de cada pocillo, con el fin de crear una zona de detección de 2 mm de diámetro. Las células HaCaT se inoculan a continuación alrededor de este obturador. Se retiran los obturadores una vez que las células se han adherido bien a la superficie alrededor de éstos, y así las células pueden migrar hacia la zona de detección. Las placas sin los obturadores y con los activos se incuban a 37°C durante 24 horas en DMEM 0% SVF. Se analiza a continuación la cantidad de células situadas en la zona en la que estaba el obturador, con el fin de evaluar la migración de las células. Las células se marcan con Hoechst 33342, y un protector permite visualizar y contar solo las células situadas en esta zona. Para cada condición se realiza la media de 8 pocillos.

Los resultados se expresan:

- como intensidad de fluorescencia (IF - proporcional a la cantidad de células que han migrado)
- como porcentaje de actividad con respecto al control 0% SVF:

$$\frac{\text{IF tratada} - \text{IF } 0\% \text{ mig}}{\text{IF t control } 0\% \text{ SVF} - \text{IF } 0\% \text{ mig}} \times 100$$

Nota:

IF (0% mig) corresponde a la IF de los pocillos que contienen los obturadores y por lo tanto, al ruido de fondo.

Los resultados de la migración celular se reúnen en la figura 3 que ilustra el efecto de la biomasa de argán

preparada según el ejemplo 2a sobre la migración de queratinocitos HaCaT.

Los resultados muestran que la biomasa de argán preparada según el ejemplo 2a, a 0,01 o a 0,03 µg/ml, estimula la migración de los queratinocitos HaCaT en un 79% y en un 73%, respectivamente.

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización cosmética de una preparación procedente de un cultivo *in vitro* de células desdiferenciadas no elicitadas de argán, en el tratamiento no terapéutico del envejecimiento cutáneo.
2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha preparación se presenta en forma de una suspensión celular, biomasa, biomasa triturada, sobrenadante de biomasa triturada o sobrenadante de cultivo.
- 10 3. Utilización cosmética de una composición cosmética que comprende a título de principio activo una preparación procedente de un cultivo de células desdiferenciadas no elicitadas de argán en asociación con un excipiente cosméticamente aceptable, en el tratamiento no terapéutico del envejecimiento cutáneo.
- 15 4. Utilización según la reivindicación 3, caracterizada por que dicha preparación se presenta en forma de una suspensión celular, biomasa, biomasa triturada, sobrenadante de biomasa triturada o sobrenadante de cultivo.
- 20 5. Utilización según una de las reivindicaciones 3 y 4, caracterizada por que la cantidad de preparación está comprendida entre 0,1 y 10% en peso total de la composición.
6. Procedimiento de tratamiento cosmético del envejecimiento cutáneo, que implica la utilización de una composición que comprende a título de principio activo una preparación procedente de un cultivo de células desdiferenciadas no elicitadas de argán en asociación con un excipiente cosméticamente aceptable.
- 25 7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado por que dicha preparación se presenta en forma de suspensión celular, biomasa, biomasa triturada, sobrenadante de biomasa triturada o sobrenadante de cultivo.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 6 y 7, caracterizado por que la cantidad de preparación está comprendida entre 0,1 y 10% en peso total de la composición.

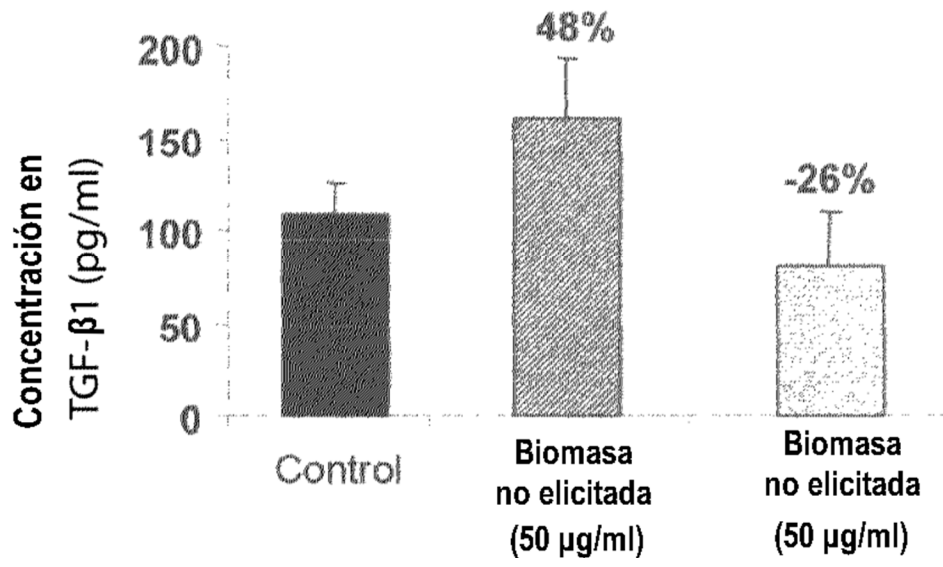


Figura 1

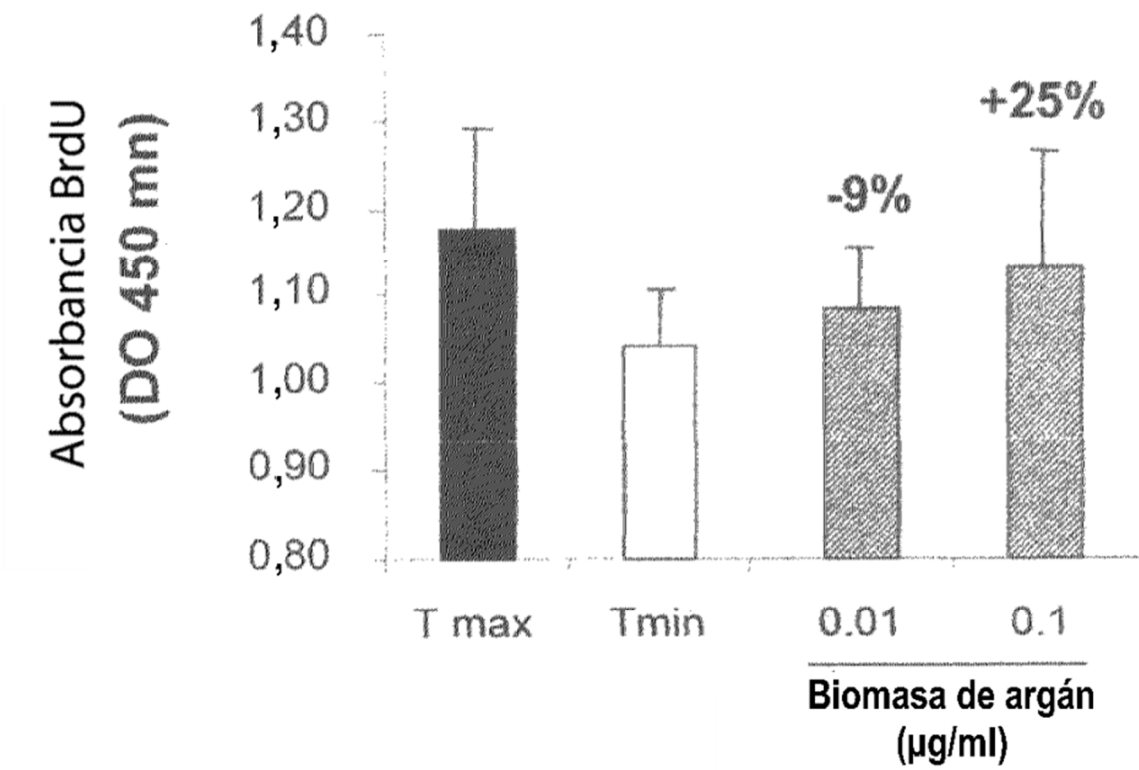


Figura 2

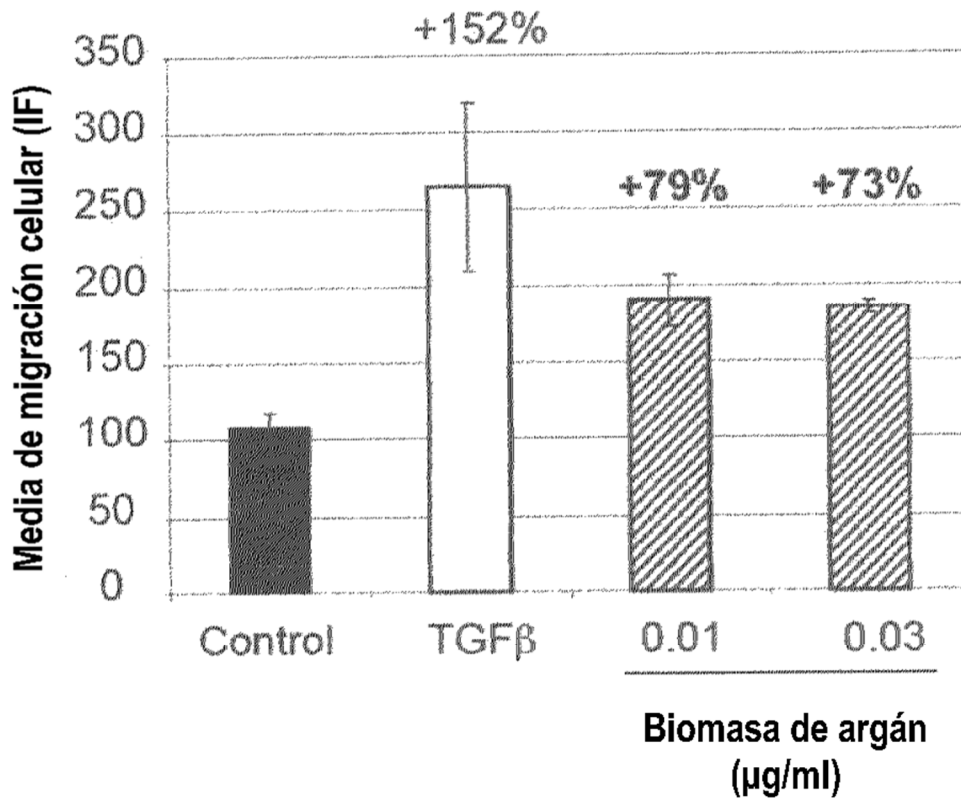


Figura 3