

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 870 160**

51 Int. Cl.:

**A61Q 19/08** (2006.01)

**A61K 8/97** (2007.01)

**A01H 4/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2016 PCT/EP2016/058486**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16173867**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2016 E 16721657 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2021 EP 3288644**

54 Título: **Uso cosmético de extractos procedentes de cultivos de células vegetales enriquecidos con embriones somáticos y composiciones cosméticas que contienen esos extractos**

30 Prioridad:

**29.04.2015 IT MI20150614**

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

**26.10.2021**

73 Titular/es:

**VITALAB S.R.L. (100.0%)  
Piazza Diaz 1  
20123 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**TITO, ANNALISA;  
BARBULOVA, ANI;  
BIMONTE, MARIDA;  
APONE, FABIO y  
COLUCCI, GABRIELLA**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

### Observaciones:

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

ES 2 870 160 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

Uso cosmético de extractos procedentes de cultivos de células vegetales enriquecidos con embriones somáticos y composiciones cosméticas que contienen esos extractos

**Campo de aplicación**

La presente invención se refiere al uso cosmético de extractos procedentes de cultivos de células vegetales inducidos para formar embriones somáticos, al método de preparación de esos extractos y a las respectivas composiciones cosméticas que contienen esos extractos para utilizar en dermocosmética.

**Antecedentes técnicos**

El envejecimiento o la senescencia de la piel es un fenómeno biológico inevitable, el momento y la forma en que esto ocurre se ven afectados de manera predominante por antecedentes genéticos personales, pero también por factores ambientales y estilo de vida.

La piel, el órgano más grande del cuerpo humano, está compuesto por tres capas principales que cumplen funciones específicas. La epidermis es la capa superior de la piel y está compuesta principalmente por queratinocitos, células especializadas que se diferencian en corneocitos mediante la acumulación de queratina en su citoplasma. Además de los queratinocitos, también están presentes en la epidermis los melanocitos, que son células responsables de la pigmentación de la piel, y las células de Langerhans, que forman parte del sistema inmunitario. La segunda capa, la dermis, es un tejido conectivo rico en vasos sanguíneos, células inmunitarias y receptores sensoriales; contiene una matriz compuesta principalmente por fibras de colágeno, elastina y ácido hialurónico, todos los componentes importantes que proporcionan fuerza, hidratación, flexibilidad y elasticidad a la piel. Dispersos en la matriz, están los fibroblastos, células responsables de la síntesis de todos los componentes que componen la dermis. La tercera capa es la hipodermis, ubicada debajo de la dermis, es un tejido adiposo, importante como reserva de energía para todo el organismo.

Los cambios más notables que ocurren durante la senescencia de la piel se refieren a la dermis. Con la edad, se observa un adelgazamiento gradual del grosor de la dermis: como consecuencia, la piel pierde su tono y elasticidad, se debilita y aparecen arrugas. Esto se debe a la reducción del número y la actividad de los fibroblastos, que pierden su capacidad de producir los componentes de la matriz dérmica extracelular, en particular, el colágeno, que constituye el 75 % de la piel humana y es el principal responsable de las propiedades físicas de la dermis, tales como fuerza y tono. Se han identificado 28 tipos de colágeno, entre los cuales los más importantes son: el colágeno de tipo I, que es el principal componente estructural de la matriz extracelular de la dermis; el colágeno de tipo II, presente en grandes cantidades en el cartilago y el colágeno de tipo III, presente en la dermis de la piel y también localizado en las paredes de los vasos sanguíneos. Las fibras de elastina representan del 5 al 10 % del total de fibras dérmicas y son esenciales para asegurar las propiedades elásticas de la piel. Las microfibrillas de fibrilina son importantes para la funcionalidad de las fibras de elastina, ya que dichos componentes juegan un papel clave en la agregación de las propias fibras elásticas; se sintetizan antes que la elastina y forman un esqueleto sobre el que se depositan las moléculas de elastina. Posteriormente, las microfibrillas se mueven hacia la periferia de la fibra en crecimiento y forman una capa alrededor de las fibras elásticas.

La reducción de la cantidad y calidad de los componentes de la matriz de la dermis, que es el principal responsable del envejecimiento cutáneo, está estrechamente relacionada con la capacidad de los fibroblastos para producir estos componentes y, por tanto, con su estado de salud y senescencia. Durante los últimos años, la investigación se ha centrado cada vez más en los componentes moleculares asociados con la longevidad celular, incluyendo las sirtuinas. Las sirtuinas son proteínas presentes en todos los organismos multicelulares y que regulan la actividad de una amplia variedad de factores de transcripción y otras proteínas que se unen al ADN, actuando así como factores de protección de la estabilidad del núcleo. Varios enfoques farmacológicos han demostrado que la presencia de elevados niveles de estas proteínas en las células promueve la longevidad (Lavu *et al.*, 2008). De hecho, hay varios estudios que demuestran que la proteína sirtuina 1 (SIRT1), sin duda la más estudiada y caracterizada entre la familia de sirtuinas, es capaz de regular la longevidad de las células humanas y su metabolismo interno (Zschoernig y Mählkecht, 2008). Además, la sirtuina 6 (SIRT6) activa la reparación del ADN, un papel que se amplifica en presencia de estrés oxidativo. Por lo tanto, actúa como un regulador central de la reparación del ADN, activando otro factor enzimático, el PARP1: el aumento de la expresión de SIRT6 en la célula conduce a una mayor activación de PARP1 para reparar lo más rápido posible el daño del ADN (Mao *et al.*, 2011). De estos estudios se desprende que las sirtuinas son factores clave en la regulación de la viabilidad celular y en la ralentización del proceso de envejecimiento celular, por lo tanto, parece cada vez más importante identificar los posibles activadores de estos factores.

Recientemente, se ha identificado una proteína GDF11 (factor de diferenciación del crecimiento 11), que está presente en la sangre de organismos jóvenes en mayores cantidades que en la de organismos más viejos, de hecho, su cantidad disminuye con el avance de la edad. La GDF11, codificada por un gen *gdf-11* específico, es un miembro de la superfamilia del "Factor de crecimiento transformante  $\beta$ " (TGFB $\beta$ , del inglés 'Transforming Growth Factor  $\beta$ '), y fue inicialmente identificada por su papel regulador en el desarrollo embrionario, en particular, del sistema nervioso y la

regionalización anteroposterior (Williams, 2013; Anderson 2006). Recientemente, se demostró que GDF11 fue capaz de reducir el agrandamiento del corazón debido a la edad (Loffredo *et al.*, 2013), revertir el envejecimiento muscular (Sinha *et al.*, 2014) e incluso reducir algunos efectos perjudiciales debidos al envejecimiento funcional del cerebro (Katsimpardiay *et al.*, 2014). Este sensacional descubrimiento ha sido validado por experimentos en los que se mezcló la sangre de un ratón joven, que contenía el factor GDF11, con la de una rata vieja, utilizando un sistema "parabiótico". Los dos ratones se unieron quirúrgicamente para hacer posible la circulación de la sangre de un ratón joven al cuerpo de un ratón viejo, o se realizaron transfusiones de sangre de un ratón joven en un ratón envejecido: en el ratón viejo se observó que el ADN de las células musculares se reparaba y las fibras musculares se volvían más sanas y jóvenes. Así mismo, la fuerza de agarre muscular aumentó y el ratón fue capaz de correr más tiempo sobre la cinta sin fin en comparación con los ratones no tratados (Loffredo *et al.*, 2013; Sinha *et al.*, 2014).

Otro grupo de investigadores, utilizando sistemas similares para transferir GDF11 de ratones jóvenes a ratones envejecidos, observó que las células animales en la zona subventricular, un área del cerebro relacionada con el sentido del olfato, recibían un mayor flujo de sangre joven, que no solo mejoraba la circulación en esta región sino que también estimulaba la producción de nuevas células nerviosas. El sentido del olfato de los ratones más viejos mejoró significativamente, invirtiéndose la pérdida sensorial normal asociada con el envejecimiento. El descubrimiento más interesante de este trabajo fue que el aumento del flujo sanguíneo se observó no solo en las regiones del cerebro relacionadas con el olfato, sino también en todo el cerebro (Katsimpardiay *et al.*, 2014).

Recientemente, la tendencia del mercado cosmético se ha orientado a productos de origen vegetal natural y, de hecho, ya existen numerosos y diversificados ejemplos. Las plantas son organismos únicos capaces de crear su propio alimento a través de la fotosíntesis, proporcionando oxígeno a la atmósfera al mismo tiempo. También son fuentes importantes de alimentos y compuestos terapéuticos para todos los demás organismos vivos. Las plantas destacan por su gran versatilidad sintética: el espectro de estructuras químicas sintetizadas por el reino vegetal es más amplio que el de cualquier otro grupo de organismos, haciendo de las plantas la principal fuente de remedios naturales en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética (Fowler, 1984). Los seres humanos desarrollaron un amplio conocimiento sobre plantas útiles durante la historia, a través de un contacto constante con el medio natural, y el uso de plantas y extractos vegetales en la medicina tradicional se conoce desde la antigüedad.

Los cultivos de células vegetales representan una alternativa viable para la producción de principios activos cosméticos y dermatológicos, ya que permiten obtener productos libres de contaminantes, biosostenibles y estandarizados, cuya producción se puede ampliar fácilmente a escala industrial (Lee *et al.*, 2010). Existen numerosas ventajas de utilizar cultivos de células vegetales como fuente de principios activos con respecto a la utilización de plantas cultivadas en el campo: 1) suministro continuo de material fresco, independientemente de las estaciones o el ciclo reproductivo de la planta; 2) las condiciones de cultivo se pueden estandarizar fácilmente para tener un mayor nivel de consistencia de un lote a otro; 3) los componentes extraídos son seguros y limpios, lo que significa que no hay riesgo de contaminación patógena o ambiental; 4) el sistema de producción es altamente sostenible: no es necesario ningún terreno agrícola, hay menos consumo de agua y menos material de desecho; 5) es un sistema muy versátil ya que se puede inducir a las células a diferenciarse o producir más de un determinado metabolito, simplemente cambiando las condiciones de crecimiento, o añadiendo diferentes sustancias en el medio de cultivo (Barbulova *et al.*, 2014).

A pesar de que los cultivos de células vegetales representan una valiosa fuente de extractos con probada eficacia cosmética, pueden tener algunas limitaciones debido a su totipotencia y estado indiferenciado, y no ser el sistema más adecuado para la producción de algunas clases de activos con aplicaciones más específicas. En cambio, los cultivos de tejidos vegetales diferenciados (por ejemplo, cultivos de raíces, embriones somáticos, brotes, etc.) son altamente especializados y diferenciados, por lo que son capaces de sintetizar compuestos que no se producen en ningún otro órgano vegetal.

La embriogénesis somática es un proceso por el cual las células somáticas, ya sean diferenciadas o indiferenciadas, se inducen en el laboratorio para generar células embriogénicas que, a través de una serie de cambios morfológicos y bioquímicos (Quiróz-Figueroa *et al.*, 2006), forman estructuras bipolares sin conexión vascular con el tejido original. Estas estructuras se denominan embriones somáticos, porque son morfológica y fisiológicamente idénticos a los embriones cigóticos, es decir, los presentes en las semillas de la planta.

Todos los procesos de desarrollo de los embriones somáticos están regulados por diferentes factores, incluyendo hormonas vegetales, enzimas y otros metabolitos secundarios relacionados con la embriogénesis somática. Siendo estructuras jóvenes en constante actividad mitótica, los embriones somáticos podrían ser una excelente fuente de principios activos cosméticos con el efecto de rejuvenecer y ralentizar el proceso de envejecimiento de la piel humana.

## Sumario de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado un método de producción y extracción de embriones somáticos en cultivo líquido y, de esa forma, han identificado tres tipos de extractos, que tanto de forma individual como sinérgica mediante mecanismos moleculares, son capaces de ralentizar y revertir el fenómeno del envejecimiento de las células de la piel actuando específicamente sobre GDF11 y las sirtuinas. Por lo tanto, las composiciones cosméticas a base de estos extractos tienen un efecto general de rejuvenecimiento en la senescencia cutánea.

En un aspecto de la misma, la presente invención se refiere al uso cosmético de al menos un extracto procedente de cultivos de células vegetales enriquecidos en embriones somáticos para el tratamiento de imperfecciones relacionadas con el envejecimiento de la piel y para producir un efecto rejuvenecedor en la piel.

Los cultivos de células vegetales anteriores enriquecidos en embriones somáticos son cultivos de células vegetales pertenecientes a las especies *Lotus japonicus*, *Citrus limon* y *Rosa gardenia*.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para la preparación de al menos un extracto de cultivos de células vegetales enriquecidos en embriones somáticos, que comprende las siguientes etapas:

- a) inducir cultivos en suspensión de células vegetales para formar embriones somáticos;
- b) homogeneizar los embriones somáticos obtenidos en solución salina acuosa, obteniendo un homogeneizado;
- c) separar la parte sólida de la parte líquida del homogeneizado obtenido, constituyendo la parte líquida un extracto hidrosoluble;
- d) extraer dicha parte sólida con un disolvente lipófilo, obteniendo un extracto liposoluble; y
- e) tratar dicha parte sólida con enzimas proteolíticas en solución ácida para hidrolizar las glucoproteínas de las paredes celulares de los embriones somáticos, obteniendo dicho extracto rico en péptidos y azúcares.

Los cultivos de células vegetales anteriores se obtienen tomando tejidos de plantas, induciendo la formación de callos en un sustrato sólido, y suspendiendo el callo obtenido en cultivo líquido. La solución salina acuosa mencionada anteriormente es generalmente una solución tamponada, tal como solución salina tamponada con fosfato, PBS, a pH 7,4.

Preferentemente, la etapa c) mencionada anteriormente de separación de la parte sólida del homogeneizado de la parte líquida se realiza mediante centrifugación y conduce a la separación de un sobrenadante (parte líquida) y un sedimento (parte sólida).

El disolvente lipófilo es un disolvente orgánico preferentemente seleccionado de alcoholes, acetona, éter, esteroides y aceites, y convenientemente constituido mediante un alcohol de 2 a 4 átomos de carbono, preferentemente etanol.

Preferentemente, la parte sólida se trata previamente con agua destilada para eliminar los residuos de componentes citoplásmicos y, a continuación, se trata con una solución ácida para la hidrólisis de los enlaces glucosídicos y con enzimas para hidrolizar las proteínas de las paredes celulares. Preferentemente, después del tratamiento con agua destilada y antes del tratamiento con la solución ácida, la parte sólida se trata con una solución EDTA (por ejemplo 2 mM) y se hierve. Los extractos mencionados anteriormente (extracto hidrosoluble, extracto liposoluble y extracto rico en péptidos/azúcares) se pueden evaporar hasta la sequedad con métodos conocidos (por ejemplo, utilizando un liofilizador, un evaporador rotatorio o un secador por pulverización), obteniendo, dependiendo del caso, un polvo o una pasta semisólida.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende los tres extractos anteriores: el extracto hidrosoluble, el extracto liposoluble y el extracto rico en péptidos y azúcares.

Preferentemente, la composición mencionada contiene, por una parte en peso del extracto hidrosoluble, de 0,01 a 100, preferentemente 1, partes en peso del extracto liposoluble e independientemente, de 0,01 a 100, preferentemente 0,1, partes en peso del extracto rico en péptidos y azúcares.

Preferentemente, la composición de acuerdo con la invención comprende además al menos un disolvente hidrófilo seleccionado del grupo que comprende agua, soluciones salinas acuosas y disolventes orgánicos, preferentemente aceites, alcoholes, glicerol, ácidos orgánicos, amidas, aminas, aldehídos y cetonas.

Además, la presente invención se refiere al uso de la composición cosmética descrita anteriormente para el tratamiento de imperfecciones relacionadas con el envejecimiento de la piel y para producir un efecto rejuvenecedor en la piel.

Por último, la presente invención se refiere a una formulación cosmética que comprende uno de los extractos descritos anteriormente (extracto hidrosoluble, extracto liposoluble, extracto rico en péptidos y azúcares) o a una composición como se define anteriormente y un vehículo cosméticamente aceptable. Dicha formulación cosmética puede estar, por ejemplo, en forma de crema, gel, loción para aplicación cutánea, barra de labios, base de maquillaje y maquillaje.

#### Descripción detallada

De acuerdo con una realización de la presente invención, el proceso se realiza de acuerdo con los siguientes

procedimientos y condiciones:

Preparación de callos: se toman hojas enteras de plantas, por ejemplo, *Lotus japonicus*, y se esterilizan con etanol al 70 % (en agua v/v) durante 15 minutos e hipoclorito de sodio al 1 % (en agua v/v), durante otros 15 minutos. Después de lavarse 3 veces en agua para eliminar el alcohol y el hipoclorito, las hojas se cortan en trozos de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> cada uno con una cuchilla esterilizada. Todos los fragmentos de hojas se colocan en un medio sólido Gamborg B5 que contiene: agar vegetal 7,5 mg/l, mioinositol 500 mg/l, sacarosa 30 g/l, 2.4D 1 mg/l, cinetina 0,01 mg/l, adenina 1 mg/l, a pH 5,7. Después de aproximadamente 5 semanas de incubación a 20 °C en oscuridad, se obtienen callos debido a la proliferación de las células de la hoja. A continuación, los callos se transfieren a un medio de cultivo nuevo cada 3 a 4 semanas.

a) Preparación del cultivo celular: cuando los callos alcanzan un diámetro de aproximadamente 1 cm (aproximadamente 50 mg de peso), se recogen y se dispersan en matraces Erlenmeyer que contienen 50 ml de medio de cultivo líquido AB1 (medio Gamborg B5 que contiene: mioinositol 500 mg/l, sacarosa 30 g/l, 2.4D 1 mg/l, cinetina 0,01 mg/l, adenina 1 mg/l, a pH 5,7). Los matraces se colocan en un agitador orbital con una velocidad de agitación de 100 rpm. Después de unos 10 días, los callos se rompen y proliferan para formar cultivos celulares en suspensión.

b) Preparación de embriones somáticos: los cultivos de células vegetales se vuelven a suspender en un nuevo medio de crecimiento líquido AB2 (medio Gamborg B5 que contiene: mioinositol 500 mg/l, sacarosa 30 g/l) con adición de las fitohormonas tiazaurón (TDZ) 1 mg/l y bencilaminopurina (BAP), 0,05 mg/l, glutatión 10 mg/l, caseína 500 mg/l, fosfato de amonio y sulfato de amonio, al 7 % y al 10 %, respectivamente, para inducir la formación de embriones somáticos en los cultivos celulares.

c) Crecimiento de cultivos celulares de embriones somáticos: la inducción de embriones somáticos se realiza durante 4 semanas, añadiendo medio de cultivo nuevo cada semana, hasta alcanzar un nivel de diferenciación en embriones somáticos de aproximadamente un 70 a un 90 %.

d) Tratamientos de embriones somáticos: de acuerdo con una realización preferida del método divulgado en la presente invención, los embriones somáticos pueden someterse a tratamientos físicos (calor, frío, UV) durante su crecimiento o tratarse con compuestos químicos (proteínas, lípidos, azúcares, sales, pequeñas moléculas orgánicas, factores físicos) para inducir la expresión de mayores cantidades de metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes.

e) Recogida de embriones somáticos: la separación de los embriones del medio de cultivo se puede realizar mediante centrifugación a 2000 g, sedimentación o filtración a través de membranas con un diámetro de poro inferior a 100 micrómetros. A continuación, los embriones se congelan a -80 °C para conservar sus propiedades químicas y físicas.

f) Homogeneización de embriones somáticos: los embriones somáticos congelados se rompen mecánicamente (homogeneizados) en presencia de solución salina tamponada con fosfato, PBS, (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM, pH 7,4) en una proporción 1:2 p/v. Esta etapa se puede realizar en un recipiente adecuado tal como un mortero de cerámica y una mano de mortero de cerámica, previamente enfriado o, para volúmenes mayores, se pueden utilizar recipientes más grandes, incluso metálicos, donde el material vegetal se pueda homogeneizar con cuchillas metálicas, utilizando batidoras de laboratorio o industriales, o prensas.

g) Obtención del extracto hidrosoluble: una vez obtenido un lisado homogéneo mediante homogeneización de los embriones, la muestra se centrifuga, por ejemplo, a 4000 rpm durante unos 15 minutos a 4 °C, para precipitar los componentes insolubles. Se recoge el sobrenadante obtenido mediante centrifugación: se constituye el extracto hidrosoluble.

h) Obtención del extracto liposoluble: la mitad del sedimento obtenido mediante centrifugación se trata con un disolvente orgánico (alcohol, acetona, éter, aceite) y se mezcla para extraer los componentes solubles en aceite (junto con los poco solubles en agua), a temperaturas comprendidas entre 20 y 80 °C según el tipo de disolvente utilizado. Después de una centrifugación adicional a 4000 rpm durante 15 min a 4 °C, se elimina la fase líquida: se constituye el extracto liposoluble.

i) Obtención del extracto rico en péptidos y azúcares de las paredes celulares: la otra mitad del sedimento (que contiene las paredes celulares) obtenido en la etapa h) se lava adicionalmente con agua destilada para eliminar el resto de la fracción soluble y se filtra de nuevo. Se pesa el sedimento, se suspende y se hierve con 2 volúmenes (relación p/v) de una solución EDTA 2 mM durante 20 minutos. Después de enfriarse, el extracto se filtra a través de una tela filtrante, se lava y se filtra de nuevo para eliminar el EDTA residual. Posteriormente, el sedimento obtenido se hierve bajo una campana química con 2 volúmenes de una solución de HCl 0,1 N durante 1 hora para hidrolizar los enlaces de azúcar. Después de hervir, la muestra se vuelve a suspender, se enfría en hielo y después se digiere de manera enzimática a 37 °C durante 16 horas con pepsina, utilizando 1 mg de enzima por cada ml de

suspensión. Al final de la digestión enzimática, la suspensión se centrifuga o se filtra de nuevo para obtener una solución transparente: se constituye el extracto rico en péptidos y azúcares procedente de las paredes celulares.

Los extractos obtenidos en las etapas h), i) y j) se secan en un liofilizador, evaporador rotatorio, cámara de secado o secador por pulverización para eliminar el disolvente. El polvo o la pasta semisólida resultante se suspende en agua (fracción hidrosoluble y fracción de péptido/azúcar) o en disolventes orgánicos compatibles con formulaciones cosméticas (fracción liposoluble) hasta la concentración deseada. En el caso de que el disolvente utilizado en la etapa i) sea un aceite, tal como un triglicérido, no se puede eliminar, por lo tanto, la solución obtenida constituye ya el principio activo para utilizar en fórmulas para aplicaciones cosméticas y dermatológicas.

Las soluciones obtenidas que contienen las diferentes fracciones (hidrosolubles, liposolubles y de péptidos/azúcares) pueden disolverse adicionalmente en un volumen adecuado de glicerol u otro disolvente (aceite, alcohol, esteroles), dependiendo de las características químicas de la fracción, para tener una concentración que varíe del 0,1 % al 10 % (p/v). Estas soluciones representan la materia prima que se añade a las formulaciones de fabricación de productos cosméticos o dermatológicos listos para su aplicación.

En conclusión, el objeto de la presente invención consiste en: el extracto hidrosoluble de embriones somáticos obtenible mediante las etapas del método a) a h); el extracto liposoluble obtenible mediante las etapas del método a) a i); y el extracto de péptidos y azúcares de las paredes celulares obtenibles mediante las etapas del método a) a j). Además, la invención también se refiere al método de preparación de los embriones somáticos anteriores mediante inducción con condiciones de crecimiento específicas y tratamientos desarrollados por el solicitante, que permiten obtener los extractos descritos ricos en sustancias con acción beneficiosa sobre las células de la piel.

Son también objeto de la presente invención las composiciones cosméticas que comprenden el extracto hidrosoluble, el extracto liposoluble y el extracto rico en péptidos y azúcares de las paredes celulares, solos o en combinación.

De manera ventajosa, dichas composiciones cosméticas contienen, por cada parte en peso de extracto hidrosoluble, de 0,01 a 100 partes, preferentemente 1, partes en peso de extracto liposoluble y de 0,01 a 100 partes en peso, preferentemente 0,1, de extracto rico en péptidos y azúcares, posiblemente junto con vehículos, excipientes y/o adyuvantes cosméticamente aceptables.

Una composición cosmética particularmente preferida comprende, por una parte en peso de extracto hidrosoluble, una parte en peso de extracto liposoluble y 0,1 partes en peso de extracto rico en péptidos y azúcares, posiblemente junto con vehículos, excipientes y/o adyuvantes cosméticamente aceptables.

Dichas composiciones pueden estar en forma de cremas, geles, lociones cosméticas para la aplicación cutánea, así como barras de labios, bases de maquillaje y maquillaje. Los vehículos que se pueden utilizar son liposomas, preferentemente liposomas multilaminares, ciclodextrinas, y silicatos. Por último, la invención se refiere a un método de tratamiento cosmético para el rejuvenecimiento y la ralentización del proceso de senescencia cutánea que comprende la aplicación sobre la piel de una cantidad cosméticamente eficaz de una composición como se describe anteriormente, es decir, que comprende al menos uno de estos extractos procedentes de cultivos de embriones somáticos.

La presente invención se describirá ahora con fines ilustrativos y no limitantes, de acuerdo con realizaciones preferidas de la misma, con especial referencia a las figuras de los dibujos adjuntos, en los que:

- La figura 1 muestra un cultivo de células vegetales no diferenciadas y un cultivo celular enriquecido con embriones somáticos de *Lotus japonicus*, ambos después de 4 semanas de crecimiento.
- La figura 2 muestra el ensayo MTT que muestra que los extractos de embriones somáticos de *Lotus japonicus* no son citotóxicos en todas las concentraciones ensayadas. En ordenadas se informa del número de células viables, expresado como porcentaje respecto al control, establecido como 100 %.
- La figura 3 muestra el análisis de expresión del gen de GDF11 en células tratadas con los extractos de embriones somáticos de *Lotus japonicus* en comparación con el de las células de control no tratadas. Los valores que se muestran en el gráfico se expresan como porcentajes en comparación con la muestra de control sin tratar (establecida como 100 %).
- La figura 4 muestra el análisis de expresión de los genes de sirtuina 1 (SIRT1) y sirtuina 6 (SIRT6) en células tratadas con los extractos de embriones somáticos de *Lotus japonicus* en comparación con los de las muestras de células de control no tratadas. Los valores que se muestran en el gráfico se expresan como porcentajes en comparación con la muestra de control sin tratar (establecida como 100 %).
- La figura 5 muestra el efecto de los extractos de embriones somáticos de *Lotus japonicus* sobre la expresión génica del colágeno III (Col-III), fibrilina 1 (Fb1) y elastina (Eln), después de 6 horas de tratamiento; los valores que se muestran en el gráfico se expresan como porcentajes con respecto a la muestra de control sin tratar, establecida

como 100 %.

- La figura 6 muestra el análisis de expresión del gen de GDF11 en fibroblastos jóvenes (HDF jóvenes) y fibroblastos viejos (HDF viejos), tratados con diferentes concentraciones de extracto de péptidos/azúcares de embriones somáticos de *Lotus japonicus*. Los valores que se muestran en el gráfico se expresan como porcentajes en comparación con la muestra de control de células jóvenes no tratadas, establecida como 100 %.
- La figura 7 muestra el efecto de los extractos individuales de embriones somáticos de *Lotus japonicus* y la mezcla que consiste en la unión de los 3 extractos en proporción 1:1:1, sobre la expresión del gen de GDF11 en fibroblastos jóvenes (HDF jóvenes) y viejos (HDF viejos). Los valores que se muestran en el gráfico se expresan como porcentajes en comparación con la muestra de control de células jóvenes no tratadas, establecida como 100 %.

Para describir la presente invención con fines ilustrativos y no limitantes, se proporcionan en el presente documento algunos ejemplos relativos a la preparación de cultivos de células de embriones somáticos de las especies *Lotus japonicus*, *Citrus lemon* y *Rosa gardenia* (var. Maipaleo). Así mismo, también se proporcionan un ejemplo de preparación de un extracto hidrosoluble, un extracto liposoluble y un extracto rico en péptidos y azúcares de embriones somáticos de *Lotus japonicus* y experimentos que demuestran la actividad biológica de los extractos mencionados anteriormente en el campo cosmético.

#### EJEMPLO 1:

Preparación y crecimiento de cultivos celulares de embriones somáticos de *Lotus japonicus*, *Citrus lemon* y *Rosa gardenia* (var. Maipaleo). Se utilizaron trozos de hojas tiernas de *Lotus japonicus*, *Citrus lemon* y *Rosa gardenia* para la formación de callos en medio sólido y, posteriormente, se indujeron cultivos celulares líquidos para formar embriones somáticos. La observación de muestras de cultivos celulares no inducidos y cultivos celulares inducidos para formar embriones somáticos, puso de manifiesto que, después de 4 semanas de crecimiento, las células en el cultivo inducido se diferenciaban y agregaban para formar estructuras similares a embriones, lo que hacía que el cultivo fuera más granulado en comparación con el de las células no inducidas (Figura 1). Una vez que se obtuvieron cultivos densos de embriones somáticos de las 3 especies diferentes, se evaluó el porcentaje de diferenciación después de 4 semanas mediante la observación en microscopio óptico y tinción con azul de metileno en solución acuosa al 0,01 %. Para el cultivo celular de *Lotus japonicus* se calculó un rendimiento de diferenciación del 90 %, del 80 % para el cultivo celular de *Citrus lemon* y del 72 % para el cultivo celular de *Rosa gardenia*. Una vez que se alcanzó la densidad deseada, los embriones somáticos se recogieron y se procesaron para obtener los extractos. El método utilizado fue el siguiente:

#### *Obtención y recogida de cultivos celulares de embriones somáticos.*

Se suspendieron 50 mg de callo vegetal en matraces de Erlenmeyer que contenían 50 ml de medio de cultivo líquido AB1 (medio Gamborg B5 que contenía: mioinositol 500 mg/l, sacarosa 30 g/l, 2.4D 1 mg/l, cinetina 0,01 mg/l, adenina 1 mg/l, a pH 5,7). Los matraces se colocaron en la oscuridad en un agitador con agitación orbital a 100 rpm para obtener un cultivo de células vegetales denso. Después de unos 10 días, se observó un cultivo denso de embriones somáticos, obtenidos mediante la proliferación y diferenciación de las células del callo. Se inocularon 100 ml de cultivo denso en 1 l de semimedio AB/TDZ para permitir su crecimiento. Después de 10 días, se suspendieron los cultivos de células vegetales en un nuevo medio de crecimiento líquido AB2 (medio Gamborg B5 que contenía: mioinositol 500 mg/l, sacarosa 30 g/l) con la adición de las fitohormonas tidiazurón (TDZ), 1 mg/l y bencilaminopurina (BAP), 0,05 mg/l, glutatión 10 mg/l, caseína 500 mg/l, fosfato de amonio y sulfato de amonio, al 7 y al 10 %, respectivamente, para inducir la formación y desarrollo de los embriones somáticos (cultivos celulares enriquecidos con embriones somáticos). Después de 4 semanas de crecimiento, los embriones somáticos se recogieron retirando mediante filtración su medio de cultivo y se congelaron a -80 °C.

#### EJEMPLO 2: Preparación de diferentes extractos de cultivos celulares de embriones somáticos de las especies *Lotus japonicus*, *Citrus lemon* y *Rosa gardenia*.

Los embriones somáticos recogidos se procesaron para obtener extractos con diferentes características químicas. Se obtuvieron 3 tipos de extractos de cultivos celulares de embriones somáticos pertenecientes a las especies *Lotus japonicus*, *Citrus lemon* y *Rosa gardenia*. Para cada una de las especies se prepararon los siguientes extractos: a) un extracto de compuestos solubles en agua (extracto hidrosoluble), obtenido mediante la utilización de un tampón salino a base de agua (PBS); b) un extracto de compuestos lipófilos capaces de disolverse en disolventes no polares o poco polares, obtenido mediante la utilización de etanol; c) un extracto compuesto por péptidos y azúcares procedentes de las paredes celulares, obtenido mediante el procedimiento ya descrito. Los extractos obtenidos se trataron para eliminar el disolvente (agua o etanol en el caso específico) mediante liofilización o evaporación al vacío. Los polvos o geles semisólidos obtenidos se pesaron y se disolvieron en agua destilada hasta la concentración deseada para analizarlos en cultivos de células cutáneas.

El método utilizado para la preparación de los extractos se describe a continuación:

#### *Preparación de los extractos acuoso, con etanol y de péptidos/azúcares.*

Se lisaron de manera mecánica 500 g de embriones somáticos congelados y después se homogeneizaron en presencia de PBS (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM, pH 7,4) en una proporción 1:2 volumen/peso. El homogeneizado obtenido se centrifugó a 8.500 rpm durante 15 minutos a 4 °C para precipitar los componentes insolubles. El sobrenadante, obtenido de la centrifugación, constituye el extracto hidrosoluble y se congeló a -20 °C. Posteriormente, el extracto hidrosoluble se liofilizó durante 3 días para obtener un polvo que se suspendió en agua a una concentración que varió entre el 1 y el 10 % para su uso posterior en ensayos biológicos.

La mitad del sedimento se trató con un disolvente orgánico (alcohol, acetona, éter u otros disolventes no polares), compatible con las emulsiones básicas utilizadas para fórmulas cosméticas, bajo constante agitación para extraer los componentes liposolubles. Después de centrifugar a 6000 rpm durante 15 min a 4 °C, la fase líquida, que constituía el extracto liposoluble, se utilizó en los ensayos biológicos.

La otra mitad del sedimento se lavó adicionalmente con agua y se filtró de nuevo. Se pesó el sedimento, se suspendió y se hirvió en 2 volúmenes de solución EDTA 2 mM durante 20 minutos. Después de enfriar, el extracto se filtró a través de una tela filtrante, se lavó y se filtró de nuevo para eliminar el EDTA residual. Posteriormente, el sedimento obtenido se hirvió en 2 volúmenes de solución de HCl 0,1 N durante 1 hora para hidrolizar los azúcares. Después de hervir, la muestra se enfrió con hielo y después se digirió con pepsina a 37 °C durante 16 horas, utilizando 1 mg de enzima por ml de suspensión. El extracto de péptidos y azúcares obtenido se liofilizó durante 3 días para obtener un polvo que se disolvió en agua a una concentración que varió del 1 al 19 % para su posterior ensayo.

### EJEMPLO 3: Ensayos biológicos de extractos procedentes de cultivos celulares de embriones somáticos en células cutáneas.

Como ejemplo ilustrativo y no limitante de la presente invención, se han utilizado extractos de embriones somáticos de *Lotus japonicus* para dilucidar las propiedades beneficiosas y terapéuticas sobre las células de la piel. El extracto hidrosoluble, el liposoluble (etanólico) y el compuesto por péptidos y azúcares, procedente de las paredes celulares, se probaron en células HDF (fibroblastos dérmicos humanos) para evaluar la actividad cosmética. Los métodos utilizados en los ensayos y los resultados obtenidos se describen a continuación.

#### MÉTODOS UTILIZADOS:

##### *Ensayo de citotoxicidad.*

Este ensayo se basa en el uso de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] descrito por primera vez por Mosmann en 1983. Se basa en la capacidad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial de las células viables para hidrolizar el anillo de MTT tetrazolio (amarillo claro) y formar cristales de formazán (color azul oscuro). Estos cristales son impermeables a las membranas celulares y se acumulan en el citoplasma de células metabólicamente activas. Por lo tanto, el número de células vivas y sanas es directamente proporcional al nivel de producto de formazán. Las células HDF, en el número inicial de  $1,5 \times 10^4$  por pocillo, se cultivaron en placas de 96 pocillos en medio de cultivo DMEM (Lonza), complementado con suero bovino fetal al 10 %, durante aproximadamente 20 horas. Después del tratamiento con diferentes concentraciones de la mezcla durante 48 horas, las células se lavaron en PBS y se incubaron con 100 µl/pocillo de "tampón de reacción" que contenía: Hepes 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, glucosa 5 mM y sustrato colorimétrico MTT 0,5 mg/ml en tampón PBS a pH 7,4. Después de 3 horas de incubación a 37 °C, y CO<sub>2</sub> al 5 %, se añadieron a cada pocillo 100 µl de solución solubilizante que contenía Triton-X100 al 10 %, HCl 0,1 N en isopropanol absoluto. Después de 30 minutos, se midió la reacción colorimétrica a 595 nm con un lector de placas de ELISA.

##### *Análisis de expresión de genes de GDF11, SIRT1, SIRT6, Col-III, ELN y FBn1.*

Las células HDF, en el número inicial de  $7 \times 10^4$  por pocillo, se cultivaron en placas de 6 pocillos en medio de cultivo DMEM (Gibco), complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 % durante 20 horas. A continuación, las células se incubaron con los extractos durante 6 horas en medio sin suero. Para la extracción de ARN celular se utilizó un kit adquirido de Ambion/Life Technologies. Después de los tratamientos, las células se lavaron con PBS, se disolvieron en tampón de lisis y se sometieron al procedimiento de extracción de acuerdo con el protocolo del kit. Las muestras de ARN se sometieron a un tratamiento con desoxirribonucleasa I (Ambion) para eliminar los contaminantes del ADN genómico. Se cargaron 2 µl de cada muestra en gel de agarosa al 1 % en presencia de "colorante de carga" desnaturalizante y se cuantificaron utilizando marcadores de ARN específicos (Thermo Scientific) como referencia. Para la cuantificación, se utilizaron herramientas del programa informático Gene (Perkin Elmer). Se sometieron a transcripción inversa 300 ng de ARN total utilizando la enzima transcriptasa inversa (Thermo Scientific). Las reacciones de RT-PCR semicuantitativa se realizaron utilizando patrones internos como el par de cebadores universales cebador 18S/competimer (Ambion) en una relación 4:6. Los productos de la PCR se separaron en gel de agarosa al 1,5 %, se visualizaron utilizando la herramienta Geliance (Perkin Elmer) y se analizaron mediante densitometría utilizando el programa informático GeneTools. Los valores que se muestran en los gráficos representan la relación entre la intensidad de la banda en relación con el gen en análisis y la de la banda en relación con los patrones 18S, obteniendo así un valor relacionado con la expresión real del gen de interés, y no uno dependiente de

la cantidad de ARN o reactivos de PCR presentes en esa muestra. A continuación, los valores se convirtieron en un porcentaje (%), estableciendo el valor obtenido del control sin tratar como 100 %.

## RESULTADOS OBTENIDOS

5

*Evaluación de las concentraciones de extracto más adecuadas para utilizar en ensayos basados en células.*

Para determinar las concentraciones de los distintos extractos de embriones somáticos de *Lotus* que se utilizarán en los bioensayos, se probaron concentraciones crecientes de los extractos y se determinó la dosis máxima no citotóxica para cultivos de células cutáneas en crecimiento. Para el extracto acuoso y etanólico, se probaron concentraciones que variaban del 0,05 % al 0,0004 %, mientras que para la mezcla de péptidos y azúcares se utilizaron concentraciones del 0,01 % al 0,00008 %. Como se muestra en la figura 2, ninguna de las concentraciones probadas mostró ningún efecto citotóxico significativo sobre las células.

*Efectos de los extractos acuoso, con etanol y de azúcares/péptidos procedentes de embriones somáticos de Lotus japonicus sobre la expresión génica de GDF11, SIRT1 y SIRT6.*

A pesar de que no se ha informado de estudios sobre GDF11 en células de la piel, los autores de la presente invención llevaron a cabo algunas investigaciones preliminares y encontraron que GDF11 se producía y regulaba en las células de la piel, por lo tanto, es muy probable que tenga funciones similares relacionadas con la actividad antisenescencia. Para determinar si los extractos de embriones somáticos de *Lotus* tenían un efecto sobre la expresión del gen de GDF11, se trataron HDF con el extracto soluble en agua (0,002 %), el extracto etanólico (0,002 %) o la mezcla de péptidos y azúcares (0,0002 %) durante 6 horas. Después de los tratamientos, las células se recogieron y se procesaron para la extracción de ARN. La expresión génica se evaluó mediante RT-PCR. Como se muestra en la figura 3, los tres extractos analizados estimularon significativamente la expresión del gen de GDF11 en aproximadamente un 30 %.

Después de verificar el efecto de los extractos sobre la expresión de GDF11, se evaluó su efecto sobre la expresión de los genes de SIRT1 y SIRT6, codificando las dos sirtuinas que tienen funciones en la promoción de la longevidad y la salud celular, mediante experimentos de RT-PCR en HDF tratados con los extractos. Como se muestra en la figura 4, la mezcla de péptido/azúcar produjo un aumento significativo en la expresión de ambos genes, + 117 % para *sirt1* y 73 % para *sirt6*. En cambio, el efecto del extracto de etanol sobre *sirt1* fue muy moderado. Estos resultados indicaron que el extracto de péptidos y azúcares procedentes de las paredes celulares de los embriones somáticos de *Lotus* fue el más eficaz para promover el rejuvenecimiento celular al aumentar la expresión de GDF11 y sirtuina.

*Efectos de los extractos acuoso, con etanol y de azúcar/péptido procedentes de embriones somáticos de Lotus japonicus sobre la expresión génica de Col-III, ELN y FBN1.*

Para determinar si los extractos de embriones somáticos de *Lotus* tuvieron un efecto sobre los genes responsables de la producción de las proteínas de la matriz extracelular (MEC), se evaluó la expresión de los genes de colágeno de tipo III, elastina y fibrilina mediante RT-PCR en HDF.

Como se muestra en la figura 5, los tres extractos produjeron un efecto significativo sobre la síntesis de colágeno III en alrededor de un 70 %. La expresión del gen de la elastina se incrementó en aproximadamente un 30 % en las células tratadas con el extracto soluble en agua o con la mezcla de péptidos/azúcares, mientras que en la fibrilina 1 solo la mezcla de péptidos y azúcares determinó un aumento del 50 %. Estos datos demostraron que los extractos procedentes de embriones somáticos de *Lotus* tuvieron un efecto estimulante sobre las proteínas de la matriz extracelular, en particular, el extracto de péptidos y azúcares procedentes de las paredes celulares fue eficaz en los 3 genes analizados.

*Efectos del extracto de azúcar/péptido de embriones somáticos de Lotus japonicus sobre la expresión de GDF11 en fibroblastos envejecidos.*

Para evaluar si el extracto de péptido/azúcar procedente de embriones somáticos de *Lotus japonicus* (el que mejor desempeño tuvo en las pruebas anteriores) fue capaz de inducir el gen de GDF11 incluso en fibroblastos envejecidos, se realizó un nuevo experimento en el que se trataron fibroblastos primarios procedentes de pacientes de 36 años (HDF viejos) con diversas concentraciones de extracto y se evaluó el nivel de expresión de GDF11 y después se comparó con el nivel de expresión de GDF11 en fibroblastos jóvenes (HDF jóvenes). Como se muestra en la figura 6, el extracto de péptido/azúcar indujo la expresión del gen de GDF11 incluso en fibroblastos envejecidos, de manera dependiente de la dosis, y casi restauró el nivel de expresión normal de los fibroblastos jóvenes. Este resultado indicó que el extracto de embriones somáticos de *Lotus japonicus* fue capaz de revertir el fenotipo de senescencia de las células mediante la activación de GDF11.

*Efectos de la combinación de los tres extractos procedentes de embriones somáticos de Lotus japonicus sobre la expresión del gen de GDF11.*

Para evaluar si el efecto de GDF11 se incrementó aún más mediante el tratamiento con todos los extractos combinados, se trataron fibroblastos envejecidos (HDF viejos) con la mezcla que contenía los 3 extractos en concentraciones eficaces previamente calculadas (0,002 % para los extractos de agua y etanol, y 0,0002 % para el extracto de péptido/azúcar) y con el extracto de péptido/azúcar solo, durante 6 horas. Como se muestra en la figura 7, el efecto de la mezcla que contenía los 3 extractos sobre la expresión de GDF11 fue significativamente mayor que el del extracto de péptido/azúcar solo, sugiriendo un efecto sinérgico de la combinación en la activación de este gen específico.

En conclusión, la mezcla de los tres extractos de embriones somáticos de *Lotus japonicus* fue más eficaz para activar GDF11 que el extracto de péptido/azúcar solo, induciendo así una respuesta más fuerte en los procesos de antienviejimiento y rejuvenecimiento de las células de la piel. Por lo tanto, esta mezcla podría utilizarse como principio activo único en formulaciones cosméticas dedicadas al cuidado de la piel.

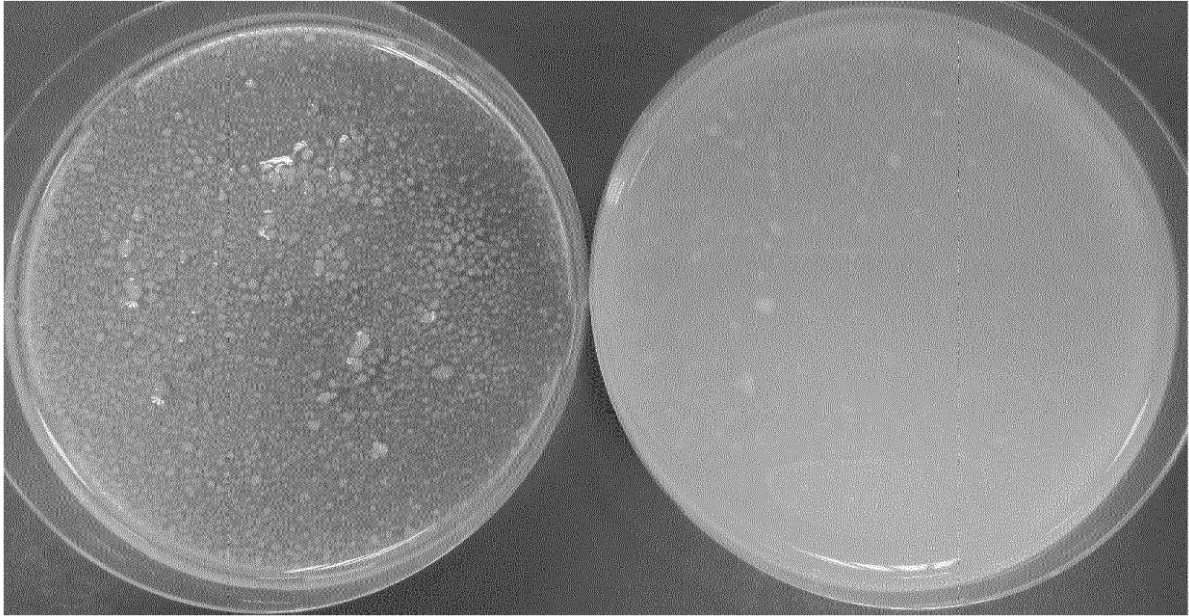
#### Artículos citados (en orden alfabético).

- 1) Anderson O., Reissmann E., Ibáñez C. F. (2006). Growth differentiation factor 11 signals through the transforming growth factor  $\beta$  receptor ALK5 to regionalize the anterior-posterior axis. *EMBO reports* 7, 831-837.
- 2) Barbulova A., Apone F. y Colucci G. (2014). Plant cell cultures as source of cosmetic active ingredients. *Cosmetics*, 1, 94-104.
- 3) Fowler M. (1984). Plant cell culture: natural products and industrial application. *Biotechnol. Genetic Engineer. Rev.*, 10 (2): 41-67.
- 4) Katsimpardi L., Litterman N. K., Schein P. A., Miller C. M., Loffredo F. S., Wojtkiewicz G. R., Chen J. W., Lee R. T., Wagers A. J., Rubin L. L. (2014) Vascular and neurogenic rejuvenating of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science*, 344 (6184): 630-634.
- 5) Lavu S., Boss O., Elliott P. J. y Lambert P. D. (2008). Sirtuins--novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. *Nature Rev Drug Discover*, 7: 841-853.
- 6) Lee E., Jin Y., Park J., Yoo Y., Hong S., Amir Z., Yan Z., Kwon E., Elfisk A., Tomlinson S., Halbritter F., Waibel T., Yun B. y Loake G. (2010). Cultured cambial meristematic cells as a source of plant natural products. *Nature biotech*, 28 (11): 1213-1217.
- 7) Loffredo F. S., Steinhauser M. L., Jay S. M., Gannon J., Pancoast J. R., Yalamanchi P., Sinha M., Dall'Osso C., Khong D., Sadrac J. L., Miller C. M., Singer B. S., Stewart A., Psychogios N., Gerszten R. E., Hartigan A. J., Kim M. J., Serwold T., Wagers A. J. y Lee R. T. (2013). Growth differentiation Factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. *Cell*, 153 (4): 828-839.
- 8) Mao Z., Hine C., Tian X., Van Meter M., Au M., Vaidya A., Seluanov A., Gorbunova V. (2011). SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science*, 332 (6036): 1443-6.
- 9) Sinha M., Jang Y. C., Oh J., Khong D., Wu EY., Manohar R., Miller C., Regalado S. G., Loffredo F. S., Pancoast J. R., Hirshman M. F., Lebowitz J., Sadrac J. L., Cerletti M., Kin M. J., Serwold T., Goodyear U., Rosner B., Lee R. T., Wagers A. J. (2014). Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science*, 344 (6184): 649-652.
- 10) Williams G., Zentar M. P., Gajendra S., Sonogo M., Doherty P., Lalli G. Transcriptional basis for the inhibition of neural stem cell proliferation and migration by the TGF $\beta$ -family member GDF11 (2013). *Plos One*, 8 (11): e78478.
- 11) Zschoernig B. y Mahlknecht U. (2008). SIRTUIN 1: regulating the regulator. *Biochem Biophys Res Comm*, 376: 251-255.

## REIVINDICACIONES

1. Uso no terapéutico de al menos un extracto procedente de cultivos de células vegetales enriquecidos en embriones somáticos pertenecientes a las especies *Lotus japonicus*, *Citrus limon* y *Rosa gardenia* para el tratamiento de imperfecciones relacionadas con el envejecimiento de la piel y para inducir un efecto de rejuvenecimiento en los tejidos de la piel, en donde dicho al menos un extracto comprende un extracto rico en péptidos y azúcares obtenido mediante un proceso que comprende las siguientes etapas:
  - a) inducir cultivos en suspensión de células vegetales para formar embriones somáticos;
  - b) homogeneizar los embriones somáticos obtenidos en una solución de agua salada, obteniendo un homogeneizado;
  - c) separar la parte sólida de la parte líquida de dicho homogeneizado, constituyendo la parte líquida un extracto hidrosoluble;
  - d) extraer dicha parte sólida con un disolvente lipófilo, obteniendo un extracto liposoluble; y
  - e) tratar dicha parte sólida con enzimas proteolíticas en solución ácida para hidrolizar las glucoproteínas de las paredes celulares de los embriones somáticos, obteniendo dicho extracto rico en péptidos y azúcares.
2. Uso no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichos cultivos de células vegetales se obtienen tomando tejido vegetal de plantas, induciendo la formación de callos a partir de dicho tejido sobre un sustrato sólido, y preparando cultivos líquidos a partir de ellos.
3. Uso no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha etapa c) de separar la parte sólida de la parte líquida del homogeneizado se realiza mediante centrifugación.
4. Uso no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho al menos un extracto comprende además dicho extracto hidrosoluble obtenido mediante el proceso definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Uso no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho al menos un extracto comprende además dicho extracto liposoluble obtenido mediante el proceso definido en las reivindicaciones 1 a 3.
6. Uso no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho al menos un extracto comprende además dicho extracto hidrosoluble y dicho extracto rico en péptidos y azúcares.
7. Una composición que comprende un extracto hidrosoluble, un extracto liposoluble y un extracto rico en péptidos y azúcares obtenidos mediante el proceso definido en las reivindicaciones 1 a 3.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, que contiene, por 1 parte en peso de dicho extracto hidrosoluble, de 0,01 a 100, preferentemente 1, partes en peso de dicho extracto liposoluble e, independientemente, de 0,01 a 100, preferentemente 0,1, partes en peso de dicho extracto rico en péptidos y azúcares.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, que contiene, por 1 parte en peso de dicho extracto hidrosoluble, 1 parte en peso de dicho extracto liposoluble y 0,1 partes en peso de dicho extracto rico en péptidos y azúcares.
10. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende además al menos un disolvente hidrófilo seleccionado del grupo que comprende agua, soluciones salinas acuosas o disolventes orgánicos, preferentemente aceites, alcoholes, glicerol, ácidos orgánicos, amidas, aminas, aldehídos y cetonas.
11. Uso no terapéutico de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 para el tratamiento de imperfecciones relacionadas con el envejecimiento de la piel y para inducir un efecto de rejuvenecimiento en el tejido cutáneo.
12. Una formulación cosmética que comprende un extracto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 7 o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 y un vehículo cosméticamente aceptable.

Fig. 1



Un cultivo celular enriquecido  
de embriones somáticos  
de *Lotus japonicus*

Un cultivo celular en suspensión  
de *Lotus japonicus*

Fig. 2

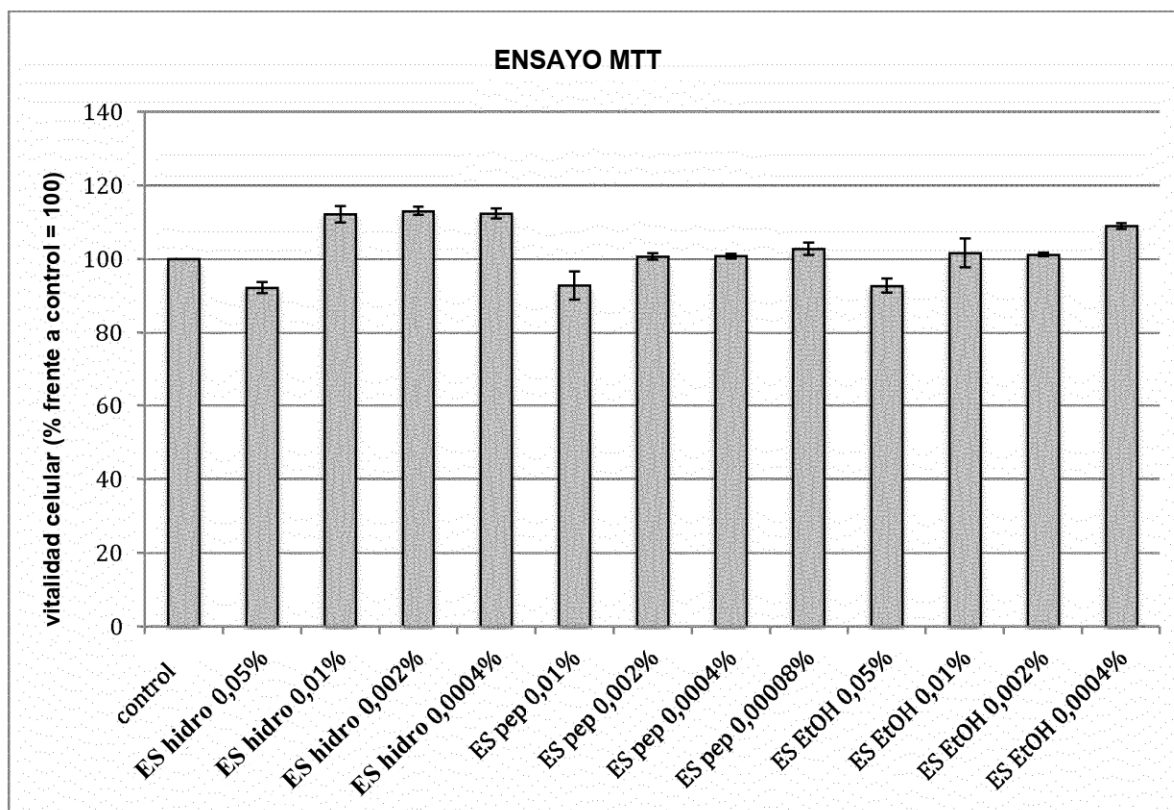


Fig. 3

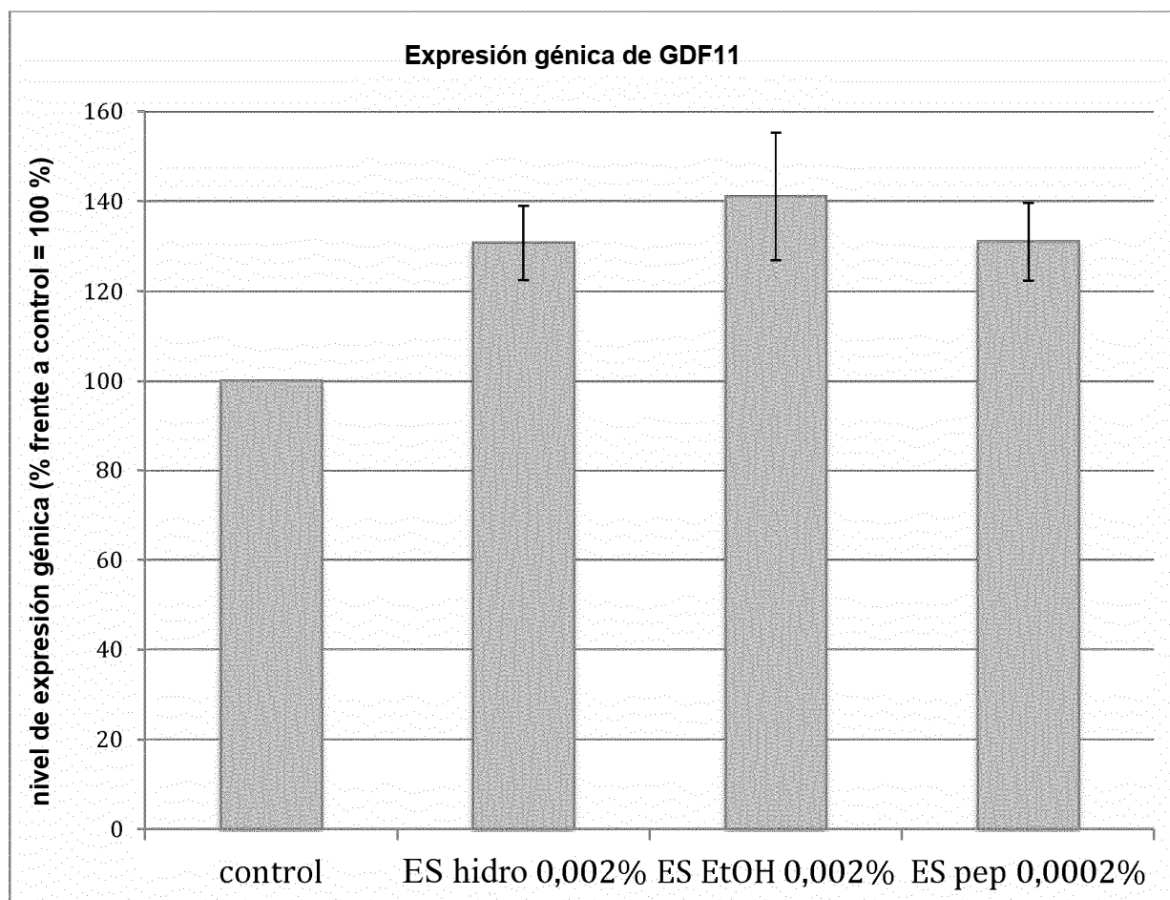


Fig. 4

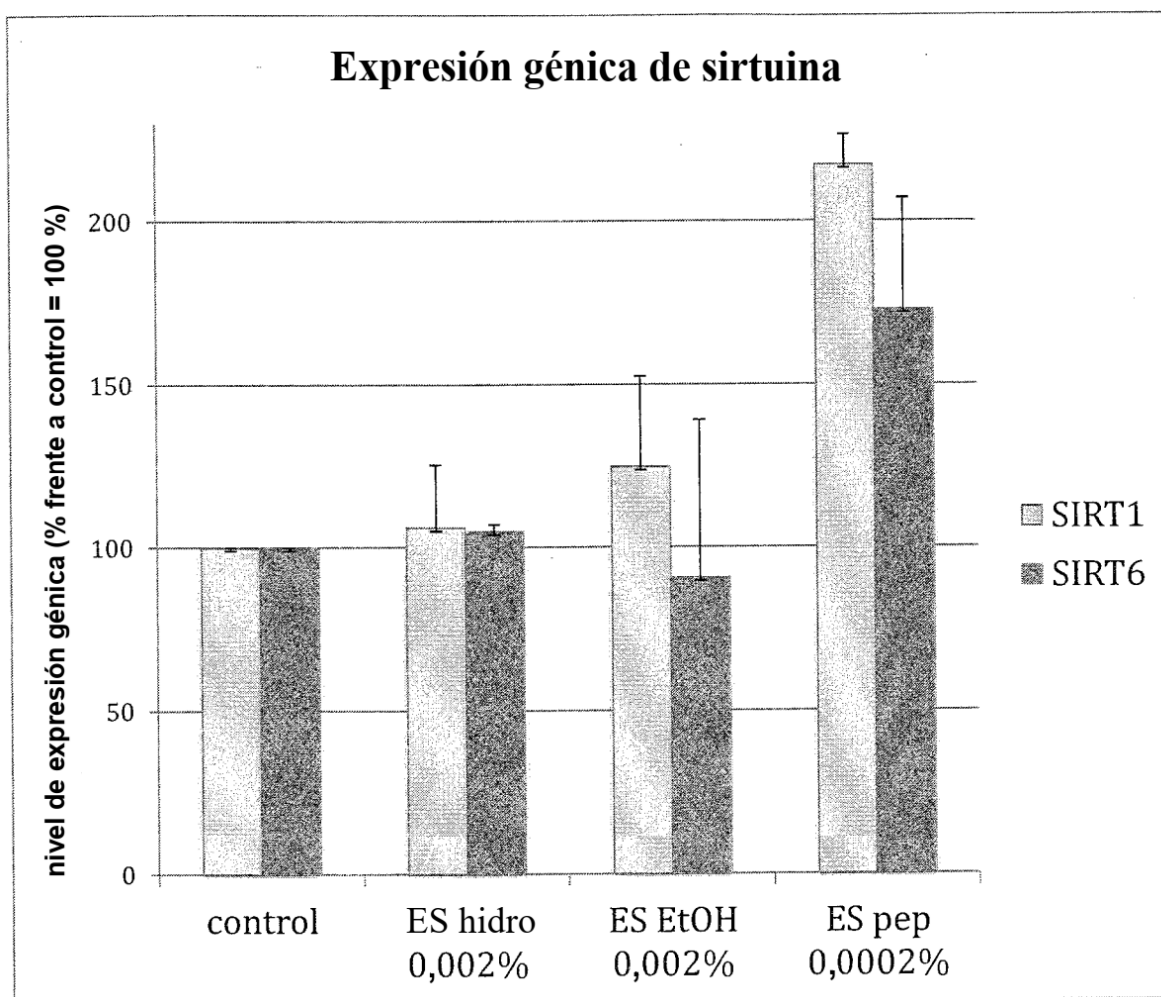


Fig. 5

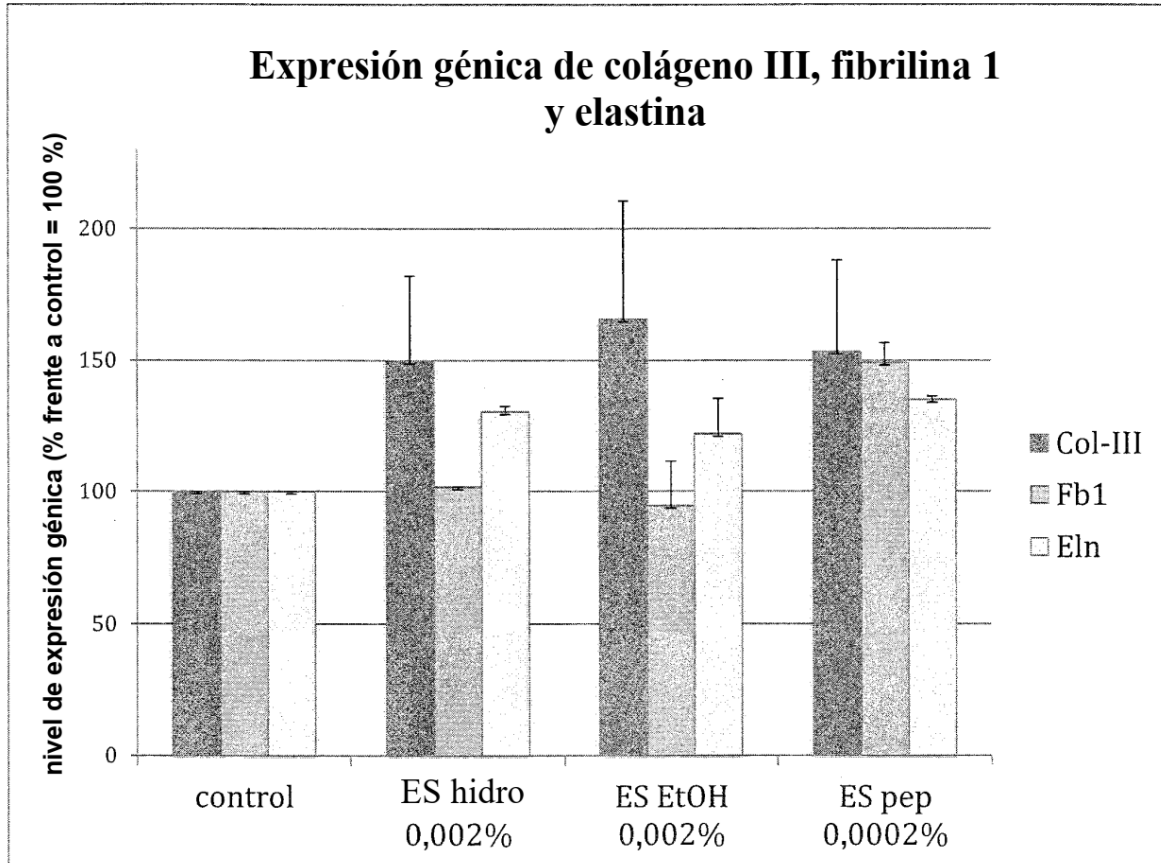


Fig. 6

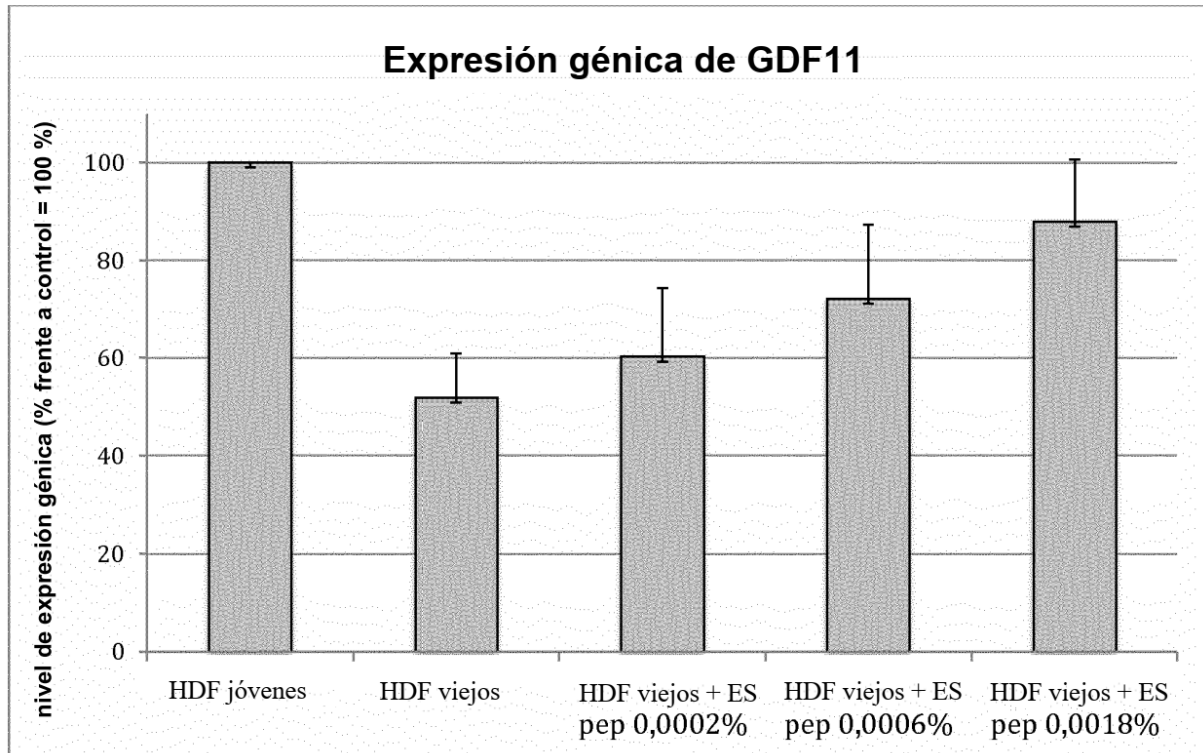


Fig. 7

