

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/160232 A1

(43) Fecha de publicación internacional
29 de noviembre de 2012 (29.11.2012) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 9/133 (2006.01) A61K 36/31 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2012/070366

(22) Fecha de presentación internacional:

22 de mayo de 2012 (22.05.2012)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201130830 23 de mayo de 2011 (23.05.2011) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):

CARVAJAL ALCARAZ, Micaela [ES/ES]; Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Campus Universitario de Espinardo, E-30100 Espinardo (Murcia) (ES). GARCÍA VIGUERA, Cristina [ES/ES]; Centro de

Edafología y Biología Aplicada del Segura, Campus Universitario de Espinardo, E-30100 Espinardo (Murcia) (ES). MORENO FERNÁNDEZ, Diego Ángel [ES/ES]; Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Campus Universitario de Espinardo, E-30100 Espinardo (Murcia) (ES). MARTÍNEZ BALLESTA, María del Carmen [ES/ES]; Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Campus Universitario de Espinardo, E-30100 Espinardo (Murcia) (ES).

(74) Mandatario: UNGRIA LÓPEZ, Javier; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING PLASMA MEMBRANE VESICLES EXTRACTED FROM PLANTS ENRICHED IN MEMBRANE TRANSPORT PROTEINS, AND USES THEREOF

(54) Título : PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y USOS DE VESÍCULAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA EXTRAÍDAS DE PLANTAS ENRIQUECIDAS EN PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE MEMBRANA

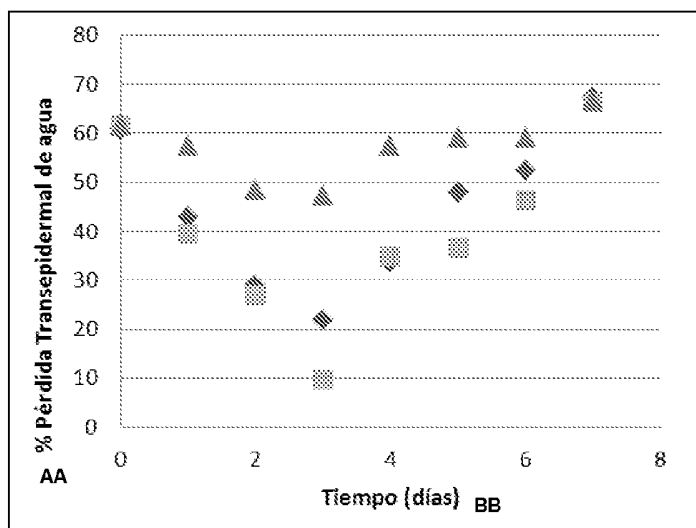


Fig. 2.

AA Transepidermal Water Loss %
BB Time (days)

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining membrane vesicles enriched in membrane transport proteins of plant origin, for cosmetic or therapeutic use, which can contain other substances, such as natural bioactive compounds. Preferably, said vesicles are obtained from plants of the Brassicaceae (cruciferae) family. In addition, the invention relates to a method for increasing these proteins of plant origin.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un método de obtención de vesículas de membrana enriquecidas en proteínas transportadoras de membrana de origen vegetal para su uso cosmético o terapéutico, que pueden contener a su vez otras sustancias como son compuestos bioactivos naturales. Preferiblemente se obtienen en vegetales, a partir de la familia Brassicaceae (crucíferas). Además, la presente invención también se refiere a un procedimiento para el incremento de estas proteínas de origen vegetal.

WO 2012/160232 A1



(84) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

Procedimiento de obtención y usos de vesículas de membrana plasmática extraídas de plantas enriquecidas en proteínas transportadoras de membrana

SECTOR DE LA TÉCNICA

5 La presente invención se enmarca dentro de los sectores de química y farmacia, y concretamente se refiere a vesículas de membrana plasmática de origen natural enriquecidas en proteínas intrínsecas de membrana capaces de ser aplicadas con fines dermatológicos, farmacológicos o terapéuticos.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA

En células animales, las proteínas de membrana plasmática (MP) representan un punto estratégico para una posible intervención terapéutica, haciendo de las proteínas de membrana objetivos diana para fármacos, en investigación contra el cáncer, por ejemplo (Harvey et al., 2001). En células vegetales, los procesos de señalización que controlan las respuestas a estreses abióticos y bióticos ocurren también a nivel de MP. De hecho, tanto en células animales como vegetales, la MP controla numerosas funciones primarias tales como el transporte de metabolitos e iones, endocitosis, proliferación celular...etc. Todos estos procesos implican una gran diversidad de proteínas altamente variables en cuanto a estructura y función.

20 Esta enorme variabilidad en la naturaleza de las proteínas de membrana, ha hecho que el número de procesos de extracción de las mismas sea a la vez extenso y específico. Así, además del amplio rango de pesos moleculares y puntos isoeléctricos, las proteínas difieren en su naturaleza hidrofóbica, en el caso de proteínas intrínsecas, y en la variabilidad de su contenido de lípidos, lo que hace que no siempre sean fáciles de extraer y purificar, especialmente proteínas con varios dominios transmembrana inmersos en la fase lipídica de la membrana.

Por tanto, el uso de vesículas de membrana que contengan una proteína de interés capaz de mantener su funcionalidad y propiedades, puede suponer una ventaja adicional en cuanto a su estabilidad y el coste económico de su obtención.

30 Los movimientos de casi todos los solutos a través de la membrana están mediados por proteínas transportadoras de membrana, más o menos especializadas en el transporte de moléculas concretas. Puesto que la diversidad y fisiología de las distintas células de un organismo está relacionada en buena medida con su capacidad

de captar unos u otros elementos externos, se postula que debe existir un acervo de proteínas transportadoras específico para cada tipo celular y para cada momento fisiológico determinado (Lodish et al., 2005); dicha expresión diferencial se encuentra regulada mediante: la transcripción diferencial de los genes codificantes para esas proteínas y su traducción.

Se trata de proteínas transmembrana que poseen multitud de hélices alfa inmersas en la matriz lipídica. Dicha estructura probablemente implique una vía de entrada a través de entornos hidrofílicos proteicos que causarían una disrupción en el medio altamente hidrofóbico constituido por los lípidos (Lodish et al., 2005). Las proteínas intervienen de diversas formas en el transporte: actúan tanto como bombas impulsadas por ATP, esto es, por energía metabólica, o como canales de difusión facilitada.

Algunas de estas proteínas son capaces de transportar agua, iones y pequeños solutos a su través, tales como glicerol y urea, ambos agentes higroscópicos ampliamente usados en cosmética.

Un problema adicional en la extracción de proteínas integrales de membrana es el hecho de que éstas son constituyentes minoritarios comparado con otras proteínas solubles celulares. Hasta la fecha se ha conseguido extraer estas proteínas funcionales cuando se encuentran insertadas en la bicapa lipídica. Se ha conseguido obtener proteínas hidrofóbicas de las fracciones de membrana plasmática con un mayor rendimiento modificando el método de extracción (Gerbeau et al., 2002). Sin embargo, un método estimulador (también denominado “elicitador”) de las proteínas intrínsecas combinado con un adecuado protocolo de extracción de vesículas de membrana plasmática, incrementa el rendimiento de vesículas que contienen proteínas de membrana de origen vegetal.

Durante mucho tiempo los liposomas se han considerado como la mayor contribución innovadora en dermatología con fines farmacéuticos y cosméticos. Sin embargo, debido a su alto coste, la pureza variable de sus fosfolípidos y su naturaleza inestable, los surfactantes que contengan vesículas suponen una ventajosa alternativa. Además, estas vesículas contienen proteínas de membrana intrínsecas capaces de actuar como transportadores de ciertas sustancias.

Algunas de las sustancias terapéuticas y cosméticas que se han empleado en sistemas transportadores son:

Nombre del agente terapéutico	Categoría Terapéutica	Referencia
Levonorgestrel	Agente anticonceptivo	Jain NK et al., 1998
Flurbiprofeno	Antiinflamatorio no esteroideo (AINE)	Mokhtar et al., 2008
Captopril	Anti-hipertensivo	Gupta et al., 2007
Estradiol	Hormona femenina	Tsai et al., 2001
Ketorolaco trometamina	AINE	Alsarra et al., 2005
Furosemida	Diurético	Azeem et al., 2008
Losartán potásico	Antihipertensivo	Thakur et al., 2009
Maleato de clorfeniramina	Antihistamínico	Varshosaz et al., 2005
Pseudo-ceramida	Antiarrugas	Iwai et al., 1998
Benzofenona-4 / Metoxicinamato de octilo	Agente protector solar	Brinon et al., 1999
Vitamina A	Antioxidante	Cioca et al., 1991

La extracción de vesículas de membrana se obtiene mediante el sistema de polímeros de dos fases (Larsson et al., 1987) que consigue separar la fracción de membrana plasmática del resto de fracción microsomal. Para ello, se procede a la homogenización en frío del tejido y separación en dextrano/polietilenglicol.

Se han empleado hidrolizados peptídicos de origen vegetal: *Brassica napus* (FR2925325), *Triticum monococcum* (FR2925327), *Zea mays* L. (FR2925326), *Triticum turgidum* (FR2925328), *Solanum tuberosum* (FR2925330), *Avena sativa* L. (FR2925329), *Vicia faba* L. (FR2925331), capaces de activar la síntesis de acuaporinas presentes en la epidermis humana (AQP3 fundamentalmente), bien solos o en combinación con otros ingredientes activos. AQP3 está presente en la membrana

plasmática de los queratinocitos de la epidermis (Sougrat et al., 2002) y desempeña un importante papel en el control del flujo de agua a través de la piel. Así, estas acuaporinas son capaces de transportar glicerol el cual a su vez está involucrado en la constitución de la película hidrolipídica que permite mantener la flexibilidad y cualidades sensoriales del estrato córneo. La hidratación y el contenido de AQP3 en queratinocitos están relacionados y un incremento de AQP3 en la piel supone una mejora de la hidratación de la epidermis (Dumas et al., 2007).

Sin embargo, el reciente descubrimiento de que células del carcinoma de piel en humanos sobre-expresan altamente acuaporinas AQP3 (Hara-Chikuma and Verkman 2008b) sugiere ser cautos en el uso de moduladores de la expresión de acuaporinas para promover la hidratación de la piel.

Una alternativa al empleo de ingredientes capaces de activar la síntesis de acuaporinas sería el uso de vesículas de origen natural enriquecidas en no sólo en acuaporinas sino en otras proteínas de membrana que se emplearían como vehículo lipídico en la liberación de agua u otras sustancias en la epidermis.

Las acuaporinas también se han incorporado en formulaciones cosméticas (FR20010013463), determinando la fórmula galénica de uso tópico en forma de solución acuosa u oleosa. Sin embargo, el uso de vesículas de membrana de origen natural (vegetal) que incluyan además de estas otras proteínas transportadoras de membrana y compuestos bioactivos o agentes hidratantes, no se ha incluido en dicha formulación, y que constituye la base de esta invención.

La familia *Brassicaceae* (también llamada *Cruciferae* o familia de las crucíferas) contiene hasta 3500 especies vegetales. Numerosos estudios epidemiológicos indican que las crucíferas entre ellas el brócoli (*Brassica oleracea*), son una fuente rica de compuestos bioactivos del metabolismo secundario ricos en nitrógeno-azufre, glucosinolatos, así como de antioxidantes naturales fenólicos (flavonoides, antocianos, ácidos fenólicos), vitaminas (C, E, A, K, etc.) y minerales esenciales (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, hierro, manganeso, magnesio, zinc, cobre, selenio etc.) (Fahey et al. 2001; Moreno et al. 2006)

Los componentes vegetales se emplean también en la industria cosmética, por ejemplo, el empleo de extractos de brotes o germinados de diferentes frutos, bayas y crucíferas, incluyendo el brócoli, con aplicaciones en lociones, cremas de masajes, cremas nutritivas, geles, para inhibir el envejecimiento, para la detoxificación de la

piel o en relación al tratamiento de enfermedades asociadas a la piel (US2009/0306219). También se utilizan los vegetales y sus compuestos bioactivos, incluyendo el brócoli, como aditivos en formulaciones anti-envejecimiento, donde en algunos casos suponen del 0.1 al 10% en peso de extractos vegetales incorporados en polvos sólidos, píldoras, cápsulas o precipitados oleosos (US 2009/0324522).

Algunos de estos compuestos bioactivos se pueden incorporar en vesículas lipídicas para su posterior liberación en la epidermis.

REFERENCIAS

- 10 Dumas et al. 2007. *J. Drugs Dermatol.*, (6 Suppl):s20-4.
- Fahey et al. 2001. *Phytochemistry* 56, 5-51.
- Gerbeau et al. 2002. *Plant J.* 30, 71-8.
- Hara-Chikuma and Verkman. 2008b. *Molecular and Cellular Biology* 28, 326-332.
- Harvey et al. 2001. *Physiol. Genomics* 5, 129-136.
- 15 Larsson et al. 1987. *Methods Enzymol.* 148, 558-568.
- Lodish et al. 2005. *Biología celular y molecular*. Buenos Aires: Médica Panamericana. ISBN 950-06-1974-3
- Moreno et al. 2006. *J. Pharmaceutical Biomedical Analysis* 41:1508-1522
- Sougrat et al. 2002. *J. Invest. Dermatol.* 118,678-85.
- 20 Jain NK, Khopade AJ, Vora B. *J Control Release* 1998, 54, 149-165.
- Mokhtar M, Sammour OA, Hammad MA, Megrab NA. *Int J Pharm* 2008 361, 104-111.
- Gupta A, Prajapati SK, Balamurugan M, Singh M, Bhatia D.. *Trop J Pharm Res* 2007, 6, 687-693.
- 25 Tsai YH, Fang JY, Yu SY, Wu PC, Huang YB. *Int J Pharm* 2001, 215, 91-99.
- Alsarra IA, Bosela AA, Ahmed SM, Mahrous GM. *Eur J Pharm Biopharm* 2005, 59, 485-490.
- Azeem A, Jain N, Iqbal Z, Ahmad FJ, Aqil M, Talegaonkar S. *Pharm Dev Technol* 2008, 13, 155-163.
- 30 Thakur R, Anwer MK, Shams MS, Ali A, Khar RK, Shakeel F, Taha. *J Drug Target* 2009, 17, 442-449.
- Varshosaz J, Pardakhty A, Mohsen S, Baharanchi H. *Drug Deliv* 2005, 12, 75-82.
- Iwai H, Fukasava J, Suzuki T. *Int J Cosmet Sci* 1998, 20(2), 87-102.

Brinon L, Geiger S, Alard V, Doucet J, Tranchant JF, Couarraze G. J Control release. 1999, 60, 67-76.

Cioca, G., James, A.H., Manuel, L.T., Herstein, M., Walter, P.: US4999348 (1991).

5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de vesículas de membrana plasmática a partir de material vegetal (procedente de una *brassica*) enriquecido en acuaporinas y otras proteínas transportadoras de membrana, y que pueden contener a su vez otras sustancias como son compuestos bioactivos naturales, agentes higroscópicos o químicos con fines dermatológicos, farmacológicos y terapéuticos.

Un primer aspecto de la invención hace referencia a una metodología para aumentar la cantidad de proteínas intrínsecas de membrana asociadas con la permeabilidad al agua y solutos de la membrana en el producto de origen vegetal.

Un segundo aspecto hace referencia a las vesículas de membrana obtenidas según la metodología anterior, que comprende una cantidad efectiva de proteínas de membrana para su aplicación en los diferentes campos.

Un tercer aspecto hace referencia a los campos de aplicación de las vesículas de membrana plasmática que permitan la liberación de agua u otras sustancias en la epidermis.

En concreto, en un primer aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de vesículas de membrana plasmática de origen vegetal enriquecidas en proteínas transportadoras intrínsecas de membrana caracterizado porque comprende:

- una primera etapa de estimulación (o elicitación), que comprende someter a un organismo vegetal a un proceso de estrés abiótico combinado con la aplicación de un compuesto bioactivo,

- una segunda etapa, que comprende extraer vesículas de membrana.

En adelante el procedimiento de enriquecimiento de acuaporinas y otras proteínas transportadoras de membrana en las vesículas de origen vegetal se denominará "procedimiento de la invención".

Preferiblemente el procedimiento de la invención comprende un método de estimulación que supone un incremento de proteínas de membrana en la planta completa, o en fragmentos de la misma, que pueden ser hojas, tallo, raíz e inflorescencia las cuales se usarán como material vegetal de partida para la extracción
5 de vesículas de membrana o cualquiera de sus posibles combinaciones.

Así, la extracción de vesículas puede obtenerse de plantas enteras o fragmentos de las mismas, seleccionadas entre raíz, tallo, hoja, inflorescencia o combinaciones de las mismas, de diferentes vegetales y hortalizas, preferiblemente la familia *Brassicaceae* (también denominada *Cruciferae*), la familia de las crucíferas, más
10 preferiblemente *Brassica spp.* Por lo que una realización preferida es el procedimiento de la invención donde el vegetal es una planta de la familia *Brassicaceae*. Los vegetales son seleccionados entre nabo, berro, rábano, colirrábano, col, coles lombardas (también llamadas coles rojas), rutabagas, coles de Bruselas, mostazas, repollo, diferentes variedades de brócoli (brocolini, brócoli o brécol, brócoli
15 romanesco, brócoli blanco, brócoli morado o lila, etc.), así como de otras plantas hortícolas como berza, grelos, acelgas, escarola, espinaca, remolacha, lechuga, salvia, cebolla, o ajo. Más preferiblemente, la planta es seleccionada dentro del grupo compuesto por: nabo, berro, rábano, colirrábano, col, coles lombardas, rutabagas, coles de Bruselas, mostazas, repollo, berza, grelos, lechuga, espinaca, acelgas,
20 escarola, salvia, cebolla y ajo. En una realización aún más preferida, el vegetal es brócoli.

En la presente invención se entiende “brócoli”, también llamado brécol o bróculi, como cualquier variedad de *Brassica oleracea* crecida en un medio rico en minerales y en condiciones agronómicas controladas que favorezcan un incremento de
25 la expresión de acuaporinas intrínsecas.

El procedimiento de la invención comprende la estimulación a través de un compuesto bioactivo, bien una vitamina, un compuesto fenólico, un glucosinolato, un extracto enriquecido en al menos uno de estos compuestos o la combinación de al menos dos de ellos. En una realización preferida, la aplicación de dicho compuesto
30 bioactivo varía entre 1 y 78 horas, incluidos ambos límites. Más preferiblemente, la aplicación se realiza en el agua de riego en concentraciones comprendidas entre 5 y 100 μM , incluidos ambos límites.

Además, de manera conjunta a la aplicación del compuesto bioactivo, la planta se somete a un proceso de estrés abiótico, de manera preferible variando la Conductividad Eléctrica (CE) del agua de riego, que comprende regar a dicha planta con una disolución de riego a la que se adiciona una sustancia de choque osmótico, y
5 cuya temperatura está más preferiblemente comprendida entre 15 y 35 °C, incluidos ambos límites. Dicho de otro modo, el compuesto bioactivo se aplica además variando previamente la Conductividad Eléctrica del agua de riego del cultivo, pudiendo oscilar entre 0.5 y 6 dS m⁻¹, incluidos ambos límites, tras la adición de una sustancia de choque osmótico en concentración mM, preferiblemente en una concentración
10 comprendida entre 10 y 80 mM, combinada con una variación de la temperatura en las cubas de riego, de manera preferida entre 0 y 10 °C en torno a la temperatura ambiental media de 25 °C, pues la conductividad eléctrica de una disolución aumenta aproximadamente un 2 % por cada grado que se eleva su temperatura. En una realización preferida la sustancia de choque osmótico que se adiciona es seleccionada
15 entre: CaCl₂, NaCl, KCl, Na₂SO₄, K₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, KNO₃, NH₄NO₃, Mg(NO₃)₂, Ca(NO₃)₂, KH₂PO₄, NH₄H₂PO₄, manitol, sorbitol, polietilenglicol y combinaciones de los mismos.

El proceso de extracción de vesículas se basó en la técnica de Larsson et al., 1987, que se incorpora como referencia en esta memoria. Sin embargo, en la
20 metodología se incluyeron algunas modificaciones que hacen que el proceso se pueda escalar a nivel industrial, pues se abaratan los costes y se acorta el tiempo de extracción. Así, en lugar de filtración al vacío y homogenización manual se empleó un sistema de homogeneizado con un homogeneizador mecánico automático en frío (4-10°C) tipo politrón o batidora mecánica (Thermomix) con diferentes combinaciones
25 de velocidad y tiempo. En otras palabras, esto quiere decir que la segunda etapa del procedimiento de la invención, referida a la extracción de vesículas de membrana, comprende al menos una etapa de homogeneizado con un homogeneizador mecánico automático. La velocidad de homogeneizado varió de 0 a 5000 rpm, con una etapa inicial de entre 0 y 1 min y una velocidad de 1000-4000 rpm y una segunda etapa de
30 homogeneizado entre 0 y 25 s con una velocidad de entre 3000-5000 rpm. Se realizaron también modificaciones en el tampón de conservación eliminando compuestos que pudieran resultar tóxicos o perjudiciales para la salud humana, como por ejemplo el tampón PIPES que se absorbe a través de la piel y que aparece descrito en el método

de extracción publicado, y se sustituyó por otro tampón de entre los siguientes: tampón bicarbonato, tampón fosfato y tampón acetato a la misma concentración y pH. Por tanto, el procedimiento de extracción de vesículas de membrana según la invención, comprende resuspender las vesículas extraídas en un tampón de
5 conservación seleccionado entre tampón fosfato, tampón bicarbonato y tampón acetato.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a las vesículas de membrana obtenidas según las condiciones anteriormente descritas que comprende una cantidad
10 efectiva de proteínas transportadoras de membrana.

En la presente invención se entiende como “cantidad efectiva” a la cantidad de proteínas de membrana suficiente en las vesículas obtenidas mediante el procedimiento de la invención para que sean eficaces a nivel de hidratación/aplicación sanitaria tanto para humanos como para animales, y sean aplicables con fines
15 dermatológicos, farmacológicos o terapéuticos.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso de vesículas de membrana enriquecidas en proteínas transportadoras de membrana a nivel de explotación comercial, ya que pueden ser un medio natural de liberación bien de agua,
20 sustancias bioactivas, agentes higroscópicos, sales u otras sustancias químicas tales como antibióticos o cualquier formulación con fines cosméticos o terapéuticos. Es decir, estas vesículas pueden ser aplicadas con fines dermatológicos, farmacológicos o terapéuticos incorporando en su interior además sustancias adicionales, preferentemente un compuesto bioactivo natural, un agente higroscópico, un agente
25 químico o combinaciones de ellos.

En el tratamiento de un proceso fisiopatológico, es deseable que la administración de medicamentos se realice de forma que el fármaco alcance su lugar de actuación a una determinada concentración. Se han empleado como vectores de fármacos lipoproteínas y glucoproteínas entre otros, que poseen la ventaja de ser
30 biodegradables y endocitables.

Los liposomas son vesículas microscópicas constituídas por bicapas fosfolipídicas concéntricas con compartimentos acuosos que tienen la capacidad de captar una gran variedad de sustancias activas hidrosolubles, liposolubles o anfífilas.

Esta invención hace referencia pues al uso de vesículas de membrana plasmática de origen vegetal como sistema de transporte o vectores de determinadas sustancias para su aplicación tópica y terapéutica.

5 Estas vesículas de membranas contienen proteínas transportadoras de membrana en su estructura permitiendo la liberación de agua, iones y otras sustancias como amoníaco, azúcares de bajo peso molecular, glucosinolatos, urea y glicerol (agentes hidratantes) capaces de ser transportados por las proteínas de membrana y por tanto de ser empleadas en formulaciones cosméticas o dermatológicas con fines hidratantes o en la cura de suturas, quemaduras y otras heridas.

10 Así mismo la invención hace referencia al uso de vesículas de membrana que contienen sustancias bioactivas de origen vegetal, (bien vitamina C, glucosinolatos, o compuestos fenólicos) con capacidad antioxidante para emplearlas en formulaciones cosméticas.

15 Otro aspecto de la invención se refiere a una vesícula obtenible mediante el procedimiento de la invención que comprende una cantidad efectiva de proteínas transportadoras intrínsecas de membrana como vehículo y estabilizador de al menos un compuesto bioactivo en una formulación líquida o bebida (como por ejemplo un alimento líquido tipo lácteos o zumos). En la presente invención se ha comprobado
20 que las vesículas obtenidas siguiendo el procedimiento de la invención permiten aumentar la estabilidad de compuestos bioactivos, tales como los glucosinolatos, en formulaciones líquidas, como demuestra el ejemplo 5.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 **Figura 1.** Inmunodetección mediante Western blot. Se muestra la intensidad de la señal obtenida para una proteína control de membrana plasmática (aquaporinas) en el material vegetal sin estimular (control) y el material vegetal expuesto al método de estimulación (elicitación) de la invención.

30 **Figura 2.** Comparativa del efecto hidratante de vesículas con y sin agente higroscópico. La concentración de proteína de membrana plasmática presente en vesículas para la aplicación fue de $2 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. ☼ Aplicación de vesículas con agente higroscópico; ♦ Aplicación de vesículas sin agente higroscópico; ≡ Aplicación directa sin vesículas del agente higroscópico.

- Figura 3.** Estabilidad de los glucosinolatos totales en vesículas de membrana plasmática obtenidas de raíz y hoja de brócoli (n=3).
- Figura 4.** Funcionalidad de vesículas de membrana plasmática obtenidas de raíz de brócoli en una formulación cosmética. Las medidas se realizaron a los 5 días, 1 mes y 5
seis meses de realizar la muestra.
- Figura 5.** Representación esquemática del ensayo de cicatrización mediante raspado sobre tapiz celular. 1: Realización de un raspado uniforme en un tapiz celular para crear un espacio vacío carente de células. 2: Migración de las células hacia el espacio vacío generado en 1. 3: Invasión celular del espacio vacío generado en 1.
- 10 **Figura 6.** Evolución del ensayo de cicatrización celular en un tapiz de queratinocitos humanos (HaCaT) incubados en presencia de vesículas con glucosinatos. Imágenes tomadas después de eliminar el inserto del tapiz celular y transcurridas 0 horas (imagen izquierda), 8 horas (imagen central) y 16 horas (imagen derecha) de incubación en presencia de dichas vesículas con glucosinatos.
- 15 **Figura 7.** Representación gráfica del área de ocupación celular de una calle carente de células en un tapiz de queratinocitos humanos (HaCaT) en función del tiempo de incubación del tapiz (en horas) en presencia de vesículas con glucosinatos. La pendiente de la línea recta indica la velocidad de ocupación de área expresada en $\mu\text{m}^2/\text{hora}$.
- 20 **Figura 8.** Comparación del crecimiento de las células HaCaT sin adición de vesículas y con vesículas de membrana plasmática obtenidas de raíz (n=3).
- Figura 9.** Porcentaje de supervivencia de queratinocitos humanos (HaCaT) tratados con una dosis de UVB de 800 J/m^2 en presencia de diferentes concentraciones de vesículas conteniendo glucosinolatos e incubados por un periodo de 72 h. Se observa
25 una protección de las células que es dependiente de la dosis utilizada de extracto.
- Figura 10.** Citotoxicidad de las células B16 de disoluciones de glucosinolatos en el sobrenadante de la mezcla de vesículas de membrana plasmática obtenidas de raíz y hoja de brócoli comparado con las vesículas que contienen los glucosinolatos (n=3).

30 EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se incluyen a título ilustrativo de la preparación y aplicaciones de las vesículas de la presente invención y de ningún modo debe interpretarse como limitantes del campo de aplicación.

EJEMPLO 1: Procedimiento de estimulación de proteínas de membrana de origen vegetal (Fig 1)

El procedimiento de la invención comprende la estimulación a través de un compuesto bioactivo, un glucosinolato de la familia de los alifáticos, como la sinigrina, que se adicionó a la concentración de hasta 50 μM durante 24 horas en el agua de riego, sobre un cultivo de brócoli. Este compuesto se aplicó además variando previamente la Conductividad Eléctrica (CE) del agua de riego del cultivo que se incrementó hasta 6 dS m^{-1} tras la adición de una sustancia de choque osmótico como es KCl hasta la concentración de 40 mM. La extracción de proteínas se hizo de forma automática partiendo de hoja (20 g), y empleando un politrón con una etapa inicial de homogenizado de 15 segundos a 4000 rpm y una segunda etapa de 20 segundos a 5000 rpm.

El tampón de extracción contenía HEPES 50 mM y manitol 0.5 M (pH 7.5), a esta disolución se le adicionó posteriormente ditioneitol (DTT) 1 mM, ácido ascórbico 5 mM y polivinilpirrolidona (PVP) insoluble 0.6% (p/v) glicerol 10% y β -glicerofosfato 5 mM. El homogenado se centrifugó a 10.000 g durante 20 minutos en frío a 4°C y el sobrenadante se recolectó y se volvió a centrifugar a 55.000 g durante 35 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en tampón de resuspensión (manitol 0.3 M en tampón bicarbonato 5 mM pH 7.0 – 8.0)

La suspensión se adicionó a un sistema de polímeros de doble fase con una composición final de Dextrano T500 (p/v) (Pharmacia), 6.0 % (p/v) de polietilenglicol (PEG) 3.350 (Sigma) 6.0 % (p/v), KCl 3 mM, tampón fosfato 5 mM (pH 7.8) y manitol o sacarosa 0.33 M. El sistema de fases se centrifugó a 4.000 g durante 5 minutos a 4°C. La fase superior es donde se recoge la membrana plasmática para diluirla en un nuevo tampón. En el tampón de conservación tampón bicarbonato 10 mM a pH 8.3 con sacarosa 0.33 M.

EJEMPLO 2. Rendimiento de la extracción del cultivo de *Brassica*

Se valoró el rendimiento de la extracción de vesículas de membrana plasmática para *Brassica* con respecto a otras plantas

En la tabla1 se puede apreciar el contenido proteico de las vesículas de membrana para distintos vegetales. El cultivo de *Brassica* después de la estimulación resultó en mayor cantidad de proteína de membrana plasmática. En la tabla se indica

la cantidad de proteína expresada en $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. El rendimiento del proceso es más alto que el obtenido para el resto de los cultivos incluso para las vesículas aisladas de *Beta vulgaris* ya que la cantidad de material vegetal de partida era mayor. Además, teniendo en cuenta que la extracción mecánica supone una pérdida de rendimiento, los valores de proteína siguen estando por encima de la mayoría de los cultivos aplicando una metodología posible de escalar a nivel industrial.

Tabla 1. Comparativa de la concentración de proteína de membrana plasmática presente en vesículas de membrana en vegetales y objeto de la invención*. La concentración se obtuvo después de estimular la planta y empleando extracción mecánica.

	<i>Capsicum annuum</i>	<i>Lycopersicum esculentum</i>	<i>Zea mays</i>	<i>Beta vulgaris</i>	<i>Brassica oleracea</i>	* <i>Brassica oleracea</i> + estimulación
Material vegetal de partida (g)	18	25	18	150	20	20
Homogeneización	manual	manual	manual	manual	manual	mecánica
Proteína de membrana plasmática ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	1.32	1.98	2.79	9.16	3.06	3.51-5.0

En la tabla 2 se puede apreciar un listado de proteínas de membrana identificadas mediante HPLC-MS-MS en *Brassica oleracea* var *Italica*.

Tabla 2. Proteínas transportadoras de membrana plasmática identificadas en vesículas de membrana en *Brassica oleracea* var *Italica* tras la digestión con 3 diferentes endoproteasas

20 Digestión con Tripsina

Número de acceso	#AAs	P.M[Da]	calc. pl	Descripción	Σ cobertura
A5DXI9	362	41667,20	5,26	Proteína Actina regulatoria del citoesqueleto-END3 OS=Lodderomyces elongisporus GN=END3 PE=3 SV=1 - [END3_LODEL]	3,87
P92935	618	67485,82	9,48	ADP,ATP proteína transportadora 2, cloroplastidica OS=Arabidopsis thaliana	1,94

				GN=AATP2 PE=1 SV=2 - [TLC2_ARATH]	
P61837	286	30668,98	9,01	Aquaporina PIP1-1 OS=Arabidopsis thaliana GN=PIP1-1 PE=1 SV=1 - [PIP11_ARATH]	16,08
Q06611	286	30578,01	9,03	Aquaporina PIP1-2 OS=Arabidopsis thaliana GN=PIP1-2 PE=1 SV=1 - [PIP12_ARATH]	9,79
P30302	285	30409,69	7,84	Aquaporina PIP2-3 OS=Arabidopsis thaliana GN=PIP2-3 PE=1 SV=1 - [PIP23_ARATH]	3,86
P19456	948	104334,99	6,99	ATPasa 2, membrana plasmática OS=Arabidopsis thaliana GN=AHA2 PE=1 SV=2 - [PMA2_ARATH]	4,64
Q42556	954	105141,76	6,39	ATPasa 9, tipo membrana plasmática OS=Arabidopsis thaliana GN=AHA9 PE=2 SV=2 - [PMA9_ARATH]	2,41
O80899	757	84206,29	7,21	Celulosa sintasa B2 OS=Arabidopsis thaliana GN=CSLB2 PE=2 SV=1 - [CSLB2_ARATH]	1,72
Q9SAE4	490	55969,76	7,99	Citocromo P450 71B29 OS=Arabidopsis thaliana GN=CYP71B29 PE=2 SV=1 - [C71BT_ARATH]	2,65
O65782	499	56809,55	8,37	Citocromo P450 83B1 OS=Arabidopsis thaliana GN=CYP83B1 PE=1 SV=1 - [C83B1_ARATH]	2,40
P0C7R4	658	73842,98	7,68	Repetición Pentapeptídica que contiene la proteína At1g69290 OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g69290 PE=2 SV=1 - [PP110_ARATH]	1,98
P46032	585	64379,59	5,67	Peptido transportador PTR2 OS=Arabidopsis thaliana GN=PTR2 PE=1 SV=1 - [PTR2_ARATH]	2,22
Q8RY89	769	87347,74	8,68	Fosfatidilinositol-4-fosfato 5-kinasa 8 OS=Arabidopsis thaliana GN=PIP5K8 PE=2 SV=1 - [PI5K8_ARATH]	2,60
P83970	951	104618,27	6,81	ATPasa de membrana plasmática OS=Triticum aestivum GN=ha1 PE=2 SV=1 - [PMA1_WHEAT]	2,42
Q9ZVX8	278	29481,38	8,85	Probable aquaporina PIP2-8 OS=Arabidopsis thaliana GN=PIP2-8 PE=2 SV=1 - [PIP28_ARATH]	4,32
O82226	747	85386,45	9,28	Probable nucleótido cíclico unido a canal iónico 6 OS=Arabidopsis thaliana GN=CNGC6 PE=1 SV=2 - [CNGC6_ARATH]	1,87
Q8LGI2	454	49649,88	8,29	Probable sacaropina deshidrogenasa mitocondrial At5g39410 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g39410 PE=1 SV=2 - [SCPDH_ARATH]	2,20
A3LPW2	511	59735,82	8,63	Proteína FYV10 OS=Pichia stipitis GN=FYV10 PE=3 SV=2 - [FYV10_PICST]	1,96
Q9M088	484	52681,84	6,18	Probable glucano endo-1,3-beta-glucosidasa 5 OS=Arabidopsis thaliana GN=At4g31140 PE=1 SV=1 - [E135_ARATH]	2,27
Q944A7	512	56781,73	5,78	Probable serina/treonina-protein kinasa At4g35230 OS=Arabidopsis thaliana GN=At4g35230 PE=1 SV=1 - [Y4523_ARATH]	8,01

Q9FHD7	487	54590,20	6,33	Probable serina/treonina-protein kinasa At5g41260 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g41260 PE=1 SV=1 - [Y5126_ARATH]	3,70
Q96704	349	39206,65	8,46	Proteína asociada a la replicación del virus, del rizado de la hoja de la col GN=AC1 PE=3 SV=2 - [REP_CALCIV]	4,01
P23586	522	57572,98	8,94	Proteína transportadora de azúcares 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=STP1 PE=1 SV=2 - [STP1_ARATH]	2,30
Q9SZN1	487	54270,67	5,15	Subunidad tipo-V de la protón ATPasa OS=Arabidopsis thaliana GN=VHA-B2 PE=2 SV=1 - [VATB2_ARATH]	2,87

Digestión con Glu-C

Número de acceso	#AAs	P.M[Da]	calc. pl	Descripción	Σcobertura
Q43291	164	18641,07	10,46	60S proteína ribosomal L21-1 OS=Arabidopsis thaliana GN=RPL21A PE=2 SV=2 - [RL211_ARATH]	10,37
Q08733	286	30612,94	8,85	Aquaporina PIP1-3 OS=Arabidopsis thaliana GN=PIP1-3 PE=1 SV=1 - [PIP13_ARATH]	3,85
O81108	1014	110368,25	5,68	ATPasa 2 transportadora de calcio, de membrana plasmática tipo OS= <i>Arabidopsis thaliana</i> GN=ACA2 PE=1 SV=1 - [ACA2_ARATH]	1,68
P23980	704	77990,52	8,81	ATPasa 2 de membrana plasmática (Fragmento) OS=Solanum lycopersicum GN=LHA2 PE=3 SV=1 - [PMA2_SOLLC]	1,99
Q8VZU2	304	34203,93	6,44	Sintaxina-132 OS=Arabidopsis thaliana GN=SYP132 PE=1 SV=1 - [SY132_ARATH]	5,59

Digestión con Lys.

Número de acceso	#AAs	P.M[Da]	calc. pl	Descripción	Σcobertura
P42739	76	8535,58	7,25	Ubiquitina OS=Acetabularia cliftonii PE=3 SV=1 - [UBIQ_ACECL]	21,05
P61837	286	30668,98	9,01	Aquaporina PIP1-1 OS=Arabidopsis thaliana GN=PIP1-1 PE=1 SV=1 - [PIP11_ARATH]	16,43
Q08733	286	30612,94	8,85	Aquaporina PIP1-3 OS=Arabidopsis thaliana GN=PIP1-3 PE=1 SV=1 - [PIP13_ARATH]	10,14
Q39571	203	22584,49	6,21	GTP- proteína de unión YPTC1 OS=Chlamydomonas reinhardtii GN=YPTC1 PE=3 SV=1 - [YPTC1_CHLRE]	7,88
Q9SIH4	206	21955,77	8,29	UPF0497 proteína de membrana At2g36100 OS=Arabidopsis thaliana	7,28

				GN=At2g36100 PE=2 SV=1 - [U4979_ARATH]	
Q42962	401	42337,62	5,97	Fosfoglicerato kinasa, citosólica OS=Nicotiana tabacum PE=2 SV=1 - [PGKY_TOBAC]	4,24
P30302	285	30409,69	7,84	Aquaporina PIP2-3 OS=Arabidopsis thaliana GN=PIP2-3 PE=1 SV=1 - [PIP23_ARATH]	3,86
Q944A7	512	56781,73	5,78	Probable serina/threonina-protein kinasa At4g35230 OS=Arabidopsis thaliana GN=At4g35230 PE=1 SV=1 - [Y4523_ARATH]	3,52
Q42479	529	59298,66	6,37	protein kinasa dependiente de calcio 3 OS=Arabidopsis thaliana GN=CPK3 PE=1 SV=1 - [CDPK3_ARATH]	2,84
O48639	521	57219,68	9,01	Probable transportador de membrana plasmática e fosfato inorgánico 1-3 OS=Arabidopsis thaliana GN=PHT1-3 PE=2 SV=1 - [PHT13_ARATH]	2,50
Q43128	947	104748,96	6,43	ATPasa 10, de membrana plasmática tipo OS=Arabidopsis thaliana GN=AHA10 PE=2 SV=2 - [PMA10_ARATH]	1,80
P19456	948	104334,99	6,99	ATPasa 2, de membrana plasmática tipo OS=Arabidopsis thaliana GN=AHA2 PE=1 SV=2 - [PMA2_ARATH]	1,16

EJEMPLO 3. Ensayo de hidratación de las vesículas sobre la piel.

El ensayo se realizó con 5 voluntarios cuya piel tenía valores extremos de pérdida de agua. El proceso se realizó con vesículas puras en concentración de 2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ en tampón de conservación descrito en el ejemplo 1. Se realizó un estudio comparativo de vesículas que contenían un agente higroscópico y sin el agente higroscópico. Se comparó con el agente higroscópico sólo. Las medidas se realizaron cada 24 h sobre la piel de dorso de la mano. El tratamiento cesó al tercer día.

10 EJEMPLO 4. Ensayo de hidratación de la piel con voluntarios.

El ensayo se realizó con 15 voluntarios. La aplicación de las vesículas se realizó sobre la piel de la del rostro en la zona pegada a los ojos. El proceso se realizó con vesículas diluidas en disolución tamponada con pH 6.5 en tampón de conservación descrito en el ejemplo 1 en dos concentraciones diferentes 20 y 0.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. A las vesículas se les añadió un glicerol (0.02%) como agente higroscópico. Las aplicaciones se realizaron 2 veces al día. Se realizaron dos tipos de experimentos,

a tiempos cortos (0 horas, 10 min, 1 hora, 2 horas) y a tiempos largos (0 días, 2 días, 5 días y 7 días).

Los resultados se exponen en las tablas 3 y 4:

- 5 **Tabla 3.** Porcentaje de disminución de pérdida de agua de la piel del rostro después de la aplicación de disolución rica en vesículas extraídas de hoja de brócoli en concentraciones concentrada y diluida (20 y 0.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), expresada en concentración de proteínas y glicerol como agente hidrosκόpico. El experimento se realizó a tiempos cortos y en 15 voluntarios.

		% disminución de la pérdida de agua			
		0 h	10 min	1 h	2 h
Total	Media	100	90,05	84,59	82,12
	± SE		4,34	2,12	2,41
Concentradas	Media	100	91,86	85,00	83,29
	± SE		2,91	2,23	2,39
diluidas	Media	100	88,55	84,25	81,15
	± SE		5,31	2,11	2,48

10

- Tabla 4.** Porcentaje de disminución de pérdida de agua de la piel del rostro después de la aplicación de disolución rica en vesículas extraídas de hoja de brócoli en concentraciones concentrada y diluida (20 y 0.2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), expresada en concentración de proteínas y glicerol como agente hidrosκόpico. El experimento se realizó a tiempos largos y en 15 voluntarios.

		% disminución de la pérdida de agua			
		0 d	2 d	5 d	7 d
Total	Media	100	74,35	64,73	58,72
	± SE		3,17	3,38	3,49
Concentradas	Media	100	77,65	60,63	53,89
	± SE		3,51	3,86	3,06
diluidas	Media	100	71,60	68,14	62,74
	± SE		2,79	2,75	3,55

15

EJEMPLO 5. Estabilidad de glucosinolatos en vesículas

Extractos de vesículas de membrana de raíz y de hoja de plantas de brócoli enriquecidas en proteínas de membrana (0.3 mg ml⁻¹ de proteína), se mezclaron con extracto rico en glucosinolatos obtenido de semillas de brócoli. Se utilizaron semillas de brócoli previamente lavada, desinfectada y secada en estufa, durante 24 horas a 100°C. Las semillas se homogeneizaron con metanol al 70% (v/v) hasta obtener una mezcla semejante a una papilla. Las muestras se calentaron 70°C durante 20 con

agitación. Posteriormente, se centrifugaron (17.500 g a 4 °C) durante 15 minutos y se evaporaron con N₂. Finalmente la muestra se resuspendió en agua ultra pura Milli-Q y se filtró por malla de 0.45 µm (Millex HV13 de polietersulfano, Millipore). La mezcla de vesículas con glucosinolatos se ultracentrifugaron para eliminar los glucosinolatos restantes no incluidos en vesículas. Las vesículas se volvieron a resuspender en el volumen inicial. El control lo constituyeron los sobrenadantes. Los resultados se muestran en la figura 3.

EJEMPLO 6. Estabilidad de vesículas en formulaciones cosméticas.

Una formulación cosmética libre de grasas y constituyente en serum facial basado en disolución de proteoglicanos al 0.1%. Este producto fue la base para la adición de extracto de vesículas de membrana de raíz de brócoli al 0.02 %. El resultado de la estabilidad se determinó midiendo la respuesta de las vesículas al cambio de presión osmótica del medio por el método de stopped-flow light scattering. La cinética de ajuste de volumen de la vesícula en la dispersión de la luz $\lambda_{ex} = 515$ nm a 90 °. Las medidas se realizaron a 20 ° C en un SFM3 espectrofotómetro de stopped flow. Las disoluciones de medida se diluyeron en el mismo medio. El choque hipo-osmótico asociado con dilución membrana inducido una apertura transitoria de vesículas y equilibrado de su interior con la solución extravascular. La K es la constante de la exponencial y está relacionada con la velocidad de deshinchamiento.

Los resultados se exponen en figura 4.

EJEMPLO 7. Baja citotoxicidad en cultivos de queratinocitos humanos (HaCaT). Viabilidad celular mediante el ensayo MTT.

La línea celular HaCaT (procedente de la ATCC, Rockville, MD) se cultivó en medio DMEM con 10 % (v/v) FBS, 1% (v/v) penicilina-estreptomicina (0.1 mg/ml y 100 U/ml respectivamente) en atmósfera humidificada con CO₂ (5% v/v) a 37 °C durante 24 h. Las células fueron tripsinizadas cada tres días siguiendo las recomendaciones del fabricante y sembradas en placas de 96 o 6 pocillos dependiendo del tipo de ensayo a realizar.

El ensayo MTT se utilizó como un método simple, cuantitativo y fiable para determinar la viabilidad celular. El reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) se reduce a cristales de formazano en la mitocondria de las

células viables. Después de incubar las células en presencia de las vesículas con glucosinolatos durante 72 h, las células se lavaron y con tampón PBS y se incubaron con MTT durante 3-4 h a 37 °C y 5 % CO₂. Después se eliminó el medio y se añadieron 100 µl de DMSO por pocillo para disolver los cristales de formazano que son insolubles en agua. Las placas se agitaron durante 15 min y se cuantificó la absorbancia de los pocillos utilizando un lector de placas a 570 nm (SPECTROstar Omega, BMG LabTech GmbH, Offenburg, Germany). No se observó citotoxicidad de los extractos conteniendo vesículas con glucosinolatos hasta una concentración de proteína de 10 mg ml⁻¹.

10

EJEMPLO 8. Ensayo de cicatrización mediante raspado sobre tapiz celular en queratinocitos humanos (Wound healing assay).

El ensayo de cicatrización mediante raspado sobre tapiz celular es una técnica utilizada para determinar polarización celular, remodelaje de la matriz extracelular y migración celular en distintos tipos celulares. El ensayo consiste en realizar un raspado uniforme en un tapiz celular confluyente directamente con un asa o mediante un inserto de dimensiones definidas que impide el crecimiento celular donde se deposita y creando un “pasillo” de aprox. 1 mm ausente de células. La invasión de las células hacia el espacio vacío puede tardar desde varias horas hasta días dependiendo del tipo celular. Mediante una gradilla y un microscopio de campo claro se determina la velocidad con que las células invaden el espacio vacío midiendo el área invadida por unidad de tiempo (se realiza un video de 24h con una periodicidad de fotograma de 15 min) a través de la determinación de la pendiente de dicha curva.

En el ensayo, se preparó una suspensión celular de queratinocitos humanos (HaCaT) de 5 x 10⁵ células/ml y se sembró en placas de 35 mm a una densidad de 35.000 células por pocillo, en pocillos conteniendo los insertos adecuados. Las células se incubaron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen) con 10 % (v/v) FBS, 1% (v/v) penicilina-estreptomicina (0.1 mg/ml y 100 U/ml respectivamente) en atmósfera humidificada con CO₂ (5% v/v) a 37 °C durante 24 h y después se eliminaron los insertos. Se observaron las calles libres de células al microscopio y se determinó la progresión del crecimiento celular durante 24 h, tomando una fotografía cada 15 min (figuras 5 y 6).

Después se representó el área invadida por las células (micras²) con respecto al tiempo, obteniéndose una curva de crecimiento como la de la figura 7. Se comparó la pendiente de la curva obtenida en el control = $2,4 \times 10^5 \mu\text{m}^2/\text{hora}$ (velocidad de ocupación de área) con la pendiente de la curva obtenida en presencia de (0.3 mg ml⁻¹ de proteína) de vesículas con glucosinolatos preparadas como en el ejemplo 3. El resultado obtenido supuso un aumento de la velocidad de ocupación de área en las células que contenían las vesículas de un $11 \pm 1 \%$ (n=3), lo que indica su capacidad cicatrizante.

10 **EJEMPLO 9. Determinación del poder cicatrizante de la piel mediante un ensayo de proliferación de queratinocitos humanos.**

Para la determinación del poder cicatrizante de las células epidérmicas, se realizó un ensayo de proliferación en queratinocitos humanos (HaCaT). Los queratinocitos se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen), pH7.4, suplementado con un 5% de suero bovino fetal Invitrogen), 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de gentamicina y 350 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de fungizona. A los queratinocitos se les añadió vesículas enriquecidas en proteínas de membrana a concentración 0.1% y su proliferación se determinó por MTT.

Los resultados se muestran en la figura 8.

20

EJEMPLO 10. Protección de queratinocitos humanos (HaCaT) frente al daño inducido por la radiación UV.

La línea celular HaCaT (procedente de la ATCC, Rockville, MD) se cultivó en medio DMEM con 10 % (v/v) FBS, 1% (v/v) penicilina-estreptomina (0.1 mg/ml y 100 U/ml respectivamente) en atmósfera humidificada con CO₂ (5% v/v) a 37 °C durante 24 h. Las células fueron tripsinizadas cada tres días siguiendo las recomendaciones del fabricante y sembradas en placas de 96 pocillos. Para el tratamiento, las células se mantuvieron en la placa después de la siembra durante 24 h. Cuando las células alcanzaron una confluencia de 70-90%, se lavaron con tampón PBS y fueron tratadas con una capa fina de PBS conteniendo los extractos a ensayar a diversas concentraciones. Después se trató la placa con una fuente de luz UVB (800 J/m²) mediante la utilización de un sistema de radiación UV (Bio-Link Crosslinker BLX-E312). Entonces, se reemplazó el tampón PBS por medio fresco y se incubaron

30

durante 72 h más. Después de incubar las células en medio fresco durante 72 h, se lavaron con tampón PBS y se incubaron con MTT durante 3-4 h a 37 °C y 5 % CO₂. Se eliminó el medio y se añadieron 100 µl de DMSO por pocillo para disolver los cristales de formazano que son insolubles en agua. Las placas se agitaron durante 15 min y se cuantificó la absorbancia de los pocillos utilizando un lector de placas a 570 nm (SPECTROstar Omega, BMG LabTech GmbH, Offenburg, Germany). Los resultados se muestran en la figura 9.

EJEMPLO 11. Citotoxicidad en células de melanoma murino B16. Viabilidad celular mediante ensayo MTT.

La línea celular con elevada capacidad metastática, B16 (procedentes de la ATCC, Rockville, MD) se sembraron y cultivaron con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen), pH7.4, suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Invitrogen), 10mM de HEPES, 100U/ml de penicilina y 100 mg/ml estreptomina. Las células sembradas se mantuvieron en estufa húmeda a 37°C y 5% de CO₂. Después de la incubación durante 24 horas, el medio de cultivo se reemplazó por nuevo que contenía sobrenadante y vesículas con glucosinolatos preparadas como se expone en el ejemplo 3 y a una concentración de 0.5%.

La viabilidad celular se midió por el ensayo de exclusión de azul tripán y el ensayo de la actividad lactato deshidrogenasa (figura 10).

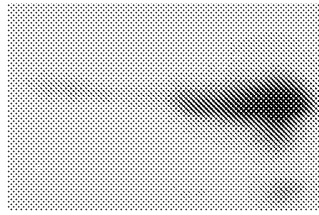
REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de obtención de vesículas de membrana plasmática de origen vegetal enriquecidas en proteínas transportadoras intrínsecas de membrana caracterizado porque comprende:
- una primera etapa de estimulación, que comprende someter a un organismo vegetal a un proceso de estrés abiótico combinado con la aplicación de un compuesto bioactivo,
 - 10 - una segunda etapa, que comprende extraer vesículas de membrana.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el estrés abiótico comprende regar el organismo vegetal con una disolución de riego a la que se adiciona una sustancia de choque osmótico combinado con una variación de la temperatura entre 0 y 10 °C con respecto a la temperatura ambiental media de 25 °C de dicha disolución, hasta alcanzar una conductividad eléctrica comprendida entre 0,5 y 6 dS m⁻¹, incluidos ambos límites.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque la sustancia de choque osmótico es seleccionada dentro del grupo compuesto por: CaCl₂, NaCl, KCl, Na₂SO₄, K₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, KNO₃, NH₄NO₃, Mg(NO₃)₂, Ca(NO₃)₂, KH₂PO₄, NH₄H₂PO₄, manitol, sorbitol, polietilenglicol y combinaciones de los mismos.
- 25 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, caracterizado porque la sustancia de choque osmótico se adiciona en la disolución de riego hasta alcanzar una concentración comprendida entre 10 y 80 mM, incluidos ambos límites.
- 30 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el compuesto bioactivo está seleccionado entre una

vitamina, un compuesto fenólico, un glucosinolato, un extracto enriquecido en al menos uno de estos compuestos, o la combinación de al menos dos de ellos.

- 5
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el compuesto bioactivo se aplica durante un tiempo comprendido entre 1 y 78 horas, incluidos ambos límites.
- 10
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el compuesto bioactivo se aplica en la disolución de riego en concentraciones comprendidas entre 5 y 100 μM , incluidos ambos límites.
- 15
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el organismo vegetal es seleccionado entre una planta de la familia Cruciferae y una planta hortícola.
- 20
9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque la planta es seleccionada dentro del grupo compuesto por: nabo, berro, rábano, colirrábano, col, coles lombardas, rutabagas, coles de Bruselas, mostazas, repollo, variedades de brócoli, berza, grelos, lechuga, espinaca, acelgas, escarola, remolacha, salvia, cebolla y ajo.
- 25
10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque la planta es seleccionada dentro del grupo compuesto por: nabo, berro, rábano, colirrábano, col, coles lombardas, rutabagas, coles de Bruselas, mostazas, repollo, berza, grelos, lechuga, espinaca, acelgas, escarola, salvia, cebolla y ajo.
- 30
11. Procedimiento según la reivindicación 8, donde la planta es una especie del género *Brassica*.
12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 11, donde la planta es una variedad de *Brassica oleracea*.

13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque en la segunda etapa, las vesículas de membrana se extraen de una parte del organismo vegetal seleccionada entre raíz, tallo, hojas, inflorescencia, o la combinación de al menos dos de estas partes.
- 5
14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque en la segunda etapa, la extracción de vesículas de membrana comprende al menos una etapa de homogenizado con un homogeneizador mecánico automático.
- 10
15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque en la segunda etapa, la extracción de vesículas de membrana comprende resuspender dichas vesículas en un tampón de conservación seleccionado entre tampón fosfato, tampón bicarbonato y tampón acetato.
- 15
16. Vesícula obtenible mediante el procedimiento descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que comprende una cantidad efectiva de proteínas transportadoras intrínsecas de membrana para su aplicación con fines dermatológicos, farmacológicos o terapéuticos.
- 20
17. Vesícula de acuerdo a la reivindicación 16 que incorpora en su interior además sustancias adicionales capaces de ser aplicadas con fines dermatológicos, farmacológicos o terapéuticos.
- 25
18. Vesícula de acuerdo a la reivindicación 17, caracterizada porque dicha sustancia adicional está seleccionada entre al menos un compuesto bioactivo natural, un agente higroscópico, un agente químico y combinaciones de ellos.
- 30
19. Uso de una vesícula obtenible mediante el procedimiento descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que comprende una cantidad efectiva de proteínas transportadoras intrínsecas de membrana como vehículo y estabilizador de al menos un compuesto bioactivo en una bebida.



Control Elicitación

Fig. 1.

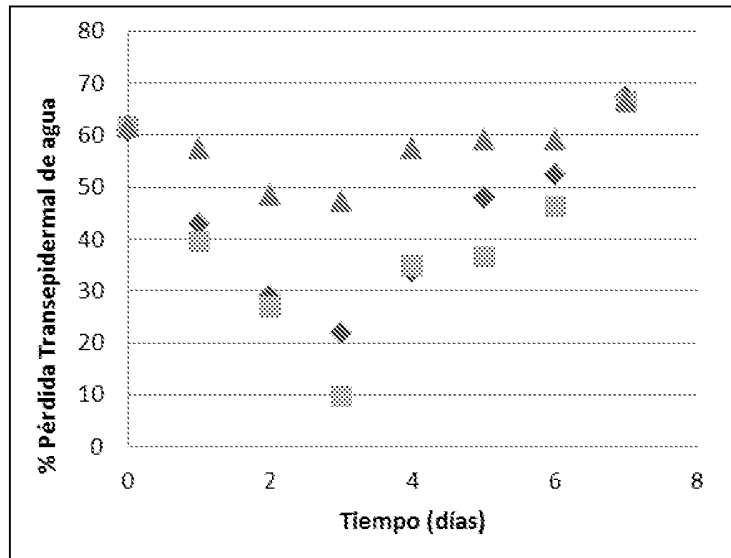


Fig. 2.

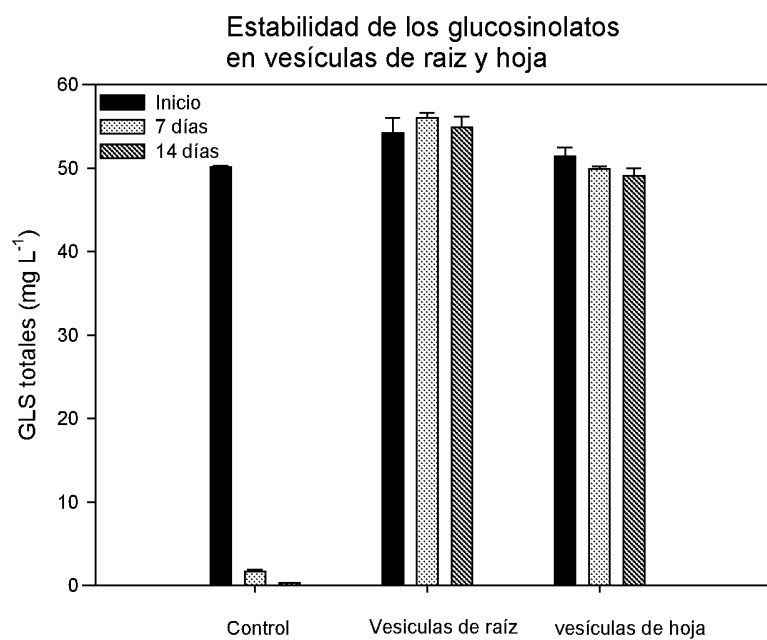


Fig. 3

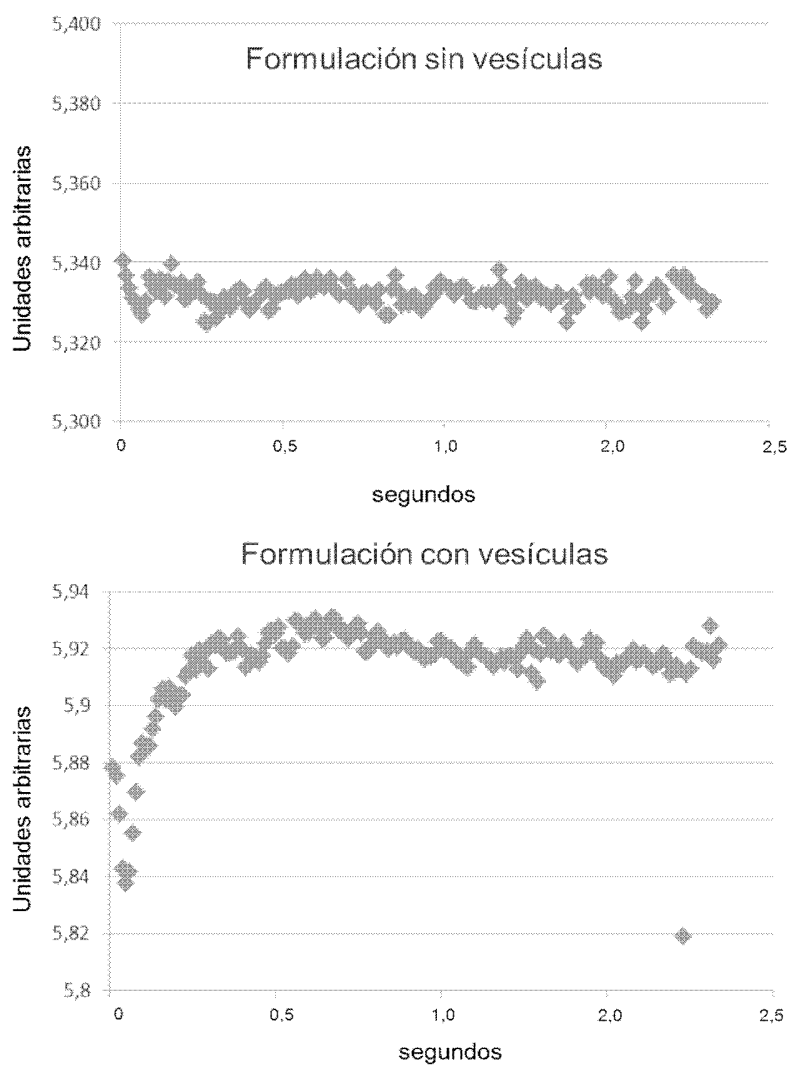


Fig. 4

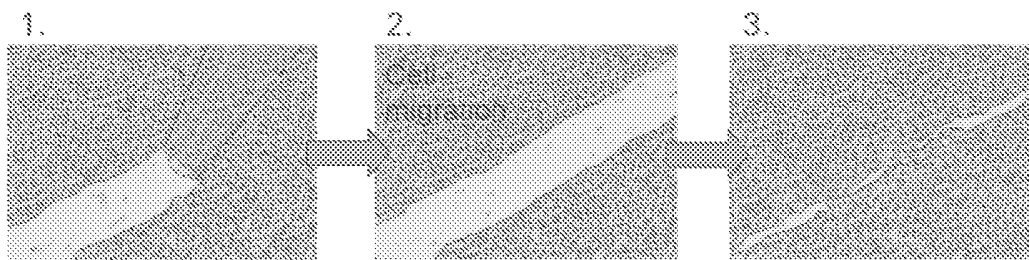


Fig. 5

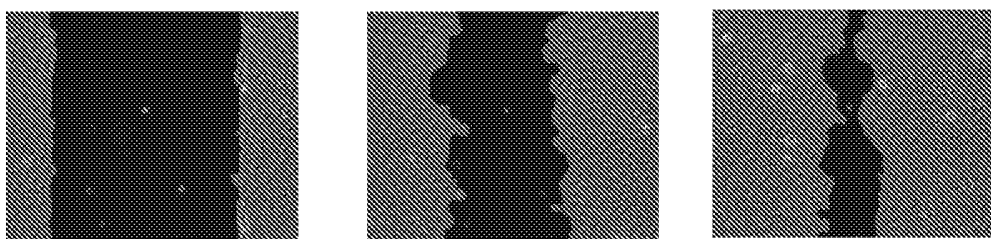


Fig. 6

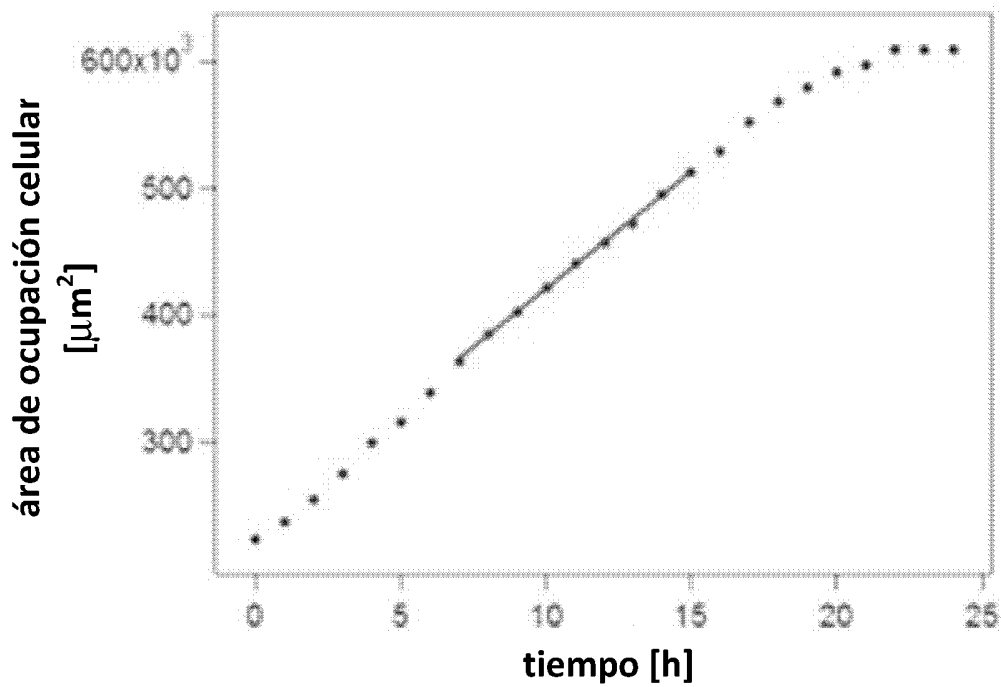


Fig. 7

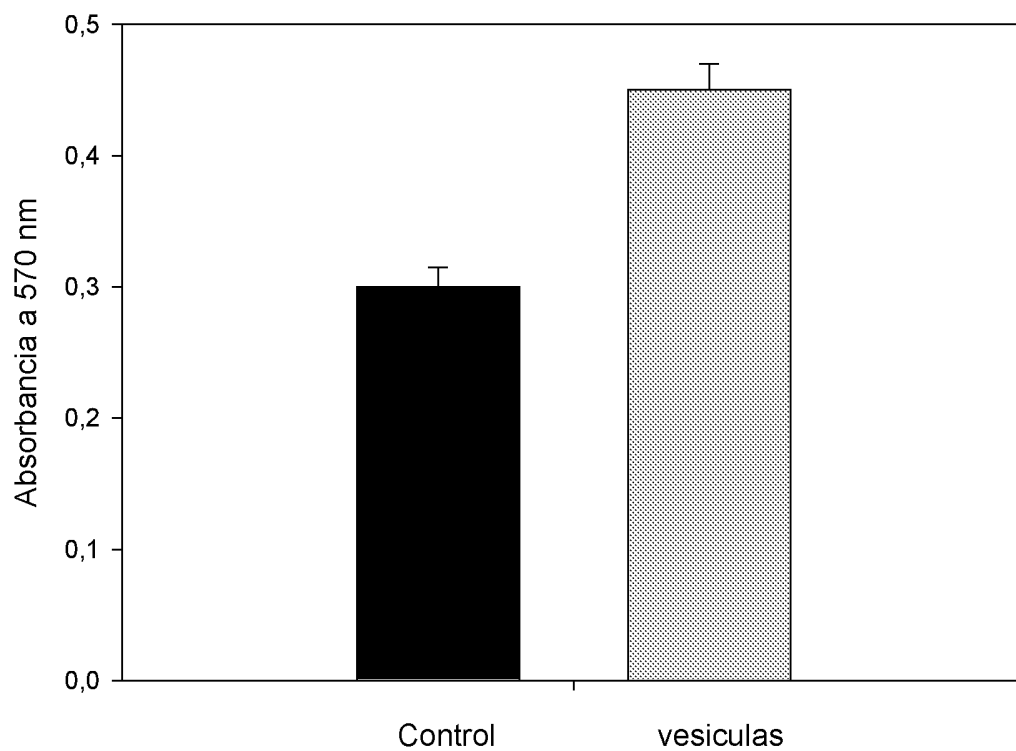


Fig. 8

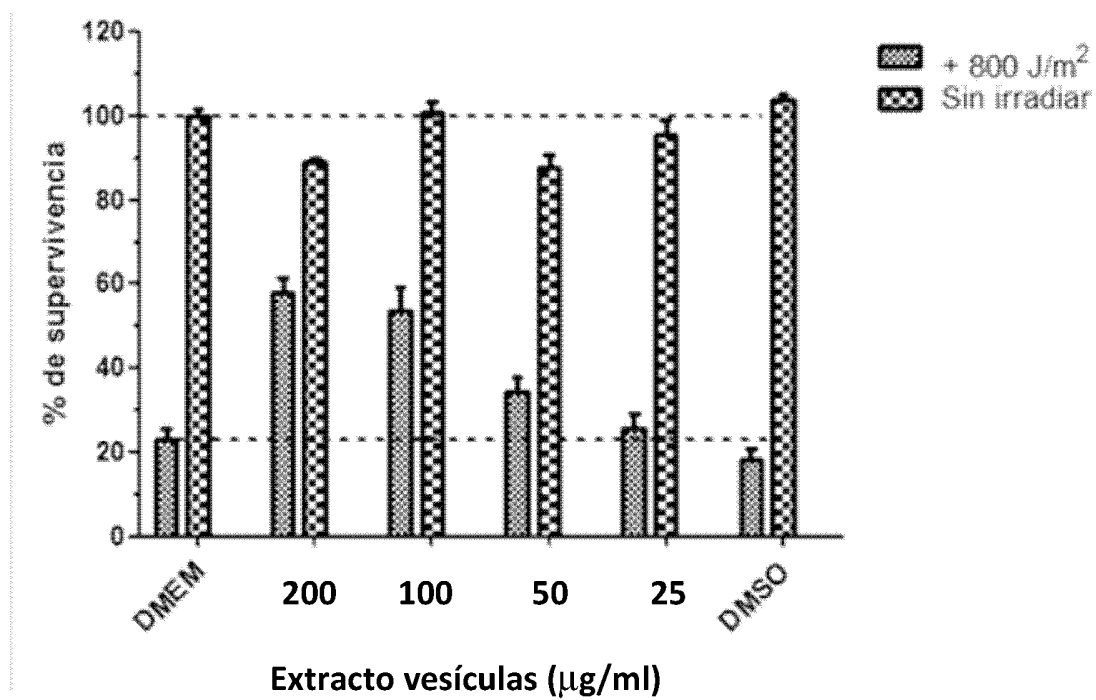


Fig. 9

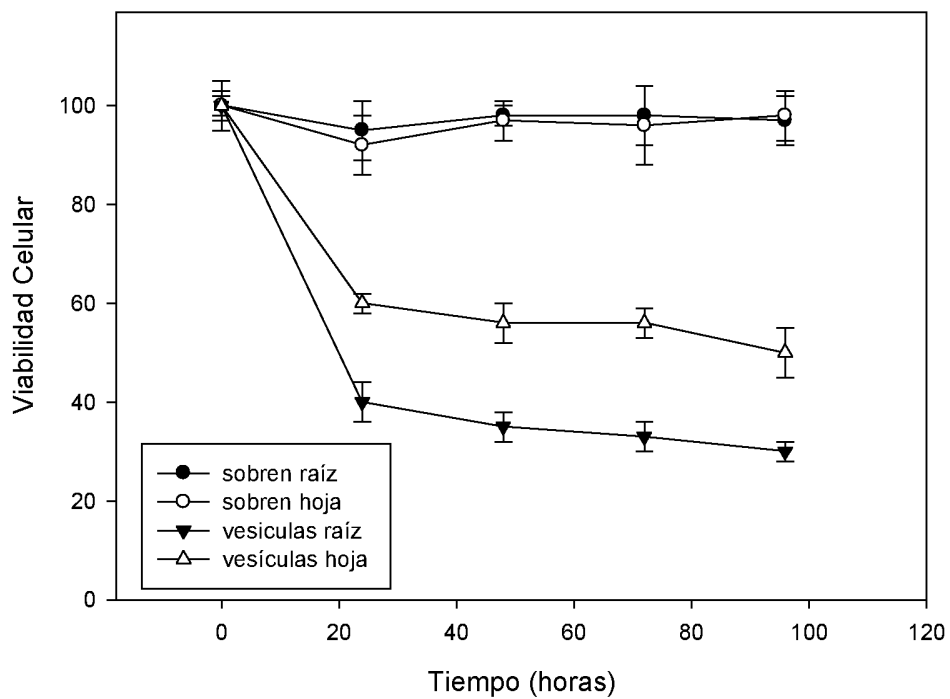


Fig. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2012/070366

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K9/133 (2006.01)

A61K36/31 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	López-Pérez L. et al. Changes in plasma membrane lipids, aquaporins and proton pump of broccoli roots, as an adaptation mechanism to salinity. <i>Phytochemistry</i> . 04.03.2009, Vol. 70, N° 4, pages 492 – 500 (the whole document)	1-18
A	Martínez-Ballesta M. C. et al. Two different effects of calcium on aquaporins in salinity-stressed pepper plants. <i>Planta</i> . 04.03.2008, Vol. 228, N° 1, pages 15-25 (the whole document)	1-18
A	Muries B. et al. Identification and differential induction of the expression of aquaporins by salinity in broccoli plants. <i>Molecular BioSystems</i> . 04.2011, Vol. 7, N° 4, pages 1322 – 1335 (the whole document)	1-18

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Date of the actual completion of the international search
16/08/2012

Date of mailing of the international search report
(10/09/2012)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
M. Cumbreño Galindo

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3496880

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070366

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The use to which claim 19 relates has no basis in the description.

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070366

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K9/133 (2006.01)

A61K36/31 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	López-Pérez L. et al. Changes in plasma membrane lipids, aquaporins and proton pump of broccoli roots, as an adaptation mechanism to salinity. <i>Phytochemistry</i> . 04.03.2009, Vol. 70, Nº 4, páginas 492 – 500 (todo el documento)	1-18
A	Martínez-Ballesta M. C. et al. Two different effects of calcium on aquaporins in salinity-stressed pepper plants. <i>Planta</i> . 04.03.2008, Vol. 228, Nº 1, páginas 15-25 (todo el documento)	1-18
A	Muries B. et al. Identification and differential induction of the expression of aquaporins by salinity in broccoli plants. <i>Molecular BioSystems</i> . 04.2011, Vol. 7, Nº 4, páginas 1322 – 1335 (todo el documento)	1-18

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
16/08/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
10 de septiembre de 2012 (10/09/2012)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado

M. Cumbreño Galindo

Nº de teléfono 91 3496880

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones n°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. Las reivindicaciones n° : **19**
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

El uso que es objeto de la reivindicación 19 no tiene base en descripción

3. Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.