



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 403**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/99** (2006.01)

**A61K 35/74** (2006.01)

**A61Q 19/06** (2006.01)

**C12R 1/10** (2006.01)

**C12R 1/465** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01100820 .8**

96 Fecha de presentación : **23.01.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **1132463**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2001**

54

Título: **Composición cosmética que contiene un antagonista de los receptores del neuropéptido Y.**

30

Prioridad: **23.10.1996 FR 96 12916**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2009**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2009**

73

Titular/es: **Sanofi-Aventis**  
**174, avenue de France**  
**75013 Paris, FR**

72

Inventor/es: **Blanc-Ferras, Elisabeth;**  
**Bono, Françoise;**  
**Breda, Bernard;**  
**Courregelongue, Jean;**  
**Ducasse, Catherine;**  
**Mounier, Rémy;**  
**Paul, Raymond;**  
**Pereillo, Jean-Marie;**  
**Sabadie, Michel;**  
**Serradeil-Le Gal, Claudine y**  
**Vilain, Pol**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 316 403 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición cosmética que contiene un antagonista de los receptores del neuropeptido Y.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un producto NPY-antagonista a partir de una cepa de *Streptomyces sp.*, a la cepa *Streptomyces sp.*, y a la utilización de la cepa *Streptomyces sp.* para la preparación de un componente NPY-antagonista, para la preparación de una composición cosmética adelgazante. El neuropeptido Y, denominado en adelante de forma abreviada "NPY", es un neuromediador que interviene en cierto número de procesos fisiológicos y para el cual se ha demostrado una implicación en la regularización de la lipólisis (P. Valet y M. J. Clin. Invest. 1990, 85, 291-295). Los antagonistas de los receptores NPY, en adelante denominados "NPY-antagonistas", se han descrito como medicamentos, pero su eficacia en el tratamiento de una enfermedad cualquiera no ha sido probada nunca hasta ahora. Bono F. *et al.* en "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL PROTEASE FROM CULTURE FILTRATES OF A STREPTOMYCES SP" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, AMSTERDAM, HOLANDA, vol. 141, n° 2/3, 1 de agosto de 1996 (1996-08-01), páginas 213-220, XP001176870  
10 ISSN: 0378-1097, hacen referencia a una cepa SRF 1950, pero no mencionan ni la cepa I-1332 ni una cepa que produzca una actividad NPY-antagonista. Se ha descubierto ahora que los NPY-antagonistas se pueden utilizar para la preparación de composiciones cosméticas.

Más particularmente, se ha encontrado que las composiciones cosméticas que contienen un componente NPY-antagonista se pueden utilizar como reguladores de la lipólisis/lipogénesis a nivel de la piel sin interferir, sin embargo, con las funciones naturales de ésta.

Se ha encontrado igualmente que las composiciones cosméticas que contienen un componente NPY-antagonista y un componente  $\alpha_2$ -antagonista son especialmente ventajosas.

Así, según uno de sus aspectos, la presente invención se refiere a una composición cosmética que contiene, al menos, un componente NPY-antagonista mezclado con un excipiente cosmético. El NPY-antagonista contenido en la composición cosmética es un producto obtenido por fermentación de un microorganismo, por ejemplo de una bacteria o de un hongo.

El NPY-antagonista utilizado en las composiciones cosméticas de la presente invención es un producto, especialmente un extracto obtenido por fermentación de cepas de Actinomycetaceae, que tiene una actividad NPY-antagonista. Los extractos resultantes de una nueva cepa de actinomicetos presentan una actividad particularmente interesante como antagonistas de los receptores NPY.

A partir de los mostos de fermentación de esta cepa, por filtración del sobrenadante, eventualmente seguida por etapas de concentración, purificación y/o liofilización, se obtienen fracciones con actividad antagonista de los receptores NPY que están desprovistas de genotoxicidad y tienen una estabilidad suficiente para permitir formularlas en las composiciones cosméticas de la presente invención.

El sobrenadante del mosto de fermentación se puede utilizar también tal cual.

Estos nuevos extractos constituyen un aspecto ulterior y particularmente ventajoso de la presente invención.

El organismo productor de los extractos con actividad antagonista de los receptores NPY según la presente invención, es una cepa de actinomicetos que se ha aislado a partir de una muestra de tierra de pradera extraída en Haute Garonne (Francia), a la que se ha asignado el número interno SEBR 2794. Una muestra de este microorganismo se ha depositado el 13 de julio de 1993 en la C.N.C.M. (por sus siglas en francés, Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos) del Instituto Pasteur donde se ha registrado bajo la referencia I 1332.

Las características bioquímicas de este microorganismo se han determinado sobre galerías API 50 CH (específicas de los azúcares), API 50 AO (específicas de los ácidos orgánicos) y API 50 AA (específicas de los aminoácidos) (comercializadas por BioMérieux para API 50CH y por el laboratorio de investigación API para los demás). Se ha determinado así que este microorganismo pertenece a la familia de los *Streptomycetaceae*, género *Streptomyces*.

Se trata de un microorganismo polimorfo, filamentoso. Se desarrolla bien a 28°C sobre un medio de cultivo ISP<sub>2</sub> (extracto de agar levadura malta), siendo la coloración de su micelio vegetativo de color gris-rosado.

Este organismo, que presenta características que no han permitido identificarlo con una especie ya descrita, se debe considerar como una especie nueva y ha sido denominado *Streptomyces sp* SEBR 2794.

La cepa *Streptomyces sp* SEBR 2794, depositada en la C.N.C.M. del Instituto Pasteur bajo el número I 1332 y sus mutantes productores constituyen igualmente un objeto de la presente invención.

El aislamiento de esta nueva cepa se ha realizado siguiendo el método habitual, que consiste en poner una pequeña cantidad de tierra en suspensión en agua destilada, diluir la suspensión a diferentes concentraciones y extender un pequeño volumen de cada dilución sobre la superficie de una placa Petri que contiene un medio nutritivo de gel de agar. Después de una incubación de algunas horas a 28°C, que permite a los microorganismos desarrollarse, se extraen

## ES 2 316 403 T3

separadamente las colonias y se resiembran sobre geles de agar nutritivos con el fin de obtener cultivos más abundantes. Después de los cultivos sobre medio nutritivo de gel de agar y diversos resemebrados sucesivos que permiten obtener un cultivo abundante y puro de la cepa de interés, se fabrica un lote 0 de conservación de la cepa madre y lotes de siembra primario y secundario.

5

Para ello, se prepara una suspensión de esporas a partir de un cultivo en medio nutritivo de gel de agar en placa Petri y un medio de recogida; este medio contiene un crioprotector que permite asegurar una buena viabilidad de las esporas durante la conservación por congelación.

10 La suspensión de las esporas obtenida se distribuye en los criotubos que se conservarán a  $-80^{\circ}\text{C}$ : estos tubos constituyen el lote 0.

Siguiendo el mismo protocolo, pero a partir de un tubo del lote 0, se prepara un lote de siembra primario.

15 Después, siempre según el mismo protocolo, se prepara un lote de siembra secundario a partir de un criotubo del lote de siembra primario.

La fabricación de los lotes de siembra 0, 1 y 2 asegura una accesibilidad duradera de la cepa y, así pues, de la actividad investigada.

20

El procedimiento de preparación de los extractos con actividad antagonista de los receptores del NPY consiste esencialmente en cultivar la nueva cepa SEBR 2794, o sus mutantes productores, sobre un medio y en condiciones de cultivo apropiados y extraer a continuación del mosto de fermentación la fracción activa producida en el transcurso del cultivo; fracción activa que se encuentra en el sobrenadante.

25

El cultivo de *Streptomyces sp* SEBR 2794 se puede efectuar por cualquier método de cultivo aerobio. Para este fin se utilizan los diferentes tipos de aparatos que son de uso corriente en la industria de las fermentaciones. Se pueden adoptar, en particular, los pasos siguientes para la dirección de las operaciones.

30 A partir de un tubo del lote de siembra secundario se siembran placas Petri que, después de cinco días de incubación, proporcionan una suspensión de esporas.

Esta suspensión de esporas se utiliza para sembrar matraces Erlenmeyer agitados que contienen un medio apropiado. Se puede también sembrar directamente el matraz agitado con un tubo del lote de siembra. El cultivo en matraces agitados puede durar de dos a siete días pero se prefiere una duración de tres a cinco días.

35

Se observa la producción de actividad en el sobrenadante desde la primera etapa de cultivo en matraz, pero puede ser ventajoso realizar dos etapas de cultivo sucesivas: una primera etapa para propagar la biomasa, una segunda para la producción. En este último caso es suficiente una duración de uno o dos días para la primera etapa.

40

La actividad antagonista contenida en los sobrenadantes de cultivo en matraces se expresa como  $DI_{50}$  (dilución inhibitoria del 50%, a saber, la dilución que inhibe el 50% del acoplamiento del ligando a sus receptores); la  $DI_{50}$  está comprendida generalmente entre 1/200 y 1/1.000.

45 La actividad antagonista de los receptores del NPY se obtiene en el sobrenadante de los cultivos en matraces, pero parece ventajoso, para obtener una actividad más importante, realizar un cultivo en un fermentador y extraer a continuación el sobrenadante de éste. El fermentador se siembra con un cultivo en matraz agitado de uno o dos días de duración. En el fermentador, según el medio de cultivo utilizado, se puede observar la actividad antagonista en el sobrenadante desde el primer día, pero es ventajoso prolongar el cultivo más allá de tres días para obtener una producción óptima.

50

Realizar el cultivo de SEBR 2794 en fermentador permite controlar mejor las condiciones de cultivo que se describen a continuación, como por ejemplo el pH o la aireación.

55 La actividad antagonista obtenida en los sobrenadantes del fermentador, antes de concentrar, puede variar, según las condiciones de cultivo aplicadas, entre una  $DI_{50}$  de 1/500 y una  $DI_{50}$  de 1/10.000.

El medio de cultivo utilizado en el procedimiento de fermentación debe contener, al menos, una fuente de carbono asimilable, una fuente de nitrógeno asimilable y elementos minerales. Como fuentes de carbono asimilable se pueden utilizar los hidratos de carbono, como la glucosa, la manosa, la maltosa, las dextrinas, el glicerol, los aminoácidos y las proteínas. Como fuente de carbono asimilable se pueden utilizar también los ácidos acético, subérico, cítrico, propiónico, succínico y 2-cetoglutarico o ciertos aceites animales o vegetales.

60

Las mejores fuentes de nitrógeno asimilable se encuentran entre las proteínas, las peptonas y los aminoácidos. Estas fuentes comprenden, por ejemplo, la caseína, la albúmina, el gluten y sus hidrolizados, la harina de pescado, los extractos de levadura o las peptonas.

65

## ES 2 316 403 T3

La producción de biomasa se puede aumentar por la adición, en el transcurso del cultivo, de uno y/u otro de estos dos sustratos principales.

5 Entre los elementos minerales añadidos al medio de cultivo para asegurar el crecimiento del microorganismo y optimizar la asimilación de las fuentes de carbono y de nitrógeno por las células del microorganismo, hay sales de potasio, sodio, hierro, magnesio, calcio, manganeso así como compuestos de fósforo tales como los fosfatos y los oligoelementos.

10 Para cultivar la cepa SEBR 2794 sobre un medio que contiene estos componentes, es ventajoso el procedimiento de cultivo bajo aireación y agitación, en el que se utiliza un medio líquido, aunque se puede utilizar igualmente el cultivo sobre un medio de gel de agar.

15 La temperatura, la duración de la incubación, la aireación y el pH del medio deben ser tales que den lugar a un crecimiento máximo del microorganismo utilizado y un rendimiento máximo en extractos con actividad antagonista de los receptores del NPY; el cultivo agitado durante aproximadamente 2 a 7 días es habitualmente ventajoso.

20 El pH del medio de cultivo se mantiene, preferentemente, en un valor más o menos neutro o muy débilmente básico y la temperatura óptima de incubación entre aproximadamente 23°C y 35°C, el intervalo preferido es de 25°C a 33°C.

Las condiciones de cultivo como la composición y el pH del medio, la temperatura de incubación, la velocidad de agitación así como la aireación de la fermentación pueden variar en límites amplios y se deberían elegir, evidentemente, de forma que se obtuvieran los mejores resultados posibles.

25 Para obtener los extractos antagonistas de los receptores del NPY producidos en el transcurso del cultivo, se separa el sobrenadante del micelio después de haber congelado o no el mosto de fermentación. Para esta separación se puede utilizar la centrifugación, la filtración a través de filtro prensa, la filtración clarificante, es decir, una filtración en presencia de un adyuvante de filtración o cualquier otra técnica utilizada habitualmente para extraer un producto extracelular de un mosto de fermentación.

30 El extracto activo de uso cosmético se prepara a partir del sobrenadante de cultivo obtenido.

El sobrenadante se puede concentrar mediante un proceso con membranas o por cualquier otro método de concentración a fin de facilitar el acondicionamiento o utilización de la disolución activa.

35 Se pueden obtener así actividades con  $DI_{50}$  que varían de 1/250 a 1/50.000.

40 El sobrenadante, que se ha concentrado o no, se puede diluir en diferentes disolventes compatibles con una utilización cosmética.

El extracto así obtenido según este aspecto particular de la presente invención se filtra a través de 0,2  $\mu\text{m}$  a fin de eliminar cualquier traza de biomasa residual y de asegurar la limpieza microbiológica: se acondiciona a continuación asépticamente en frascos estériles y se obtiene la disolución activa utilizable en cosmética.

45 Fluidos que contienen los extractos NPY-antagonistas de la presente invención en un glicol, preferentemente en propilenglicol, constituyen otro aspecto muy ventajoso de la presente invención. Si se desea obtener un polvo en lugar de una disolución activa se puede simplemente liofilizar el filtrado.

50 Un análisis cuantitativo de actividad antagonista a los receptores del NPY realizada sobre una parte alícuota permite evaluar la actividad de la disolución activa y verificar la reproducibilidad del procedimiento.

55 A nivel del sobrenadante o del liofilizado, se puede purificar el extracto de la invención de forma más o menos potente según técnicas convencionales de purificación de las "biomoléculas", los polímeros, las sustancias proteicas u otras, como, por ejemplo, la cromatografía de permeación en gel, la ultrafiltración, la cromatografía por adsorción, la cromatografía a contracorriente o incluso la electrofocalización.

Los extractos resultantes de esta nueva cepa tienen una actividad antagonista de los receptores del NPY muy interesante. Su potente afinidad por estos receptores, tanto por los subtipos Y1 como Y2, se ha demostrado a nivel del adipocito de perro, este último modelo presenta una elevada homología con el adipocito humano. Más particularmente, 60 las membranas de los adipocitos se han obtenido a partir del tejido omental adiposo extraído del perro utilizando básicamente la técnica descrita por Taouis *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. (1987), 242, 1041-1049. Los estudios de acoplamiento se han realizado según las técnicas convencionales conocidas. En particular, se incuban las membranas de los adipocitos (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 60 minutos a 30°C en un medio de acoplamiento tamponado (disolución de Krebs-Ringer Hepes 20 mM, pH=7,4, albúmina de suero bovino al 1%, 0,25 mg/mL de bacitracina) con [ $^{125}\text{I}$ ]-NPY 65 0,08 nM marcado con el reactivo de Bolton-Hunter (Amersham IM 170, 2.000 Ci/mmol) en presencia o ausencia de NPY porcino 0,3  $\mu\text{M}$ . Se detiene la incubación por filtración utilizando filtros Whatman GF/C y se evalúa la radiactividad retenida por el filtro en un contador gamma.

## ES 2 316 403 T3

El acoplamiento no específico, medido en presencia de NPY 0,3  $\mu$ M no marcado, representa 25% de la fijación total. La preparación de membranas de adipocitos de perro es portadora de receptores  $Y_1$  e  $Y_2$  que la pueden discriminar sobre la base de la afinidad del fragmento NPY (13-36) selectivo para los receptores  $Y_2$ .

5 Los extractos según la presente invención han demostrado una buena afinidad por los receptores del NPY de este tejido, desplazando de forma dosis dependiente el [ $^{125}$ I]-NPY fijado a las membranas de los adipocitos con  $DI_{50}$  (es decir, concentraciones inhibitorias del 50% del acoplamiento específico del [ $^{125}$ I]-NPY) que dependen del grado de purificación de los extractos, y que en el caso de los extractos brutos obtenidos directamente de los sobrenadantes de fermentación por liofilización, son al menos del orden de  $10^{-2}$  mg/mL.

10 El carácter antagonista del NPY de los extractos según este aspecto particular de la presente invención se ha puesto de evidencia mediante estudios sobre órganos aislados y más particularmente en el modelo del “*vas deferens*” en ratas. Los extractos han mostrado propiedades antagonistas de los efectos del NPY en los modelos  $Y_2$  del *vas deferens* de rata y se han estudiado según el protocolo descrito en Regulatory Peptides 1986, 13, 307-318.

15 Esta actividad se ha confirmado sobre adipocitos humanos aislados del tejido adiposo subcutáneo, dosificando la liberación de los ácidos grasos en el medio de cultivo y comparándola con el testigo (incubación sin producto).

20 Se prefieren particularmente las disoluciones con 50% (p/p) de estos extractos en propilenglicol.

La preparación aséptica de estas disoluciones permite evitar la adición de conservante.

25 En la preparación de las composiciones según la presente invención, los extractos con actividad antagonista de los receptores del NPY se mezclan con disolventes acuosos o no y con diluyentes convencionales compatibles con un uso tópico así como con los componentes activos de la misma composición. Los disolventes y/o diluyentes apropiados se elegirán según su capacidad de transportar el componente activo del extracto de la invención en la capa adiposa subcutánea.

30 Estas composiciones contienen generalmente excipientes o aditivos elegidos entre los ingredientes utilizados habitualmente en las composiciones destinadas a una aplicación local según las necesidades de las formulaciones particulares consideradas.

35 Pueden contener, por ejemplo, agentes espesantes, calmantes, emolientes, estabilizantes, conservantes, agentes antiespumantes, tensioactivos, antioxidantes, colorantes y/o pigmentos, perfumes.

40 Pueden contener igualmente otros componentes activos que tienen o un efecto del mismo tipo, por ejemplo, productos que contribuyen a la regulación de la lipólisis/lipogénesis, o productos útiles en este tipo de composición tales como estimuladores de la síntesis de colágeno, inhibidores de la colagenasa o de la elastasa, vasoprotectores. Las composiciones cosméticas preferidas según la presente invención contienen, además del NPY-antagonista, un  $\alpha_2$ -antagonista que puede ser también un compuesto de síntesis no peptídica, un péptido o un producto obtenido por fermentación de un microorganismo, por ejemplo de una bacteria o de un hongo, o por extracción de células o de tejidos de origen vegetal o animal. Los  $\alpha_2$ -antagonistas ventajosos para uso como componentes adicionales, junto con el NPY-antagonista, son los de las clases A y B siguientes.

45 A. Productos de síntesis elegidos entre los de los grupos I a VIII a continuación.

- I. - Los compuestos descritos en el documento BE 840363, especialmente la mirtazapina.
- 50 II. - Los compuestos descritos en el documento DE 2 603 407, especialmente la setiptilina y sus análogos estructurales.
- III. - Los compuestos descritos en el documento US 4.337.260, especialmente la mosapramina.
- IV. - Los compuestos descritos en el documento US 2.979.511, especialmente el idazoxan.
- 55 V. - Los compuestos descritos en el documento WO 92/13856, especialmente las 5-tiazolil-N,N-dimetilriptaminas cuyo CP es 93393.
- VI. - Los compuestos descritos en el documento US 4.229.449, especialmente la reboxetina.
- 60 VII. - Los compuestos descritos en el documento GB 2 157 631, especialmente el fluparoxan.
- VIII. - Los compuestos descritos en el documento GB 2 167 408, especialmente el atipamezol.

65 B. Los productos  $\alpha_2$ -antagonistas obtenidos por extracción de células o de tejidos de origen animal o vegetal o por fermentación de microorganismos, especialmente de bacterias y de hongos, por ejemplo de levaduras. Ejemplos de productos de esta clase, que incluyen igualmente los productos de hemisíntesis, son los productos de los grupos IX y X a continuación.

## ES 2 316 403 T3

IX. - Los extractos del tizón, sus componentes y compuestos de hemisíntesis, que tienen una acción  $\alpha_2$ -antagonista, especialmente la nicergolina.

X. - Los productos, especialmente los extractos resultado de la fermentación de cepas de *Bacillus licheniformis* con actividad antagonista del receptor  $\alpha_2$ , especialmente de la cepa SEBR 2464.

Estos productos, especialmente los extractos que pertenecen a este grupo, representan otro aspecto particular de la presente invención. El organismo productor según este aspecto particular de la presente invención es una cepa de *Bacillus licheniformis* que ha sido aislada, a la que se ha asignado el código SEBR 2464. Se ha depositado una muestra de este microorganismo el 22 de octubre de 1996 en la C.N.C.M. del Instituto Pasteur donde se ha registrado bajo la referencia I-1778.

Las características de este microorganismo se han determinado sobre galerías A.P.I. API 20B, API 50 CHB, 50 CH, 50 AA, 50AO y 20E.

Se trata de una bacteria en forma de bacilos móviles de formas regulares, de 2 a 10  $\mu\text{m}$  de longitud y de 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  de anchura, aislados o en cadenas cortas. Como la mayor parte de los *Bacillus* esta bacteria es gram+, anaerobia facultativa, catalasa positiva, oxidasa negativa y presenta la característica de esporular en ciertas condiciones.

Crece bien a pH de 5 a 7, a temperaturas comprendidas entre 15 y 55°C y para salinidades (NaCl) hasta 7%.

Esta cepa se ha aislado como contaminante, en el transcurso de experimentos que utilizan columnas de arena, según las técnicas microbiológicas clásicas conocidas por el experto en la técnica.

Esta cepa particular, así como sus mutantes productores, constituye así pues un objeto ulterior de la presente invención.

Después de los cultivos sobre medio nutritivo de gel de agar y diversos resebrados sucesivos que permiten obtener un cultivo abundante y puro de la cepa de interés, se fabrica un lote 0 de conservación de la cepa madre y lotes de siembra primario y secundario.

Para ello, se prepara una suspensión de esporas a partir de un cultivo sobre medio nutritivo de gel de agar en placa Petri y un medio de recogida; este medio contiene un crioprotector que permite asegurar una buena viabilidad de las esporas durante la conservación por congelación.

La suspensión de las esporas obtenida se distribuye en los criotubos que se conservarán a -80°C: estos tubos constituyen el lote 0.

Siguiendo el mismo protocolo, pero a partir de un tubo del lote 0, se prepara un lote de siembra primario.

Después, siempre según el mismo protocolo, se prepara un lote de siembra secundario a partir de un criotubo del lote de siembra primario.

La fabricación de los lotes de siembra 0, 1 y 2 asegura una accesibilidad duradera de la cepa y, así pues, de la actividad investigada.

El procedimiento de preparación de los extractos con actividad antagonista al receptor  $\alpha_2$  consiste esencialmente en cultivar la nueva cepa SEBR 2464, o sus mutantes productores, sobre un medio y en condiciones de cultivo apropiados y extraer a continuación del sobrenadante de cultivo la fracción activa.

Este sobrenadante se puede concentrar hasta la obtención de un extracto seco.

El cultivo de *Bacillus licheniformis* SEBR 2464 se puede efectuar por cualquier método de cultivo aerobio y en diferentes tipos de aparatos utilizados habitualmente en la industria de las fermentaciones. Se pueden adoptar, en particular, los pasos siguientes para la dirección de las operaciones.

A partir de un tubo del lote de siembra secundario se siembran placas Petri, que después de dos días de incubación permiten inocular matraces Erlenmeyer agitados que contienen un medio apropiado.

Se puede sembrar también directamente un matraz agitado con un tubo del lote de siembra. En este caso, para un mismo medio, la duración del cultivo será superior. La actividad antagonista se obtiene en los cultivos en matraces en un plazo de 10 horas a 48 horas según las condiciones de cultivo utilizadas.

La actividad antagonista al receptor  $\alpha_2$  se extrae de los sobrenadantes de cultivo. La actividad de los extractos se expresa en  $\text{DI}_{50}$  (dilución inhibitoria del 50%); un litro de cultivo permite obtener 10 mL de extracto que tiene una  $\text{DI}_{50}$  comprendida entre 1/2.500 y 1/10.000.

## ES 2 316 403 T3

La actividad antagonista del receptor  $\alpha_2$  se puede obtener por extracción del sobrenadante de los cultivos en matraces, pero parece ventajoso, a fin de obtener una actividad más importante, realizar un cultivo en fermentador y extraer a continuación el sobrenadante de éste.

5 El fermentador se siembra con un cultivo en matraz agitado de 1 a 2 días de duración, es preferible que el cultivo no haya comenzado a esporular.

En el fermentador, según las condiciones de cultivo utilizadas, se puede observar la actividad antagonista desde las primeras horas del cultivo pero es ventajoso esperar que la fase de crecimiento estacionario se haya alcanzado antes de extraer.

10 La realización del cultivo de SEBR 2464 en fermentador permite controlar mejor las condiciones de cultivo que se describen a continuación, por ejemplo el pH y la aireación. La actividad antagonista del receptor  $\alpha_2$  obtenida en fermentador puede variar, según las condiciones de cultivo aplicadas.

15 Un litro de cultivo permite obtener a partir del sobrenadante, después de la extracción, 10 mL de extracto que presenta una  $DI_{50}$  comprendida entre 1/3.000 y 1/15.000.

Las características del medio son idénticas a las descritas previamente para la cepa SEBR 2794.

20 Con el fin de cultivar la cepa SEBR 2464 sobre un medio que contiene estos componentes, es ventajoso el procedimiento de cultivo bajo aireación y agitación, en el que se utiliza un medio líquido, aunque se puede utilizar igualmente el cultivo sobre un medio de gel de agar.

25 La temperatura, la duración de la incubación, la aireación y el pH del medio deben ser tales que den lugar a un crecimiento máximo del microorganismo utilizado y un rendimiento máximo en extracto con actividad antagonista del receptor  $\alpha_2$ .

El cultivo agitado y aireado durante aproximadamente de 10 horas a 48 horas es habitualmente ventajoso.

30 El pH del medio de cultivo se mantiene, preferentemente, en un valor más o menos neutro o muy débilmente ácido y la temperatura óptima de incubación se sitúa entre 25°C y 50°C.

35 Las condiciones de cultivo como la composición y el pH del medio, la temperatura de incubación, la velocidad de agitación así como la aireación de la fermentación pueden variar en límites amplios y se deberían elegir, evidentemente, de forma que se obtuvieran los mejores resultados posibles.

La obtención del extracto que presenta una fuerte actividad antagonista del receptor  $\alpha_2$  requiere varias etapas de extracción.

40 Una primera etapa consiste en eliminar la biomasa. Para ello se puede utilizar la centrifugación, la microfiltración tangencial, la filtración clarificante, es decir, una filtración en presencia de un adyuvante de filtración, o cualquier otro método utilizado habitualmente para extraer un producto extracelular de un mosto de fermentación. A continuación se pone en contacto durante una noche el sobrenadante con una resina hidrófoba, preferentemente un poliestireno divinilbenceno como, por ejemplo, la resina Amberlite XAD<sub>2</sub> (Rohm Hass) o la resina CHP20P (Mitsubishi).

45 La resina cargada se separa entonces por filtración frontal, el filtrado se elimina.

La resina sufre varias extracciones sucesivas mediante diferentes disolventes que permiten extraer las moléculas con carácter hidrófobo. Después de cada extracción la resina se separa de la fase orgánica por filtración.

50 Las diferentes fases orgánicas se evaporan a continuación a vacío, juntas o separadamente, hasta la obtención de uno o de varios extractos secos.

55 Un análisis cuantitativo de actividad antagonista del receptor  $\alpha_2$  realizada sobre una parte alícuota de cada uno de los extractos permite evaluar su actividad y verificar la reproducibilidad del procedimiento.

El extracto seco así obtenido se puede recoger en diferentes disolventes utilizados habitualmente en cosmética.

60 La concentración de recogida se elige para permitir una perfecta disolución del extracto y para ser compatible con la utilización ulterior. Con el fin de eliminar cualquier traza de biomasa residual y asegurar su estabilidad microbiológica, el extracto se filtra por 0,2  $\mu\text{m}$  y se reparte asépticamente en frascos estériles.

65 La actividad  $\alpha_2$ -antagonista de los extractos se ha evaluado utilizando la técnica descrita por Chapleo C.B. *et al.*, J. Med. Chem., 1983, 26, 823-831, sobre el desplazamiento *in vitro*, a nivel del córtex de la rata, del ligando de referencia antagonista de los receptores  $\alpha_2$ : el idazoxan tritiado.

El extracto  $\alpha_2$ -antagonista, a razón de 30% de extracto seco, se introduce en una mezcla propilenglicol-agua 50-50 y constituye una dilución preferida según la invención.

## ES 2 316 403 T3

Se pueden utilizar igualmente diluciones de preparación aséptica de estas disoluciones lo que permite evitar la adición de conservante.

5 En la preparación de las composiciones según la presente invención, los extractos así constituidos con actividad antagonista de los receptores  $\alpha_2$ , se mezclan con los disolventes acuosos o no y con los diluyentes convencionales compatibles con un uso tópico así como con los componentes activos de la composición misma. Los disolventes y/o diluyentes apropiados se elegirán según su capacidad de transportar el componente activo del extracto de la invención en la capa adiposa subcutánea.

10 Estas composiciones contienen generalmente excipientes o aditivos elegidos entre los ingredientes utilizados habitualmente en las composiciones destinadas a una aplicación local según las necesidades de las formulaciones particulares consideradas.

15 Pueden contener, por ejemplo, agentes espesantes, calmantes, emolientes, estabilizantes, conservantes, agentes antiespumantes, tensioactivos, antioxidantes, colorantes y/o pigmentos, perfumes.

Pueden contener igualmente otros componentes activos que tienen o un efecto del mismo tipo, por ejemplo, productos que contribuyen a la regulación de la lipólisis/lipogénesis o productos útiles en este tipo de composición típica tales como estimulantes de la síntesis de colágeno, inhibidores de la colagenasa o de la elastasa, vasoprotectores.

20 Los extractos  $\alpha_2$ -antagonistas de la invención se muestran, además, completamente desprovistos de genotoxicidad en los tests de Ames y de la reparación del ADN. Su estabilidad es compatible con su utilización en composiciones cosméticas. Las composiciones cosméticas de la presente invención contienen el NPY-antagonista en porcentajes comprendidos entre 0,00001% y 5% con relación al peso total de la composición, mezclado con los excipientes utilizados comúnmente para la preparación de formulaciones cosméticas para aplicación sobre la piel.

25 Dichos porcentajes pueden variar en el intervalo indicado anteriormente en función de la actividad intrínseca del componente NPY-antagonista incluido en la composición. Dicho componente NPY-antagonista está presente, preferentemente, en porcentajes de 0,0001% a 2%.

30 En la preparación de las composiciones según la presente invención, el componente NPY-antagonista se mezcla con disolventes acuosos o no y con diluyentes convencionales compatibles con una utilización sobre la piel así como con otros componentes de la composición misma. Los disolventes y/o diluyentes apropiados se elegirán según su capacidad para depositar el componente NPY-antagonista activo de la invención sobre la piel.

35 Estas composiciones contienen generalmente excipientes o aditivos elegidos entre los ingredientes utilizados habitualmente en las composiciones destinadas a una aplicación local según las necesidades de las formulaciones particulares consideradas.

40 Pueden contener, por ejemplo, agentes espesantes, calmantes, emolientes, estabilizantes, conservantes, agentes antiespumantes, tensioactivos, antioxidantes, colorantes y/o pigmentos, perfumes. Cuando el componente NPY-antagonista es un extracto de células o de tejidos de origen animal o vegetal o un producto, especialmente un extracto, obtenido por fermentación de un microorganismo, por ejemplo de una bacteria o de un hongo, la cantidad del componente NPY-antagonista es siempre de 0,00001% a 5%, preferentemente de 0,0001 a 2% con relación al peso total de la composición, dicha cantidad está calculada con relación al peso del extracto seco.

45 Las composiciones según la presente invención comprenden, según un aspecto preferente, un extracto obtenido de la fermentación de la nueva cepa SEBR 2794 en proporciones, en porcentaje peso/peso, que dependen del grado de actividad antagonista de los receptores del NPY del extracto utilizado y, así pues, de la concentración en sustancia seca y de la actividad específica de esta sustancia.

50 Cuanto mayor es la actividad antagonista con respecto a los receptores del NPY del extracto utilizado, más reducida es la cantidad en peso necesaria para obtener el efecto lipolítico deseado y viceversa.

55 Para obtener las composiciones cosméticas según la invención se pueden utilizar convenientemente los extractos brutos (sobrenadantes filtrados a través de 0,2  $\mu\text{m}$ ) obtenidos directamente de la fermentación sin ninguna etapa de purificación, en proporciones comprendidas entre 0,00001 y 5%, ventajosamente de 0,0001 a 2%, mejor de 0,01 a 2% del peso y preferentemente de 0,1 a 2% en peso. Estos porcentajes en peso se calculan, naturalmente, sobre la base del peso del extracto preparado.

60 Cuando las composiciones de la presente invención contienen, además del componente NPY-antagonista, también un componente  $\alpha_2$ -antagonista, este último está presente en un porcentaje de 0,00001 a 5%, ventajosamente de 0,0001 a 2%, mejor de 0,001 a 1%, preferentemente de 0,01 a 0,5%, con relación al peso total de la composición.

65 Dichos porcentajes pueden variar en los intervalos indicados anteriormente en función de la actividad intrínseca del componente  $\alpha_2$ -antagonista incluido en la composición.

El componente  $\alpha_2$ -antagonista se elige, ventajosamente, entre los productos incluidos en las clases A y B anteriores, los de la clase B son especialmente ventajosos. Se prefieren los compuestos que pertenecen al grupo X.



## ES 2 316 403 T3

Cuando el componente  $\alpha_2$ -antagonista es un extracto de células o de tejidos de origen animal o vegetal o un producto obtenido por fermentación de un microorganismo, por ejemplo de una bacteria o de un hongo, la cantidad de componente  $\alpha_2$ -antagonista es la indicada anteriormente, dicha cantidad se calcula en peso del extracto seco.

5 Según un aspecto ventajoso de la presente invención, la composición cosmética contiene tanto el componente NPY-antagonista como un componente  $\alpha_2$ -antagonista, el componente  $\alpha_2$ -antagonista se elige entre los de las clases A y B anteriores.

10 Según un aspecto particularmente ventajoso, la composición cosmética de la presente invención contiene el componente NPY-antagonista y un componente  $\alpha_2$ -antagonista elegido entre los que pertenecen a la clase B, especialmente al grupo X.

15 Más particularmente, la composición según este aspecto preferente de la presente invención contiene el componente NPY-antagonista susceptible de ser obtenido por fermentación de la cepa *Streptomyces sp* SEBR 2794 depositada en la C.N.C.M. del Instituto Pasteur bajo el número I 1132, o de sus mutantes productores y un componente  $\alpha_2$ -antagonista susceptible de ser obtenido por fermentación de la cepa *Bacillus licheniformis* SEBR 2464 depositada en la C.N.C.M. del Instituto Pasteur bajo el número I-1778, con excipientes utilizados normalmente para formulaciones de esta clase, tales como las mencionadas anteriormente.

20 La forma de las composiciones según la presente invención puede ser una emulsión en la que el constituyente o la mezcla de constituyentes, con un estabilizante eventual, está asociada con excipientes utilizados comúnmente en las composiciones cosméticas y son compatibles con dichos constituyentes tales como la lanolina o los aceites vegetales, minerales o sintéticos.

25 Las composiciones de la invención se pueden presentar igualmente en forma de gel en excipientes apropiados, tales como los ésteres de celulosa u otros agentes gelificantes como los derivados acrílicos y contener el principio activo en forma disuelta o suspendida en microgránulos.

30 Las composiciones según la invención pueden también tomar la forma de una loción o de una disolución en la que la mezcla de los constituyentes está disuelta o microdispersada.

35 La forma de las composiciones según la presente invención puede ser, así pues, una microdispersión en un líquido que contiene agua así como uno o varios agentes tensioactivos compatibles. Las dispersiones presentan las características de las microemulsiones y tienen prácticamente el aspecto de disoluciones verdaderas. Se pueden preparar igualmente de forma extemporánea.

40 Una forma interesante de las composiciones según la invención es un fluido aplicado de forma tópica a través de un soporte adhesivo, denominado en adelante "parche", este parche permite una difusión controlada de los componentes activos, activada eventualmente por fenómenos físicos tales como microcorrientes eléctricas.

45 Las composiciones cosméticas de la presente invención pueden contener igualmente otros componentes activos que tienen o un efecto del mismo tipo que el de los NPY-antagonistas, por ejemplo, productos que contribuyen a la regulación de la lipólisis/lipogénesis o estimuladores de la síntesis de colágeno, inhibidores de la colagenasa o de la elastasa, vasoprotectores.

Las composiciones de la presente invención disfrutan de una buena estabilidad y se pueden conservar durante el tiempo necesario para el uso a temperaturas comprendidas entre 0°C y 60°C, sin que haya sedimentación de los constituyentes o separación de las fases, ni una disminución de la actividad que pueda comprometer el uso.

50 Estas composiciones se toleran bien, no presentan ninguna fototoxicidad y su aplicación sobre la piel, durante periodos prolongados, no implica ningún efecto secundario.

55 Las composiciones de la presente invención, en sus diferentes formas de presentación, se pueden utilizar como reguladores de la lipólisis/lipogénesis a nivel de la piel. Más particularmente, son utilizables como productos cosméticos adelgazantes, reguladores de la seborrea o como adyuvantes en el tratamiento del acné.

Las composiciones cosméticas de la presente invención se pueden poner en contacto con la epidermis o el sistema piloso o capilar de forma que se modifica su aspecto o los protege.

60 Por ejemplo, cuando estas composiciones se ponen en contacto con la epidermis, ésta adquiere un aspecto "sano" como si hubiera estado expuesta al aire y/o al sol, sin broncearse sin embargo, si no se desea. Más particularmente, las composiciones cosméticas de la presente invención hacen perder a la piel el aspecto "graso" con el resultado de adelgazar la parte del cuerpo con el que dicha composición se ha puesto en contacto y de mantenerla en buen estado. Desde las primeras aplicaciones, el relieve cutáneo se alisa, la piel se vuelve más tónica y más firme. Después de un mes de aplicación, el efecto adelgazante aparece, el aspecto de "piel de naranja" se atenúa visiblemente y la silueta se afina.

65

## ES 2 316 403 T3

Cuando se ponen en contacto las composiciones de la presente invención con el sistema piloso o capilar, por ejemplo después de un tratamiento específico antiseborreico, dicho sistema se mantiene en buen estado.

5 Del mismo modo, las composiciones de la presente invención mantienen la piel de la cara en buen estado, haciendo también más difícil la formación de comedones.

Un fluido adelgazante obtenido según el Ejemplo 12 siguiente se ha probado en 50 voluntarias que han utilizado dicho fluido aplicado dos veces al día sobre los muslos, con un muy buen resultado.

10 El fluido adelgazante descrito en el Ejemplo 13 siguiente se ha probado en un estudio que incluía 150 voluntarias, efectuado como doble ciego contra un placebo. El análisis y la comparación de los resultados obtenidos con este fluido adelgazante y con su placebo en las condiciones experimentales adoptadas cercanas a las condiciones normales de uso para aplicaciones repetidas durante 60 días consecutivos sobre los dos muslos y el abdomen desde el talle hasta la rodilla, han permitido poner de evidencia un efecto adelgazante neto y estadísticamente significativo en favor del fluido adelgazante según la invención con relación al placebo.

20 La eficacia y la tolerancia de un fluido adelgazante como se describe en el Ejemplo 14 se han probado sobre más de 1.000 mujeres. Estas pruebas han demostrado una disminución del grosor del tejido adiposo, una acción tonificante y reafirmante y un adelgazamiento puesto de evidencia por medida centimétrica, ecográfica y por espectrometría de absorción bifotónica.

25 La invención tiene igualmente por objeto un método de tratamiento cosmético caracterizado porque se aplica sobre la epidermis y/o el sistema piloso o capilar una cantidad con efecto cosmético de un NPY-antagonista y eventualmente una cantidad con efecto cosmético de un  $\alpha_2$ -antagonista, en un vehículo de uso cosmético.

30 Por último, la presente invención tiene por objeto el uso de un NPY-antagonista para la preparación de composiciones cosméticas destinadas a regular la lipólisis/lipogénesis a nivel de la piel, especialmente adelgazantes, reguladoras de la seborrea y como adyuvantes en o después del tratamiento contra el acné.

Más particularmente, la invención se refiere al uso de un NPY-antagonista para la fabricación de composiciones cosméticas destinadas a mantener la piel de la cara en buen estado haciendo difícil la formación de comedones.

35 La invención se refiere también al uso de un NPY-antagonista para la fabricación de composiciones cosméticas destinadas a ponerse en contacto con el sistema piloso o capilar. La invención se refiere, especialmente, al uso de un NPY-antagonista para la fabricación de composiciones cosméticas destinadas a regular la lipólisis/lipogénesis de la piel, dichas composiciones contienen también un componente  $\alpha_2$ -antagonista.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención sin, sin embargo, limitarla.

40 Ejemplo 1

*Preparación de un extracto resultante de la cepa Streptomyces sp SEBR 2794*

45 1.1. Fermentación

La fermentación de la cepa *Streptomyces sp SEBR 2794* se ha conducido en seis medios de cultivo diferentes.

50 1.1.1

(a) Se propaga la cepa en placa Petri sobre un medio de resembrado:

55	Glucosa	20 g
	Soyoptim (SiO)	10 g
60	CaCO <sub>3</sub> (OMYA)	3 g
	Agar tipo E	20 g
65	Agua destilada c.s.p.	1 L

## ES 2 316 403 T3

Se incuba entonces el cultivo durante 5 días a 28°C. Se obtiene a continuación una suspensión de esporas añadiendo en cada placa Petri 15 mL de una mezcla apropiada que tiene la composición siguiente:

5	NaCl	9,00 g
	KCl	0,42 g
10	CaCl <sub>2</sub>	0,48 g
	NaHCO <sub>3</sub>	0,20 g
15	Glicerol	150,00 g
	Ácido 3-[N-morfolin]propanosulfónico (MOPS)	3,00 g
20	Agua destilada c.s.p.	1 L

(b) Se utilizan 3 mL de esta suspensión para sembrar 100 mL de medio de cultivo que tiene la composición siguiente:

25	Glucosa	30 g
	Soyoptim (SiO)	15 g
30	Tryptona USP (Biokar)	2 g
	Extracto de levadura (Difco)	5 g
35	Disolución de oligoelementos	10 mL
	CaCO <sub>3</sub>	5,00 g
40	Agua destilada c.s.p.	1 L
45	pH = 7	

en el que la disolución de oligoelementos está constituida por los compuestos siguientes:

50	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,00 g
	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1,00 g
55	CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,025 g
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,10 g
60	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,56 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,002 g
65	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,20 g
	Agua c.s.p.	1 L

## ES 2 316 403 T3

El cultivo se desarrolla a 28°C durante 72 horas en matraces Erlenmeyer de 500 mL agitando a 220 vueltas/minuto. El pH es, al final de la operación, de 7,5.

### 5 1.1.2

(a) Se realiza una suspensión de esporas de la cepa SEBR 2794 según el método indicado en el apartado 1.1.1 (a) y

10 (b) Se utilizan 3 mL de esta suspensión para sembrar 100 mL de cultivo que tiene la composición siguiente:

15	Glucosa	10 g
	Almidón soluble (Merck)	30 g
20	Extracto de malta (Difco)	5 g
	Soyoptim (SiO)	15 g
25	Triptona USP (Biokar)	2 g
	Extracto de levadura (Difco)	5 g
30	Disolución de oligoelementos (que tiene la misma composición que en el apartado 1.1.1 (b))	10 mL
	CaCO <sub>3</sub>	5 g
35	Agua destilada c.s.p.	1 L
40	pH = 7	

El cultivo se desarrolla como se indica en el apartado 1.1.1.

### 45 1.1.3.

Se repite el procedimiento descrito en los Ejemplos 1.1.1 y 1.1.2 cambiando la composición del medio de cultivo de la etapa (b) que es la siguiente:

50

55	Glicerol (Prolabo)	10 g
	Almidón soluble (Merck)	30 g
	Soyoptim (SiO)	15 g
60	Triptona USP (Biokar)	2 g

65

## ES 2 316 403 T3

Extracto de levadura (Difco)	5 g
Disolución de oligoelementos (que tiene la misma composición que en el EJEMPLO 1)	10 mL
CaCO <sub>3</sub>	5 g
Agua destilada c.s.p.	1 L
pH = 7	

El cultivo se desarrolla como se indica en el apartado 1.1.1.

### 1.1.4

(a) Se utilizan 0,5 mL de suspensión de esporas congeladas contenidas en un criotubo del lote de siembra para inocular un matraz de 500 mL que contiene 100 mL de medio de cultivo que tiene la composición siguiente:

Extracto de levadura (Difco)	3 g
Extracto de malta (Difco)	3 g
Peptona (Difco)	5 g
Glucosa	10 g
Agua destilada c.s.p.	1 L

El cultivo se desarrolla durante 72 horas a 28°C agitando a 220 vueltas/min. El pH del medio al final de la operación es cercano a 7,9.

### 1.1.5

(a) Se procede según el método indicado en el apartado 1.1.4 (a), pero se preparan tres cultivos idénticos que se detienen a las 24 horas.

(b) Se reúnen los tres cultivos y se utilizan para inocular un fermentador de 20 L que contienen 10 L de medio que tiene la composición siguiente:

Extracto de levadura	3 g
Extracto de malta	3 g
Peptona	5 g
Glucosa *	30 g
Agua destilada c.s.p.	1 L
(*): Glucosa esterilizada aparte	

## ES 2 316 403 T3

El cultivo se desarrolla durante al menos 72 horas a 28°C. La aireación se fija a 1 VVM (volumen de aire / volumen de cultivo · minuto) y la velocidad de agitación se regula de forma que se mantiene una presión de oxígeno disuelto próxima a 20%. El pH no se regula y evoluciona libremente entre 7,2 y 6,3.

### 5 1.1.6

(a) Se procede de la misma forma que en el Ejemplo 1.1.5, pero utilizando un medio de precultivo (matraces) que tiene la composición siguiente:

10

Extracto de levadura (Difco)	15 g/L
Glucosa	10 g/L
Agua destilada c.s.p.	1 L

15

20 (b) Se procede de la misma forma que en el Ejemplo 1.1.5, pero utilizando un medio de cultivo (fermentador) que tiene la composición siguiente:

25

Extracto de levadura (Difco)	30 g/L
Glucosa	30 g/L
Antiespumante (Struktol)	1 mL
Agua destilada c.s.p.	1 mL

30

35 El cultivo se desarrolla durante 144 horas a 28°C.

La aireación se fija a 1 VVM (un volumen de aire / volumen de cultivo · minuto) y la velocidad de agitación se regula de forma que se mantiene una presión de oxígeno disuelto próxima a 20%. A las 72 horas de duración se añaden 10 g/L de glucosa para prolongar el cultivo. El pH no se regula y evoluciona libremente entre 6,5 y 8.

40

### 1.2. Extracción

#### 1.2.1.

45 Se realiza la extracción sobre 1,5 litros de mosto obtenidos según el Ejemplo 1.1.1.

Se centrifuga a 13.000 vueltas/minuto (27.500 g) durante 20 minutos y se filtra el mosto de fermentación en presencia de 15 g de adyuvante de filtración sobre un filtro prensa. El filtrado obtenido se liofiliza directamente y el residuo seco así obtenido (16,3 g) se vuelve a poner en disolución en 80 mL de agua (pH final = 8,4).

50

La dilución inhibitoria 50 es esta fracción (DI<sub>50</sub>) es 1/4.500.

#### 1.2.2.

55 Se realiza la extracción sobre 10 L de mosto de cultivo obtenidos procediendo según el Ejemplo 1.1.5 y previamente congelados.

Se centrifuga en recipientes de 500 mL a 8.000 RPM (11.000 g) durante 20 min. Se obtienen 9 L de sobrenadante perfectamente límpido.

60

Se concentra cinco veces una muestra alícuota mediante un concentrador Centripep.

La dilución inhibitoria 50 de esta fracción es igual a 1/10.000.

65

#### 1.2.3.

Se realiza la extracción sobre 10 L de mosto previamente congelados y obtenidos en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1.1.5.

## ES 2 316 403 T3

Se realiza la separación en una centrifuga continua de tipo Sharples.

Los 9 L de sobrenadante obtenidos se filtran a través de  $0,2 \mu\text{m}$  para eliminar cualquier traza de biomasa residual.

5 Se obtienen 8,5 L de filtrado. Se concentra cinco veces una muestra alícuota mediante un concentrador Centriprep. La dilución inhibitoria 50 de esta fracción es 1/16.000.

### 1.3. Concentración por ultrafiltración

10

#### 1.3.1. Concentración con membrana de 5 kD

15

Se procede a una ultrafiltración de la disolución del Ejemplo 1.2.1 utilizando una membrana Amicon 5000 en una celda con agitación en tampón fosfato 25 mM, pH = 7,5 que contiene NaCl 150 mM y se obtiene un retenido activo y un permeado totalmente inactivo.

#### 1.3.2. Concentración con membrana de 10 kD

20

Para concentrar los 9 litros de sobrenadante obtenidos en el Ejemplo 2.2 se utiliza una membrana Amicon de 10 kD. Concentrando un factor de 5 se obtienen 1,8 L de concentrado cinco veces más activo ( $DI_{50} = 1/10.000$ ) y un permeado totalmente inactivo.

25

#### 1.3.3. Concentración con membrana de 30 kD

30

Para concentrar los 8,5 L de filtrado obtenidos en el Ejemplo 2.3 se utiliza una membrana Amicon de 30 kD. Concentrando un factor de 5 se obtienen 1,7 L de concentrado hasta cinco veces más activo ( $DI_{50} = 1/10.000$ ) y un permeado que contiene una actividad muy débil (20% de inhibición al 1/250).

### 1.4 Purificación

35

#### 1.4.1. Cromatografía de permeación en gel

Se someten muestras de la disolución del apartado 1.2.1 a cromatografías de permeación en gel utilizando geles diferentes: Sephadex G 25, G 50, G 75 y G 100 y se obtienen los resultados indicados a continuación:

40

La actividad se eluye en el volumen de exclusión sobre Sephadex G 25 y G 50 y muy cerca del volumen de exclusión de G 75.

Sobre el gel Sephadex G 100, la actividad se puede separar de los productos de pesos moleculares más altos ( $> 100 \text{ kD}$ ).

45

En una columna analítica de Superosa 12 (dominio de fraccionamiento de 1 kD a 100 kD), la molécula activa ha mostrado un tiempo de retención comprendido entre el de la ovoalbúmina (44 kD) y el del citocromo (14,4 kD).

50

#### 1.4.2. Ultrafiltración con membrana de 5.000 Daltons de umbral de corte

Se dializan, con 5 volúmenes de tampón fosfato 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 100 mL de un sobrenadante de cultivo ( $DI_{50} 1/3.600$ ) en una celda con agitación magnética, equipada con una membrana Amicon 5000, presurizada con aire comprimido a una presión de  $1 \cdot 10^5 \text{ Pa}$  (1 bar).

55

Se recuperan 100 mL de retenido ( $DI_{50} 1/2.500$ ) liberado de las moléculas de pesos moleculares pequeños y 500 mL de ultrafiltrado de actividad despreciable.

60

#### 1.4.3. Ultrafiltración con membrana de 10.000 Daltons de umbral de corte

Se dializan, con 7 volúmenes de tampón fosfato 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 100 mL de un sobrenadante de cultivo ( $DI_{50} 1/3.600$ ) en una celda con agitación magnética, presurizada a  $1 \cdot 10^5 \text{ Pa}$  (1 bar) con aire comprimido y equipada con una membrana Filtron 10K.

65

Se recuperan 100 mL de retenido que tiene una actividad  $DI_{50}$  de 1/1.500 en la inhibición del acoplamiento sobre el receptor NPY.

## ES 2 316 403 T3

El ultrafiltrado (700 mL) se vuelve a concentrar en una celda del mismo tipo equipada con una membrana Amicon 1000.

Se obtienen 100 mL de disolución que presenta una  $DI_{50}$  de 1/500.

### 1.4.4. Eliminación de las impurezas hidrófobas

Se tratan durante 2 horas, con agitación, 1.500 mL de un sobrenadante de cultivo con 180 g de resina de poliestireno divinilbenceno (XAD2). A continuación se filtra la resina, se lava 2 veces con 300 mL de metanol, después con 300 mL de acetona.

Las disoluciones de metanol y de acetona reunidas se evaporan a vacío. El residuo recogido mediante 40 mL de metanol proporciona una disolución que no presenta actividad.

La disolución acuosa liberada de los productos hidrófobos se liofiliza. El residuo recogido mediante 80 mL de agua proporciona una disolución que tiene una  $DI_{50}$  de 1/4.500 en la inhibición del acoplamiento sobre el receptor NPY.

### 1.4.5. Extracción de la molécula activa por intercambio de cationes

1.500 mL de un sobrenadante de cultivo se ajustan a un pH de 5 con ácido acético N, después se tratan con 120 g de resina de intercambio de cationes (DOWEX 50 WX-4, forma ACO).

Después de una hora de agitación se filtra la resina, después se desorbe mediante 300 mL de amoníaco 1 N durante una media hora. A continuación se liofiliza esta disolución. El residuo obtenido recogido mediante 40 mL de agua proporciona una disolución que, medida la inhibición del acoplamiento sobre el receptor NPY, posee una  $DI_{50}$  de 1/3.600.

Se pueden obtener igualmente disoluciones con actividad antagonista de los receptores del NPY realizando la extracción de los mostos de cultivo de los Ejemplos 1.1.2; 1.1.3; 1.1.4 y 1.1.6 según los Ejemplos de extracción de 1.2.1 a 1.2.3 descritos.

## Ejemplo 2

*Preparación de un extracto resultantes de la cepa Bacillus licheniformis SEBR 2464 (véase X más arriba)*

### 2.1. Fermentación

La fermentación de la cepa *Bacillus licheniformis* SEBR 2464 se ha conducido en 4 medios de cultivo diferentes.

#### 2.1.1

(a) Se propaga la cepa en placas Petri sobre un medio de resembrado que tiene la composición siguiente:

Caldo bacto tróptico de soja (Difco)	40 g
MOPS	2 g
Extracto de levadura (Difco)	5 g
Agar tipo E	20 g
Agua destilada c.s.p.	1 L



## ES 2 316 403 T3

Se incuba el cultivo durante 48 horas a 30°C. Se obtiene a continuación una suspensión de esporas añadiendo en cada placa Petri 15 mL de un medio de recogida apropiado que tiene la composición siguiente:

5	NaCl	9,00 g
	KCl	0,42 g
10	CaCl <sub>2</sub>	0,48 g
	NaHCO <sub>3</sub>	0,20 g
15	Glicerol	150,00 g
	MOPS	3,00 g
20	Agua destilada c.s.p.	1 L

(b) Se utilizan 3 mL de esta suspensión para sembrar 200 mL de medio de cultivo que tiene la composición siguiente:

25	Triptona USP (Difco)	30 g
	Peptona papaínica de soja (Difco)	5 g
30	NaCl	5 g
	Agua destilada c.s.p.	1 L
35	pH = 7	

40 El cultivo se desarrolla a 30°C durante 24 horas en matraces Erlenmeyer de 500 mL agitando a 260 vueltas/minuto.

### 2.1.2.

45 Se utilizan 1,5 mL de suspensión congelada de esporas del lote de siembra secundario para inocular un matraz de 500 mL que contiene 100 mL de medio de cultivo que tiene la composición siguiente:

50	Glucosa	30 g*
	Extracto de levadura (Difco)	10 g
55	MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
60	Disolución de oligoelementos	100 mL
	Agua destilada c.s.p.	1 L
65	*: Glucosa esterilizada aparte	

## ES 2 316 403 T3

en el que la disolución de oligoelementos está constituida por los compuestos siguientes:

5	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,00 g
	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1,00 g
10	CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,025 g
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,10 g
15	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,56 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,02 g
20	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,20 g
	Agua destilada c.s.p.	1 L

25 El cultivo se desarrolla a 30°C con una agitación de 260 RPM. El cultivo se detiene con 15 horas de duración.

### 2.1.3.

30 Se preparan 300 mL de cultivo en matraces agitados de la misma forma que en el Ejemplo 2.1.2 y se utiliza este cultivo para inocular un fermentador de 20 L que contiene 10 L de medio de la misma composición al que se le añade 1 mL/L de Strucktol. El cultivo se desarrolla durante 15 horas a 30°C con una agitación de 260 RPM y una aireación de 0,5 VVM.

### 35 2.1.4

40 (a) Se preparan 5 cultivos en matraces agitados de 1 L que contienen 300 mL de medio que tiene la composición siguiente:

45	Glucosa	30 g
	Extracto de levadura (Difco)	30 g
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
50	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
	Disolución de oligoelementos	10 mL
55	Agua destilada c.s.p.	1 L

60 La disolución de oligoelementos tiene la misma composición que en el Ejemplo 2.1.2.

65

## ES 2 316 403 T3

(b) Los 5 cultivos se desarrollan durante 15 horas a 30°C y 220 RPM, después se reúnen para inocular un fermentador de 75 L que contiene 50 L de medio que tiene la composición siguiente:

5  
10  
15  
20

Glucosa	30 g
Extracto de levadura (Difco)	30 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
Disolución de oligoelementos	20 mL
Strucktol	2 mL
Agua destilada c.s.p.	1 L

25

La disolución de oligoelementos tiene la misma composición que en el Ejemplo 1.1.1. El cultivo se desarrolla a 30°C con una aireación de 0,5 VVM y una agitación regulada de forma que se mantiene una presión de oxígeno disuelto de 20%. A las 7 horas de duración se añade una disolución de glucosa concentrada para prolongar el crecimiento. El cultivo se detiene en la meseta de crecimiento a las 16 horas de duración.

### 2.2. Extracción

30

#### 2.2.1.

Se realiza la extracción sobre 12 L de mosto de cultivo del Ejemplo 2.1.1.

35

Se centrifuga a 3.200 vueltas/minuto (27.500 g) durante 10 min. y se obtienen 11 L de sobrenadante. A estos 11 L de sobrenadante se les adicionan 2,1 kg de resina Amberlite XAD<sub>2</sub> previamente acondicionada mediante metanol y acetona.

40

La mezcla sobrenadante/resina se deja en contacto durante una noche a temperatura ambiente. La resina se filtra a continuación y los productos fijados sobre ella se eluyen sucesivamente mediante dos veces 5 litros de metanol y mediante 5 litros de acetona.

45

Se reúnen las fases orgánicas después de la filtración y se evaporan a vacío hasta sequedad. El residuo de evaporación (46 g) constituye el extracto seco, que se redissuelve en 100 mL de mezcla propilenglicol/agua (50/50).

La fracción así obtenida tiene una  $DI_{50} = 1/3.000$ .

#### 2.2.2.

50

Se realiza la extracción sobre 3,5 L de mosto de cultivo del Ejemplo 2.1.3.

Se sigue el mismo protocolo que en el Ejemplo 2.2.1 pero adaptando las cantidades de resina y de disolvente al volumen del sobrenadante tratado.

55

Se obtienen 11 g de extracto seco que se recogen con 27 mL de mezcla propilenglicol/agua (50/50).

La disolución así obtenida presenta una  $DI_{50} = 1/4.000$ .

#### 2.2.3.

60

Se realiza la extracción sobre 50 L de mosto de cultivo del Ejemplo 2.1.4.

Para separar la biomasa se utiliza un sistema de microfiltración tangencial (0,2  $\mu$ m). Se obtienen 46 L de permeado que se dejan en contacto con 9 kg de resina Amberlite XAD<sub>2</sub> preacondicionada, durante una noche a temperatura ambiente.

65

La resina cargada se filtra a continuación y los productos fijados sobre ella se eluyen mediante dos veces 23 L de metanol y una vez 23 L de acetona. Entre cada elución se separan por filtración la fase orgánica y la resina.

## ES 2 316 403 T3

Se reúnen a continuación las fases orgánicas y se evaporan a vacío hasta sequedad.

Se obtienen 285 g de extracto seco que se recogen con 620 g de mezcla propilenglicol/agua (50/50).

5 La disolución obtenida se filtra a través de 0,2  $\mu\text{m}$  y presente una  $\text{DI}_{50} = 1/8.200$ .

Se puede obtener igualmente una disolución con actividad antagonista del receptor  $\alpha_2$  realizando la extracción del mosto de cultivo del Ejemplo 2.1.2 según el Ejemplo 2.2.3.

### 10 Ejemplo 3

Se prepara la composición siguiente para la aplicación sobre la piel en forma de gel adelgazante.

15	Carbopol 940	0,20 g
	Polietilenglicol	3,00 g
20	Conservantes	0,75 g
	Tween 20	0,50 g
25	Trietanolamina	0,25 g
	Escina	0,50 g
30	Cafeína	0,50 g
	Extracto de Centella asiática	3,00 g
35	Extracto de Ginkgo biloba	3,00 g
	Carnitina	4,00 g
40	Extracto del EJEMPLO 2.2.1	0,10 g
	Extracto seco del EJEMPLO 1.2.1	0,01 g
45	Agua desmineralizada c.s.p.	100,00 g

### Ejemplo 4

50 Se prepara la composición siguiente utilizable para la aplicación sobre la piel como emulsión adelgazante:

55	Carbopol 934	0,300 g
	Trietanolamina	0,520 g
60	Escina	0,500 g
	Alcohol cetílico	1,500 g
	Ésteres grasos fluidos	8,500 g
65	Palmitato de cetilo	2,000 g

## ES 2 316 403 T3

Fitosterol	1,000 g
Alcohol cetílico PoE	0,700 g
Aceite de silicona	2,500 g
Polisorbato 60	1,900 g
Esterato de sorbitán	1,400 g
Propilenglicol	4,000 g
Conservantes	0,700 g
Extracto de bazo	1,000 g
Carnitina	4,000 g
Extracto del EJEMPLO 2.2.1	0,0015 g
Extracto seco del EJEMPLO 1.3.1	0,0010 g
Agua desmineralizada c.s.p.	100,00 g

### Ejemplo 5

Se prepara la composición siguiente utilizable para la aplicación sobre la piel en forma de microemulsión adelgazante:

Cafeína	0,50 g
Escina	0,50 g
Triglicéridos etoxilados	25,70 g
Extracto de bazo	1,00 g
Carnitina	4,00 g
Alcoholes grasos etoxilados	12,00 g
Triglicéridos sintéticos	7,00 g
Aceite de silicona	3,50 g
Éster graso	3,50 g
Conservantes	0,75 g
Extracto seco del EJEMPLO 1.4.3	0,004 g
Extracto del EJEMPLO 2.2.1	0,15 g
Agua desmineralizada c.s.p.	100,00 g

## ES 2 316 403 T3

### Ejemplo 6

Se prepara la composición siguiente para la aplicación sobre la piel en forma de microemulsión adelgazante:

5	Cafeína	1,00 g
	Escina	0,50 g
10	Triglicéridos etoxilados	25,70 g
	Extracto de bazo	1,00 g
15	Carnitina	2,00 g
	Alcoholes grasos etoxilados	12,00 g
20	Triglicéridos sintéticos	8,00 g
	Aceite de silicona	3,50 g
25	Éster graso	3,50 g
	Conservantes	0,75 g
30	Extracto seco del EJEMPLO 1.4.3	0,001 g
	Agua desmineralizada c.s.p.	100,00 g

### 35 Ejemplo 7

40	Carbopol 940	0,20 g
	Polietilenglicol	3,00 g
45	Conservantes	0,75 g
	Tween 20	0,50 g
50	Trietanolamina	0,25 g
	Carnitina	4,00 g
55	Extracto seco del EJEMPLO 1.2.1	0,10 g
	Agua desmineralizada c.s.p.	100, 00 g

### Ejemplo 8

#### 60 *Parche adelgazante*

65	Adhesivo*	c.s.p. 100
	Extracto del EJEMPLO 1.3.2	0,020

## ES 2 316 403 T3

Adhesivo*	c.s.p. 100
Extracto del EJEMPLO 2.2.3	0,001
* El adhesivo puede ser de poliisobuteno, un adhesivo acrílico o de silicona, o cualquier otro adhesivo bio-compatibile.	

### Ejemplo 9

#### *Gel alcohólico*

Alcohol	10,00 g
Carbómero	0,20 g
Glycereth-26	5,00 g
Hidróxido de sodio	0,08 g
Propilcelulosa	0,10 g
Extracto del EJEMPLO 1.3.2	0,02 g
Agua desmineralizada c.s.p.	100,00 g

### Ejemplo 10

#### *Gel alcohólico*

Alcohol	40,00 g
Carbómero	0,50 g
Glycereth-26	5,00 g
Hidróxido de sodio	0,20 g
Propilcelulosa	0,10 g
Extracto del EJEMPLO 1.3.2	0,02 g
Agua desmineralizada c.s.p.	100,00 g

## ES 2 316 403 T3

### Ejemplo 11

#### *Gel/crema adelgazante*

5

Estearato de glicerilo	5,00 g
Alcohol cetílico	1,50 g
Succinato caprílico/cáprico	6,00 g
Aceite de silicona	2,00 g
Parabenos	0,30 g
Goma xantana	0,40 g
Butilenglicol	5,00 g
Fenoxetol	0,70 g
Poliglicerilmetacrilato	3,00 g
Extracto del EJEMPLO 1.3.2	0,02 g
Agua desmineralizada c.s.p.	100,00 g

10

15

20

25

30

35

### Ejemplo 12

#### *Macroemulsión adelgazante*

40

Glicerina	10,000
Aceite mineral	6,000
Pantenol	1,000
Copolímero de acrilatos	0,500
Trietanolamina	0,500
Parabenos	0,300
Fenoxietanol	0,700
Extracto del EJEMPLO 1.3.2	0,020
Agua desmineralizada c.s.p.	100,00 g

45

50

55

60

65



## ES 2 316 403 T3

### Ejemplo 13

#### *Macroemulsión adelgazante*

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Glicerina	5,000
Aceite mineral	2,00
Pantenol	0,500
Copolímero de acrilatos	0,050
Trietanolamina	0,050
Parabenos	0,300
Fenoxietanol	0,700
Extracto del EJEMPLO 1.3.2	0,020
Extracto del EJEMPLO 2.2.3	0,001
Agua desmineralizada c.s.p.	100,00 g

## ES 2 316 403 T3

### REIVINDICACIONES

1. La cepa *Streptomyces sp* SEBR 2794, depositada en la C.N.C.M. del Instituto Pasteur con el número I 1332.

5

2. El procedimiento de preparación de un producto NPY-antagonista, **caracterizado** porque se cultiva una cepa según la reivindicación 1, sobre un medio de fermentación hasta la obtención, en el mosto de fermentación, de una actividad antagonista de los receptores NPY y se recupera el sobrenadante.

10

3. El procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque se liofiliza el sobrenadante y se recupera el liofilizado.

15

4. El procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque se purifica el sobrenadante por cromatografía de permeación en gel o por cromatografía de absorción y se recupera el producto purificado.

20

5. El procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque se purifica el liofilizado por cromatografía de permeación en gel o por cromatografía de absorción y se recupera el producto purificado.

25

6. El uso de la cepa *Streptomyces sp* SEBR 2794 depositada en la C.N.C.M. del Instituto Pasteur con el número I 1332, para la preparación de un componente NPY-antagonista para la preparación de una composición cosmética adelgazante.

30

35

40

45

50

55

60

65