

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 035**

51 Int. Cl.:

**A61Q 19/00** (2006.01)

**A61K 8/97** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2014 PCT/EP2014/051684**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14118207**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2014 E 14702000 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2950887**

54 Título: **Utilización de células vegetales de iridácea inducidas en el tratamiento de las pieles sensibles**

30 Prioridad:

**29.01.2013 FR 1350758**

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

**16.02.2018**

73 Titular/es:

**L'OREAL, S.A. (100.0%)  
14 rue Royale  
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**MARTIN, RICHARD y  
HILAIRE, PASCAL**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 655 035 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Utilización de células vegetales de iridácea inducidas en el tratamiento de las pieles sensibles

- 5 **[0001]** La presente invención concierne al tratamiento cosmético o farmacéutico de las pieles sensibles y de los trastornos relacionados con un exceso de síntesis y/o de liberación del péptido derivado de la calcitonina (conocido con el nombre de Calcitonine Gene Related Peptide o CGRP).
- 10 **[0002]** El CGRP es un elemento químico polipeptídico elaborado y liberado por una transmisión nerviosa. La localización del CGRP es específica de las fibras nerviosas sensoriales (fibras C), numerosos órganos o tejidos reciben las aferencias de las neuronas con CGRP, tales como las glándulas salivales, el estómago, el páncreas, el intestino, el sistema cardiovascular, la glándula tiroidea o la piel.
- 15 **[0003]** Debido a esta distribución ubicua del CGRP, hay numerosos trastornos relacionados con un exceso de síntesis y/o de liberación del CGRP. Particularmente es el caso de las enfermedades respiratorias e inflamatorias, de las enfermedades alérgicas y de los trastornos cutáneos tales como las afecciones dermatológicas que incluyen el eccema, el prurito o la rosácea.
- 20 **[0004]** La utilización de antagonistas del CGRP constituye un tratamiento eficaz en todas las afecciones mencionadas más arriba.
- 25 **[0005]** Por otro lado, la Solicitante ha demostrado que una de las características esenciales de las pieles sensibles está relacionada con la liberación del CGRP. Por consiguiente, la utilización de antagonistas del CGRP puede permitir igualmente la obtención de un efecto preventivo y/o curativo de las pieles sensibles.
- 30 **[0006]** Por "antagonista del CGRP", se entiende aquí cualquier compuesto susceptible de inhibir parcialmente, incluso totalmente, el efecto biológico del CGRP.
- 35 **[0007]** Entre los antagonistas conocidos del CGRP, se pueden mencionar, por ejemplo, el CGRP 8-37 (secuencia de aminoácidos 8 a 37 de la parte N-terminal del CGRP), o incluso los anticuerpos anti-CGRP.
- 40 **[0008]** Por otro lado, la Solicitante ha demostrado en las solicitudes WO 97/09056 y FR 2738486 que un extracto de al menos una iridácea era capaz de disminuir la vasodilatación inducida por la capsaicina y/o por una estimulación eléctrica antidrómica (aplicada sobre un nervio aferente) y/o de provocar una inhibición de la liberación del CGRP por parte de las fibras nerviosas sensoriales y/o de provocar una inhibición de la contracción del músculo liso de los vasos eferentes inducida por el CGRP, por lo tanto podría ser utilizado como antagonista del CGRP, en particular para el tratamiento de las afecciones mencionadas más arriba y de las pieles sensibles.
- 45 **[0009]** Sin embargo, este extracto sólo permite una inhibición parcial del CGRP, del orden del 70 %.
- 50 **[0010]** Por lo tanto, todavía existe una necesidad importante de composiciones que presenten una actividad antagonista del CGRP más importante.
- 55 **[0011]** Por otro lado, el extracto descrito en la solicitud FR 2738486 podría contener compuestos perjudiciales con respecto a la actividad antagonista del CGRP y las moléculas responsables de esta actividad antagonista no eran excretadas en el medio de cultivo, reduciendo por lo tanto la productividad del cultivo.
- 60 **[0012]** Por otro lado, todavía existe una necesidad importante de composiciones que presenten una actividad antagonista del CGRP que puedan ser obtenidas con una importante productividad.
- [0013]** La presente invención es el resultado del descubrimiento inesperado, por parte de los inventores, de que un extracto de *Lactobacillus delbrueckii* spp *lactis* actúa como inductor en las células vegetales de lirio. En efecto, cuando se añade a un cultivo de células desdiferenciadas de lirio, este extracto permite una sobreexpresión de la actividad antagonista del CGRP a la vez intracelular y extracelular de las células de lirio, induciendo una inhibición del CGRP maximizada, del orden del 100 %. Además, la excreción, en el medio exterior, de las moléculas responsables de esta actividad antagonista, permite aumentar de forma importante la productividad del cultivo.
- [0014]** La presente invención concierne por lo tanto a la utilización de un extracto de *Lactobacillus delbrueckii* para inducir una célula vegetal de una iridácea del género *Romulea*, *Crocus*, *Iris*, *Gladiolus*, *Sisyrinchium* o *Hermodactilus*. Igualmente concierne a la utilización de un extracto de *Lactobacillus delbrueckii* para inducir la producción de un antagonista del CGRP por parte de una célula vegetal de una iridácea.

5 **[0015]** La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de inducción de dichas células vegetales de una iridácea que comprende poner en contacto dichas células vegetales de una iridácea con *Lactobacillus delbrueckii* en forma de un extracto en unas condiciones apropiadas para la inducción de la expresión de una actividad antagonista del CGRP.

**[0016]** Igualmente trata sobre un procedimiento de preparación de una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP que comprende las etapas que consisten en:

- 10 a) poner en contacto, en un medio de cultivo, dichas células vegetales de una iridácea con *Lactobacillus delbrueckii* en forma de un extracto en unas condiciones apropiadas para la inducción de la expresión de una actividad antagonista del CGRP,  
 b) eventualmente separar las células vegetales cultivadas en la etapa a) del medio de cultivo, y  
 c) recuperar una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP.

15 **[0017]** La presente invención concierne igualmente a una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP susceptible de ser obtenida mediante este procedimiento de preparación.

20 **[0018]** Igualmente tiene por objeto una composición cosmética que comprende una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP susceptible de ser obtenida mediante este procedimiento de preparación, y un vehículo cosméticamente aceptable.

25 **[0019]** Otro objeto de la presente invención concierne a la utilización de esta composición cosmética para el tratamiento de las pieles sensibles o en el tratamiento anticacna.

**[0020]** La presente invención concierne finalmente a una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP susceptible de ser obtenida mediante el procedimiento de preparación anterior para su utilización en el tratamiento de los trastornos relacionados con un exceso de síntesis y/o de liberación del CGRP.

### 30 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN

Actividad antagonista del CGRP

35 **[0021]** En el contexto de la invención, el término "péptido derivado de la calcitonina" "Calcitonine Gene Related Peptide" o "CGRP" hace referencia a un péptido miembro de la familia de la calcitonina producido en las neuronas centrales y periféricas y que existe, en el hombre, en dos formas, el  $\alpha$ -CGRP y el  $\beta$ -CGRP. El CGRP actúa a través de un receptor heterómero compuesto por un receptor acoplado a una proteína G, denominado "calcitonin receptor-like receptor" o CALCRL, y una proteína que modifica la actividad del receptor o RAMP.

40 **[0022]** Por "antagonista del CGRP" se entiende aquí cualquier compuesto susceptible de inhibir parcialmente, incluso totalmente, el efecto biológico del CGRP. Preferentemente, un antagonista del CGRP o un compuesto que tiene una actividad antagonista del CGRP según la invención es capaz de producir una inhibición de la fijación al receptor del CGRP o de producir una inhibición de la síntesis y/o de la liberación del CGRP por parte de las fibras nerviosas sensoriales. De una forma particularmente preferida, un antagonista del CGRP o un compuesto que tiene  
 45 una actividad antagonista del CGRP según la invención es capaz de producir una inhibición de la fijación al receptor del CGRP. De una forma más preferida, un antagonista del CGRP o un compuesto que tiene una actividad antagonista del CGRP según la invención tiene afinidad por los receptores del CGRP.

Extracto de *Lactobacillus delbrueckii*

50 **[0023]** Por "*Lactobacillus delbrueckii*", se entiende aquí un bacilo grampositivo del género *Lactobacillus*, no móvil, capaz de fermentar los sustratos glucídicos en ácido láctico en unas condiciones anaerobias. Como sabe bien el experto en la materia, la especie *Lactobacillus delbrueckii* incluye 4 subespecies: *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii spp lactis*, *Lactobacillus delbrueckii delbrueckii* y *Lactobacillus delbrueckii*  
 55 *indicus*.

**[0024]** Preferentemente, la subespecie de *Lactobacillus delbrueckii* utilizada en el marco de la invención es *Lactobacillus delbrueckii spp lactis*. *Lactobacillus delbrueckii spp lactis* incluye en particular las cepas ATCC 4797, DSM 20076, NCDO 299, NCIB 7854, DSM 7290 y NCC 88. Preferentemente, la cepa de *Lactobacillus delbrueckii*  
 60 *spp lactis* utilizada en el marco de la invención es la cepa ATCC 4797.

**[0025]** La bacteria *Lactobacillus delbrueckii* utilizada en el marco de la invención puede utilizarse en forma de extractos de bacterias inactivadas o muertas. Preferentemente, la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* se usa en forma inactivada o muerta.

5 **[0026]** En el sentido de la invención, un microorganismo "inactivado" es un microorganismo que ya no es capaz, temporal o definitivamente, de formar colonias en cultivo.

**[0027]** En el sentido de la invención, un microorganismo "muerto" es un microorganismo que ya no es capaz, definitivamente, de formar colonias en cultivo. Los microorganismos muertos o inactivados pueden tener las  
10 membranas celulares intactas o rotas. Así, el término "inactivado" designa igualmente los extractos y los lisados de microorganismos, como se detalla a continuación. La obtención de microorganismos muertos o inactivados puede llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia.

**[0028]** Según un modo de realización ventajoso, las bacterias *Lactobacillus delbrueckii* utilizadas según la  
15 invención están al menos en parte inactivadas o muertas.

**[0029]** Por "bacterias *Lactobacillus delbrueckii* inactivadas al menos en parte" se indica una preparación de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* según la invención que comprende al menos un 80 %, en particular al menos un 85 %, más particularmente al menos un 90 %, incluso al menos un 95 %, o al menos un 99 % de bacterias  
20 *Lactobacillus delbrueckii* inactivadas expresadas en unidades formadoras de colonias (ufc) con respecto a la totalidad de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* vivas no inactivadas contenidas en la preparación inicial antes de ser sometida a un procedimiento de inactivación. El índice de inactivación obtenido depende de las condiciones de aplicación del procedimiento de inactivación, que son ajustadas por el experto en la materia según el índice de inactivación que se quiere obtener. Según un modo de realización, la invención comprende el uso de una  
25 preparación que comprende un 100 % de bacterias *Lactobacillus delbrueckii* inactivadas.

**[0030]** Las bacterias *Lactobacillus delbrueckii* inactivadas convenientes para la invención pueden ser preparadas mediante una irradiación, una inactivación térmica o una liofilización de una preparación de bacterias *Lactobacillus delbrueckii*. Estos procedimientos son conocidos por el experto en la materia.  
30

**[0031]** Las bacterias *Lactobacillus delbrueckii* según la invención son utilizadas en forma de extractos o de lisados que comprenden fracciones y/o metabolitos de estas bacterias.

**[0032]** En el sentido de la invención, el término "fracción" indica un fragmento de dicha bacteria dotado de  
35 una eficacia de inducción por analogía a dicha bacteria completa.

**[0033]** En el sentido de la invención, el término "metabolito" indica cualquier sustancia procedente del metabolismo de las bacterias, y particularmente la secretada por las bacterias consideradas según la invención y dotada igualmente de una eficacia de inducción.  
40

**[0034]** Un extracto o un lisado conveniente para la invención puede ser preparado a partir de bacterias, al final de su fase de crecimiento.

**[0035]** Según la invención, la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* conveniente para la invención se prepara en  
45 forma de un extracto.

**[0036]** Un extracto en el sentido de la invención indica habitualmente un material obtenido como resultado de la destrucción o de la disolución de las células biológicas por un fenómeno denominado de lisis celular, que provoca así la liberación de los constituyentes biológicos intracelulares contenidos de forma natural en las células del  
50 microorganismo considerado. En el sentido de la presente invención, el término "extracto" es utilizado de forma indiferente para indicar la totalidad del lisado obtenido mediante la lisis del microorganismo correspondiente, o únicamente una fracción de este. El extracto utilizado se forma por lo tanto, en su totalidad o en parte, con los constituyentes biológicos intracelulares y los constituyentes de las paredes y las membranas celulares de la bacteria *Lactobacillus delbrueckii*. Ventajosamente, un extracto utilizado para la invención puede ser la totalidad del extracto  
55 obtenido mediante la lisis de la bacteria *Lactobacillus delbrueckii*.

**[0037]** Esta lisis celular puede conseguirse mediante diferentes tecnologías, tales como, por ejemplo, un choque osmótico, un choque térmico, mediante ultrasonidos, o incluso bajo una tensión mecánica de tipo centrifugación o presión.  
60

**[0038]** Más particularmente, este extracto puede obtenerse según el siguiente protocolo: el extracto es

obtenido mediante el paso de un medio que comprende las bacterias *Lactobacillus delbrueckii* por una prensa francesa, seguido preferiblemente por filtraciones en cascada, y preferiblemente una liofilización.

5 **[0039]** Un extracto puede ser utilizado bajo diferentes formas, tal como en forma de una solución o en una forma pulverulenta.

10 **[0040]** Los presentes inventores han demostrado en particular que un extracto de *Lactobacillus delbrueckii spp lactis*, obtenido mediante la técnica descrita más arriba, actúa como inductor sobre las células vegetales de lirio, mientras que otras bacterias grampositivas no tenían esta propiedad.  
Célula vegetal de iridácea

15 **[0041]** La familia de las iridáceas cuenta con aproximadamente 750 especies. Las plantas de esta familia son utilizadas sobre todo por sus propiedades aromáticas y ornamentales. Las células vegetales utilizadas en el marco de la invención proceden de los géneros *Romulea*, *Crocus*, *Iris*, *Gladiolus*, *Sisyrinchium* y *Hermodactylus*. Preferentemente, las células vegetales utilizadas en el marco de la invención son células vegetales de *Iris*.

20 **[0042]** Les células vegetales utilizadas en el marco de la invención pueden provenir más particularmente de *Iris germanica*, de *Iris florentina*, de *Iris pallida*, de *Crocus versicolor*, de *Romulea bulbocodium* o incluso de *Gladiolus communis*. Preferentemente, las células vegetales utilizadas en el marco de la invención provienen de *Iris pallida*.

25 **[0043]** De una forma particularmente preferida, la célula vegetal utilizada en el marco de la invención es una célula desdiferenciada de una iridácea, tal como se define más arriba.

30 **[0044]** Por "célula vegetal desdiferenciada" se entiende aquí cualquier célula vegetal que no presenta ninguno de los caracteres de una especialización particular y es capaz de vivir por sí misma y no depende de otras células. Estas células vegetales desdiferenciadas son eventualmente susceptibles, bajo el efecto de una inducción, de cualquier diferenciación según su genoma.

**[0045]** Las células vegetales utilizadas en el marco de la invención son preferiblemente células vegetales cultivadas *in vitro*.

35 **[0046]** La presión de selección impuesta por las condiciones fisicoquímicas durante el cultivo de las células vegetales *in vitro* permite obtener, en efecto, un material vegetal estandarizado y disponible a lo largo de la totalidad del año, al contrario que las plantas cultivadas *in vivo*.

#### *Procedimiento de inducción*

40 **[0047]** La presente invención concierne a la utilización de *Lactobacillus delbrueckii*, más particularmente de un extracto de *Lactobacillus delbrueckii*, tal como el definido en la sección "*Lactobacillus delbrueckii*" más arriba, para la inducción de una célula vegetal de una iridácea, tal como se define en la sección "*Célula vegetal de iridácea*" más arriba.

45 **[0048]** Igualmente concierne a un procedimiento de inducción de células vegetales de una iridácea que comprende poner en contacto células vegetales de una iridácea, tal como se define en la sección "*Célula vegetal de iridácea*" más arriba, con *Lactobacillus delbrueckii*, preferiblemente con un extracto de *Lactobacillus delbrueckii spp lactis*, tal como el definido en la sección "*Lactobacillus delbrueckii*" más arriba, en unas condiciones apropiadas para la inducción de la expresión de una actividad antagonista del CGRP, tal como se define en la sección "*Antagonista del CGRP*" más arriba.  
50

**[0049]** Por "inducción" se entiende aquí el hecho de inducir, mediante un inductor exógeno, en otro organismo o célula, una vía metabólica poco expresada, o revelar, en otro organismo o célula, vías metabólicas silenciosas.

55 **[0050]** Preferentemente, por "inducción" se entiende aquí la estimulación, por parte de un inductor exógeno, de la actividad antagonista del CGRP, tal como se define en la sección "*Antagonista del CGRP*" más arriba, en otro organismo o célula.

60 **[0051]** Por "inductores" se entienden aquí moléculas u organismos capaces de inducir, en otro organismo, una vía metabólica poco expresada o revelar, en otro organismo, vías metabólicas silenciosas. El experto en la

materia conoce un gran número de inductores e incluyen inductores bióticos, tales como el jasmonato y sus derivados, e inductores abióticos tales como la temperatura, el pH o un choque osmótico.

5 **[0052]** Por "poner en contacto", se entiende aquí incubar, en un mismo medio de cultivo, las células vegetales y la bacteria *Lactobacillus delbrueckii*, según la invención, el extracto de *Lactobacillus delbrueckii*.

10 **[0053]** Por "condiciones apropiadas para la inducción de la expresión de una actividad antagonista del CGRP", se entienden aquí las condiciones de duración y de temperatura, y/o una concentración de bacterias *Lactobacillus delbrueckii*, que permite la inducción de la expresión de una actividad antagonista del CGRP tal como se define en la sección "*Antagonista del CGRP*" más arriba, preferiblemente que permite la inducción de la expresión de una actividad agonista del CGRP que implica una inhibición de más del 80 %, preferiblemente de más del 90 %, preferiblemente de más del 95 %, del 96 %, del 97 %, del 98 %, del 99 %, de la forma más preferida de todas, del 100 %, del receptor del CGRP. Dichas condiciones pueden ser determinadas por el experto en la materia a través de técnicas rutinarias.

15 **[0054]** En efecto, las técnicas que permiten la determinación de la expresión de una actividad antagonista del CGRP son bien conocidas por el experto en la materia, y se describen, por ejemplo, en "Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its role in hipertension", Sarah-Jane Smillie, Susan D. Brain. BHF Centre of Cardiovascular Excellence and Centre for Integrative Biomedicine, Cardiovascular Division, Franklin-Wilkins Building, Waterloo  
20 Campus, King's College London, London SE1 9NH, UK.

**[0055]** Típicamente, la expresión de una actividad antagonista del CGRP puede ser constatada como sigue: se cultivan células HEK transfectadas de forma estable por el receptor hCALCRL y la proteína asociada hRAMP1, y que expresan el gen indicador de la  $\beta$ -lactamasa bajo el control del elemento de respuesta al AMP cíclico (CRE),  
25 preferiblemente en medio DMEM + suero, a 37 °C y un 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células se tratan a continuación con el ligando de referencia CGRP, por ejemplo, a su EC80 (típicamente 0.2 nM final) y con diferentes dosis de las composiciones candidatas. Después de la incubación, preferiblemente entre 2 y 4 horas, por ejemplo, 3 horas, de incubación, a 37 °C y un 5 % de CO<sub>2</sub>, se añade el sustrato de la  $\beta$ -lactamasa. Después de la incubación, por ejemplo, durante 2 horas, típicamente a la temperatura ambiente, se mide la degradación del sustrato de la  $\beta$ -  
30 lactamasa, por ejemplo, con el espectrofotómetro.

**[0056]** Preferentemente, en el procedimiento de inducción según la invención, las células vegetales de una iridácea, tal como se define en la sección "*Célula vegetal de iridácea*" más arriba, se ponen en contacto con *Lactobacillus delbrueckii*, preferiblemente con un extracto de *Lactobacillus delbrueckii spp lactis*, tal como el definido  
35 en la sección "*Lactobacillus delbrueckii*" más arriba, a una concentración de 200  $\mu$ g de extracto / litro de cultivo durante 7 días a una temperatura de 26 °C.

*Preparación de una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP*

40 **[0057]** La presente invención concierne igualmente a la utilización de *Lactobacillus delbrueckii*, en forma de un extracto de *Lactobacillus delbrueckii*, tal como el definido en la sección "*Lactobacillus delbrueckii*" más arriba, para la inducción de la producción de un antagonista del CGRP, tal como se define en la sección "*Antagonista del CGRP*" más arriba, por parte de una célula vegetal de una iridácea, tal como se define en la sección "*Célula vegetal de iridácea*" más arriba.

45 **[0058]** La presente invención concierne igualmente a un procedimiento de preparación de una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP que comprende las etapas que consisten en:

a) poner en contacto, en un medio de cultivo, células vegetales de una iridácea, tal como se define en la sección  
50 "*Célula vegetal de iridácea*" más arriba, con *Lactobacillus delbrueckii*, en forma de un extracto de *Lactobacillus delbrueckii*, tal como se define en la sección "*Lactobacillus delbrueckii*" más arriba, en unas condiciones apropiadas para la inducción de la expresión de una actividad antagonista del CGRP, tales como las definidas en la sección "*Procedimiento de inducción*" más arriba,

b) eventualmente separar las células vegetales cultivadas en la etapa a) del medio de cultivo, y

55 c) recuperar una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP.

**[0059]** Por "poner en contacto" se entiende aquí incubar, en un mismo medio de cultivo, las células vegetales y la bacteria *Lactobacillus delbrueckii*, en forma del extracto de *Lactobacillus delbrueckii*.

60 **[0060]** Por "medio de cultivo" se entiende aquí una solución que comprende todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y la supervivencia de las células vegetales. Dichos medios de cultivo son bien conocidos por el

experto en la materia, y se describen, por ejemplo, en "Plant Culture Media: Formulación and Uses, Edwin F. George, David J. M. Puttock and Heator J. George". Algunos ejemplos de medios de cultivo apropiados para su uso en la invención incluyen el medio descrito en Murashige and Skoog (1962) *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

5 **[0061]** Por "condiciones apropiadas para la inducción de la expresión de una actividad antagonista del CGRP" se entienden aquí las mismas condiciones que las descritas en la sección "Procedimiento de inducción" más arriba.

**[0062]** Cualquier técnica de separación convencional puede ser utilizada para la separación de las células  
10 vegetales del medio de cultivo en la etapa opcional b). Dichas técnicas incluyen, por ejemplo, la centrifugación, la filtración o la decantación.

**[0063]** Por "composición que tiene una actividad antagonista del CGRP" se entiende aquí una mezcla que  
15 comprende moléculas que tienen una actividad antagonista del CGRP, tal como se define en la sección "Antagonista del CGRP" más arriba, producidas por las células vegetales después de haberlas puesto en contacto con *Lactobacillus delbrueckii* en la etapa a) del procedimiento según la invención. Dicha composición puede contener por lo tanto otros compuestos diferentes a los que tienen una actividad antagonista del CGRP, en particular otros compuestos procedentes de la célula vegetal y/o de *Lactobacillus delbrueckii* y/o del medio de cultivo.

20 **[0064]** La naturaleza de las moléculas que tienen esta actividad antagonista del CGRP todavía no ha sido determinada. Sin embargo, la Solicitante ha demostrado que estas moléculas que tienen una actividad antagonista son expresadas únicamente por las células vegetales cultivadas, y no por *Lactobacillus delbrueckii*.

**[0065]** En una forma de realización particular de la invención, la composición que tiene una actividad  
25 antagonista del CGRP recuperada en la etapa c) es un extracto de las células vegetales separadas en la etapa b).

**[0066]** Puede utilizarse cualquier procedimiento de extracción conocido por el experto en la materia para la  
obtención de un extracto de las células vegetales separadas en la etapa b). En particular se pueden mencionar los extractos alcohólicos, particularmente etanólicos, o los extractos hidroalcohólicos. El extracto de células vegetales  
30 puede ser igualmente un extracto acuoso, preparado típicamente poniendo en suspensión las células vegetales separadas en agua osmotizada, preferiblemente en una cantidad equivalente al volumen del cultivo de partida, seguido preferiblemente por el paso por un homogeneizador a alta presión (HHP) típicamente a 1250 Bar, una centrifugación, preferiblemente a 6000 g, durante 20 min a 4 °C, una filtración, por ejemplo, a través de un filtro con un espesor tal como el filtro GFD® y/o el filtro GFF ("Gravity flow fiber"), y una congelación, por ejemplo, a -20 °C.

35 **[0067]** La Solicitante ha demostrado que poniendo en contacto *Lactobacillus delbrueckii* se permite la inducción de la secreción en el medio exterior de las moléculas responsables de la actividad antagonista del CGRP producida por las células vegetales.

40 **[0068]** En una forma de realización particular de la invención, la composición que tiene una actividad antagonista del CGRP recuperada en la etapa c) procede por lo tanto del medio de cultivo separado en la etapa b). Este medio de cultivo puede ser liofilizado, atomizado o concentrado en el estado, o experimentar un fraccionamiento con un tamiz molecular de tipo filtración tangencial, y después tratado siguiendo las técnicas descritas anteriormente.

45 **[0069]** En otro modo de realización particular de la invención, el procedimiento de preparación de una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP no comprende la etapa de separación de las células vegetales cultivadas en la etapa a) del medio de cultivo, y la composición que tiene una actividad antagonista del CGRP recuperada en la etapa c) comprende por lo tanto a la vez el medio de cultivo y las células vegetales  
50 cultivadas e inducidas en la etapa a).

**[0070]** Por "composición que tiene una actividad antagonista del CGRP" se entiende aquí una mezcla que  
comprende moléculas que tienen una actividad antagonista del CGRP, tal como se define en la sección "Antagonista del CGRP" más arriba, producidas por las células vegetales después de ponerlas en contacto con *Lactobacillus delbrueckii* en la etapa a) del procedimiento según la invención. Dicha composición puede contener por lo tanto otros compuestos distintos a los que tienen una actividad antagonista del CGRP, en particular otros compuestos procedentes de la célula vegetal y/o de *Lactobacillus delbrueckii* y/o del medio de cultivo.

60 **[0071]** La presente invención concierne por lo tanto igualmente a una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP susceptible de ser obtenida, preferiblemente obtenida, mediante el procedimiento de preparación según la invención descrito más arriba. Preferentemente, esta composición que tiene una actividad

antagonista del CGRP comprende los compuestos procedentes de *Lactobacillus delbrueckii*.

5 **[0072]** La naturaleza de las moléculas que tienen esta actividad antagonista del CGRP todavía no se ha determinado. Sin embargo, la Solicitante ha demostrado que estas moléculas que tienen una actividad antagonista son expresadas únicamente por las células vegetales cultivadas, y no por *Lactobacillus delbrueckii*.

*Composición cosmética y farmacéutica*

10 **[0073]** La presente invención concierne igualmente a una composición cosmética o farmacéutica que comprende una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP tal como se define en la sección "*Preparación de una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP*" más arriba, y un vehículo cosmética o farmacéuticamente aceptable.

15 **[0074]** Por "vehículo cosméticamente aceptable", se entiende aquí un medio sin un olor o un aspecto desagradable, y que no genera picor, tirones o un enrojecimiento inaceptable para el usuario, durante su administración, en particular durante su aplicación tópica sobre la piel o sus anejos.

20 **[0075]** Por "vehículo farmacéuticamente aceptable", se entiende aquí cualquier disolvente, medio de dispersión, agente retardante de la absorción, etc., que no produce una reacción secundaria, por ejemplo, alérgica, en el ser humano o en un animal. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por el experto en la materia, e incluyen los descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Company, Easton, USA, 1985).

25 **[0076]** El vehículo cosmética o farmacéuticamente aceptable estará adaptado a la vía de administración de la composición cosmética o farmacéutica, en particular a la naturaleza del soporte sobre el cual debe ser aplicada la composición cosmética o farmacéutica, así como a la forma bajo la cual la composición cosmética o farmacéutica está destinada a ser acondicionada, particularmente un sólido o un fluido a la temperatura ambiente y a la presión atmosférica.

30 **[0077]** Según la invención, la composición que tiene una actividad antagonista del CGRP, tal como se define en la sección "*Preparación de una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP*" más arriba, es utilizada en una cantidad que representa entre el 0,001 % y el 20 % del peso total de la composición cosmética o farmacéutica, y preferiblemente en una cantidad que representa entre el 0,1 % y el 10 % del peso total de la composición cosmética o farmacéutica.

35 **[0078]** La composición cosmética o farmacéutica según la invención puede ser ingerida, inyectada o aplicada sobre la piel (sobre cualquier zona cutánea del cuerpo), el cabello, las uñas o las mucosas (bucal, malar, gingival, genital, conjuntiva). Según el modo de administración, la composición cosmética o farmacéutica según la invención puede presentarse en cualquiera de las formas galénicas utilizadas normalmente.

40 **[0079]** Para una aplicación tópica sobre la piel, la composición cosmética o farmacéutica según la invención puede tener la forma particularmente de una solución acuosa u oleosa o de una dispersión de tipo loción o suero, de emulsiones de consistencia líquida o semilíquida de tipo leche, obtenidas mediante la dispersión de una fase grasa en una fase acuosa (H/E) o a la inversa (E/H), o de suspensiones o emulsiones con una consistencia blanda de tipo crema o gel acuoso o anhidro, o incluso de microcápsulas o micropartículas, o de dispersiones vesiculares de tipo iónico y/o no iónico. Estas composiciones cosméticas o farmacéuticas se preparan según los procedimientos habituales.

45 **[0080]** Igualmente pueden ser utilizadas para el cabello en forma de soluciones acuosas, alcohólicas o hidroalcohólicas, o en forma de cremas, de geles, de emulsiones, de espumas o incluso en forma de composiciones para aerosol que comprenden igualmente un agente propulsor a presión.

50 **[0081]** Para su inyección, la composición cosmética o farmacéutica según la invención puede presentarse en forma de loción acuosa, oleosa o en forma de un suero. Para los ojos, puede presentarse en forma de gotas, y para su ingestión puede presentarse en forma de cápsulas, granulados, jarabes o comprimidos

**[0082]** Las cantidades de los diferentes constituyentes de las composiciones cosméticas o farmacéuticas según la invención son las utilizadas clásicamente en los ámbitos considerados.

60 **[0083]** Estas composiciones constituyen particularmente cremas de limpieza, de protección, de tratamiento o de cuidado para el rostro, para las manos, para los pies, para los grandes surcos anatómicos o para el cuerpo (por

ejemplo cremas de día, cremas de noche, cremas desmaquillantes, cremas de base de maquillaje, cremas antisolares), bases de maquillaje fluidas, leches de desmaquillaje, leches corporales de protección o de cuidado, leches antisolares, lociones, geles o espumas para el cuidado de la piel, como lociones de limpieza, lociones antisolares, lociones de bronceado artificial, composiciones de baño, composiciones desodorantes que comprenden un agente bactericida, geles o lociones para después del afeitado, cremas depilatorias, composiciones contra las picaduras de insectos, composiciones analgésicas, composiciones para el tratamiento de ciertas enfermedades de la piel, eccema, úlceras en las piernas, rosácea, psoriasis, líquenes, pruritos graves, pústulas o estrías.

5  
10 **[0084]** Las composiciones cosméticas o farmacéuticas según la invención pueden consistir igualmente en preparaciones sólidas constituyentes de jabones o de toallitas limpiadoras.

**[0085]** Las composiciones cosméticas o farmacéuticas según la invención también pueden estar acondicionadas en forma de una composición para aerosol que comprende igualmente un agente propulsor a presión.

15  
20 **[0086]** La composición que tiene una actividad antagonista del CGRP utilizada según la invención también puede ser incorporada en diversas composiciones para tratamientos capilares, y particularmente en champús, lociones de moldeado, lociones tratantes, cremas o geles de peinado, composiciones de tintes (particularmente, tintes de oxidación) eventualmente en forma de champús colorantes, lociones reestructurantes del cabello, composiciones de permanente (particularmente, composiciones para el primer paso de una permanente), lociones o geles anticaída, champús antiparasitarios, etc.

25 **[0087]** Las composiciones cosméticas o farmacéuticas según la invención también pueden tener un uso bucodental, por ejemplo, una pasta dentífrica. En este caso, pueden contener los coadyuvantes y los aditivos habituales para las composiciones de uso bucal, y particularmente agentes tensioactivos, agentes espesantes, agentes humectantes, agentes de pulido tales como sílice, diversos principios activos como fluoruros, en particular fluoruro de sodio, y eventualmente agentes edulcorantes como sacarinato de sodio.

30 **[0088]** Cuando la composición cosmética o farmacéutica según la invención es una emulsión, la proporción de la fase grasa puede variar entre el 5 % y el 80 % en peso, y preferiblemente entre el 5 % y el 50 % en peso con respecto al peso total de la composición. Los aceites, las ceras, los emulsionantes y los coemulsionantes utilizados en la composición en forma de emulsión se eligen entre los utilizados de forma clásica en el ámbito cosmético. El emulsionante y el coemulsionante están presentes preferiblemente, en la composición cosmética o farmacéutica, en una proporción que varía entre el 0,3 % y el 30 % en peso, y de una forma ventajosa preferida entre el 0,5 y el 20 % en peso con respecto al peso total de la composición cosmética o farmacéutica. Además, la emulsión puede contener vesículas lipídicas.

35  
40 **[0089]** Cuando la composición cosmética o farmacéutica según la invención es una solución o un gel oleoso, la fase grasa puede representar más del 90 % del peso total de la composición cosmética o farmacéutica.

**[0090]** De forma conocida, la composición cosmética puede contener igualmente los coadyuvantes habituales del ámbito cosmético, tales como gelificantes hidrófilos o lipófilos, aditivos hidrófilos o lipófilos, conservantes, antioxidantes, disolventes, perfumes, cargas, filtros, absorbentes del olor y sustancias colorantes. Las cantidades de estos diferentes coadyuvantes son las utilizadas de forma clásica en el ámbito cosmético, y, por ejemplo, de entre el 45 0,01 % y el 10 % del peso total de la composición cosmética. Estos coadyuvantes, según su naturaleza, pueden ser introducidos en la fase grasa, en la fase acuosa y/o en vesículas lipídicas.

**[0091]** Como los aceites o las ceras en la invención, se pueden mencionar los aceites minerales (aceite de vaselina), los aceites vegetales (fracción líquida de la manteca de karité, aceite de girasol), los aceites animales (perhidroescualeno), los aceites sintéticos (aceite de Purcelin), los aceites o las ceras siliconadas (ciclometicona) y los aceites fluorados (perfluoropoliéteres), las ceras de abeja, de carnaúba o parafina. A estos aceites se pueden añadir alcoholes grasos y ácidos grasos (ácido esteárico).

50 **[0092]** Como los emulsionantes utilizables en la invención, se pueden mencionar, por ejemplo, el estearato de glicerol, el polisorbato 60 y la mezcla de PEG-6/PEG-32/estearato de glicol vendida con la denominación de Tefose® 63 por la compañía Gattefosse.

**[0093]** Como los disolventes utilizables en la invención, se pueden mencionar los alcoholes inferiores, particularmente el etanol y el isopropanol, o el propilenglicol.

60 **[0094]** Como los gelificantes hidrófilos utilizables en la invención, se pueden mencionar los polímeros

carboxivinílicos (carbómero), los copolímeros acrílicos tales como los copolímeros de acrilatos/acrilatos de alquilo, las poliacrilamidas, los polisacáridos tales como hidroxipropil celulosa, las gomas naturales y las arcillas, y, como gelificantes lipófilos, se pueden mencionar las arcillas modificadas, como las bentonas, las sales metálicas de ácidos grasos como los estearatos de aluminio y la sílice hidrófoba, etil celulosa, polietileno.

5

**[0095]** La composición cosmética según la invención puede contener otros principios activos hidrófilos, como proteínas o hidrolizados de proteína, aminoácidos, polioles, urea, alantoína, azúcares y derivados de azúcar, vitaminas hidrosolubles, extractos vegetales e hidroxiácidos.

10 **[0096]** Como principios activos lipófilos, se pueden mencionar el retinol (vitamina A) y sus derivados, el tocoferol (vitamina E) y sus derivados, los ácidos grasos esenciales, las ceramidas, los aceites esenciales, el ácido salicílico y sus derivados.

**[0097]** Según la invención, se puede asociar, entre otras, al menos una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP tal como se define en la sección *"Preparación de una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP"* más arriba a otros agentes activos destinados particularmente a la prevención y/o al tratamiento de afecciones cutáneas. Entre estos agentes activos, se pueden mencionar, como ejemplo:

20 - los agentes que modulan la diferenciación y/o la proliferación y/o la pigmentación cutánea, tales como el ácido retinoico y sus isómeros, el retinol y sus ésteres, la vitamina D y sus derivados, los estrógenos tales como el estradiol, el ácido kójico o la hidroquinona;

- los antibacterianos tales como el fosfato de clindamicina, la eritromicina o los antibióticos de la clase de las tetraciclinas;

- los antiparasitarios, en particular el metronidazol, el crotamiton o los piretrinoideos;

25 - los antifúngicos, en particular los compuestos que pertenecen a la clase de los imidazoles tales como el econazol, el ketoconazol o el miconazol o sus sales, los compuestos polienos, tales como la anfotericina B, los compuestos de la familia de las alilaminas, tales como la terbinafina;

- los agentes antivíricos tales como el aciclovir;

30 - los agentes antiinflamatorios, en particular los agentes antiinflamatorios esteroideos, tales como la hidrocortisona, el valerato de betametasona o el propionato de clobetasol, o los agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como el ibuprofeno y sus sales, el diclofenaco y sus sales, el ácido acetilsalicílico, el paracetamol o el ácido glicirretínico;

- los agentes anestésicos tales como el clorhidrato de lidocaína y sus derivados;

- los agentes antipruriginosos como la tenaldina, la trimeprazina o la ciproheptadina;

35 - los agentes queratolíticos tales como los ácidos alfa- y beta-hidroxicarboxílicos o beta-cetocarboxílicos, sus sales, amidas o ésteres, y más particularmente los hidroxiácidos tales como el ácido glicólico, el ácido láctico, el ácido salicílico, el ácido cítrico y de forma general los ácidos de frutas, y el ácido n-octanoil-5-salicílico;

- los agentes anti-radicales o anti-radicales libres, tales como el alfa-tocoferol o sus ésteres, las dismutasas de superóxido, ciertos quelantes de metales o el ácido ascórbico y sus ésteres;

40 - los agentes calmantes tales como las bacterias filamentosas o los extractos de bacterias filamentosas como *Vitreoscilla filiformis* según se describe en la patente EP 761204 y comercializado por Chimex con la denominación Mexoril SBG®;

- los antiseborreicos tales como la progesterona;

- los anticaspa como el octopirox o la piritiona de zinc;

- los antiacneicos como el ácido retinoico o el peróxido de benzoílo;

45 - las vitaminas y sus derivados o precursores, solas o en mezclas;

- los agentes antioxidantes;

- los filtros UV hidrófilos o insolubles en agua y en aceite;

- los filtros UV inorgánicos;

- los agentes autobronceadores;

50 - los agentes anti-glicación;

- los inhibidores de la sintasa de NO;

- los agentes estimulantes de la síntesis de macromoléculas dérmicas o epidérmicas y/o que impiden su degradación;

- los agentes estimulantes de la proliferación de los fibroblastos;

55 - los agentes estimulantes de la proliferación de los queratinocitos;

- los agentes dermorrelajantes;

- los agentes tensores;

- los agentes matificantes;

- los agentes descamantes;

60 - los agentes hidratantes;

- los agentes que actúan sobre el metabolismo energético de las células;

- los agentes repelentes de insectos;
- los antagonistas de las sustancias P;
- los agentes antiarrugas;
- los agentes anti-fotoenvejecimiento;
- 5 - los agentes colorantes;
- los agentes nacarantes; y
- los pigmentos.

**[0098]** Así, según un modo particular, la invención concierne a una composición cosmética o farmacéutica que comprende una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP tal como se define en la sección "Preparación de una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP" más arriba, a un vehículo cosmética o farmacéuticamente aceptable, y al menos, a un agente elegido entre agentes antibacterianos, antiparasitarios, antifúngicos, antibióticos, antiinflamatorios, antipruriginosos, anestésicos, queratolíticos, anti-radicales libres, calmantes, anti-seborreicos, anticaspa, antiacneicos y/o los agentes que modulan la diferenciación y/o la proliferación y/o la pigmentación cutánea.

*Utilización cosmética*

**[0099]** La Solicitante ha demostrado que una de las características esenciales de las pieles sensibles está relacionada con la liberación del CGRP, y por lo tanto, que la utilización de las composiciones que una actividad antagonista del CGRP podría permitir la obtención de un efecto preventivo y/o curativo de las pieles sensibles.

**[0100]** La presente invención concierne por lo tanto a la utilización de una composición cosmética tal como se define en la sección "*Composición cosmética o farmacéutica*" más arriba, para el tratamiento de las pieles sensibles.

**[0101]** Como se recuerda en la solicitud europea EP 0723774, las pieles sensibles pueden clasificarse en dos grandes formas clínicas, las pieles irritables y/o reactivas, y las pieles intolerantes.

**[0102]** Una piel irritable y/o reactiva es una piel que reacciona con un prurito, es decir, con comezón o picazón, ante diferentes factores tales como el medio ambiente, las emociones, los alimentos, el viento, la fricción, el rasurado, el jabón, los tensioactivos, el agua dura con una elevada concentración calcárea, las variaciones en la temperatura o la lana. En general, estos signos están relacionados con una piel seca con o sin postillas, o con una piel que presenta un eritema.

**[0103]** Una piel intolerante es una piel que reacciona con una sensación de calor, de tirones, de hormigueos y/o de enrojecimiento, ante diferentes factores tales como el medio ambiente, las emociones, los alimentos. En general, estos signos están relacionados con una piel hiperseborreica o acneica con o sin postillas, y con un eritema.

**[0104]** Por otro lado, en ciertas regiones anatómicas como los grandes surcos (las regiones inguinales, genitales, axilares, poplíteas, anal, submamaria, pliegues del codo) y los pies, la piel sensible se traduce en sensaciones pruriginosas y/o en sensaciones disestésicas (calor, picores) relacionadas en particular con el sudor, la fricción, la lana, los tensioactivos, el agua dura con una elevada concentración calcárea y/o las variaciones en la temperatura.

**[0105]** La Solicitante ha demostrado que una composición cosmética que comprende una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP tal como se define en la sección "*Antagonista del CGRP*" más arriba permite evitar la irritación y/o las sensaciones disestésicas y/o los pruritos de la piel y/o de las mucosas y/o el eritema.

**[0106]** De forma más precisa, la invención permite el tratamiento de los síntomas de origen neurógeno, debidos a un agente exógeno susceptible de modificar las constantes biofísicas y bioquímicas del tejido implicado (piel, mucosas).

**[0107]** Por otro lado, una piel sensible es una piel que reacciona más fácilmente que otras ante los factores externos. Cualquier irritación de una piel sensible comienza con unos signos subjetivos (picores, calor,...) antes de llegar a la inflamación.

**[0108]** La presente invención tiene por lo tanto también por objeto la utilización, en particular cosmética, de una composición cosmética tal como se define en la sección "*Composición cosmética o farmacéutica*" más arriba, para la prevención y/o la lucha contra las irritaciones cutáneas y/o las postillas y/o los eritemas y/o las sensaciones de calor y/o de disestesia y/o los pruritos de la piel y/o de las mucosas.

**[0109]** Los cueros cabelludos "sensibles" tienen una semiología clínica más unívoca: las sensaciones de prurito y/o de picor y/o de calor son esencialmente desencadenadas por factores locales, tales como fricción, jabón, tensioactivos, agua con una elevada concentración calcárea, champús o lociones. Estas sensaciones también son desencadenadas a veces por factores tales como el medio ambiente, las emociones y/o los alimentos. Un eritema y una hiperseborrea del cuero cabelludo, así como la caspa, son observados frecuentemente en los individuos que tienen dicho cuero cabelludo "sensible".

**[0110]** La presente invención concierne por lo tanto igualmente a la utilización, en particular cosmética, de una composición cosmética tal como se define en la sección "*Composición cosmética o farmacéutica*" más arriba, en el tratamiento anticasca.

**[0111]** La presente invención concierne igualmente a un procedimiento de tratamiento cosmético no terapéutico de las pieles sensibles, en el que se aplica sobre la piel, sobre el cuero cabelludo y/o sobre las mucosas, una cantidad cosméticamente eficaz de una composición cosmética tal como se define en la sección "*Composición cosmética o farmacéutica*" más arriba.

**[0112]** La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de tratamiento anticasca, en el que se aplica sobre el cuero cabelludo una cantidad cosméticamente eficaz de una composición cosmética tal como se define en la sección "*Composición cosmética o farmacéutica*" más arriba.

**[0113]** Por "cantidad cosméticamente eficaz", se entiende aquí una cantidad suficiente de los agentes utilizados en el marco de la invención con el fin de tratar y/o de prevenir dicho problema cosmético, que no produce efectos secundarios inaceptables para el usuario.

**[0114]** Los procedimientos de tratamiento cosmético de la invención pueden ser utilizados particularmente mediante la aplicación de las composiciones cosméticas tales como las definidas más arriba en la sección "*Composición cosmética o farmacéutica*", según la técnica habitual de estas composiciones. Por ejemplo: la aplicación de cremas, de geles, de sueros, de lociones, de leches de desmaquillado o de composiciones para después del sol sobre la piel o sobre el cabello seco, la aplicación de una loción para el cabello sobre cabellos mojados, de champús, o incluso la aplicación de un dentífrico en las encías.

#### *Utilización terapéutica*

**[0115]** Debido a la distribución ubicua del CGRP, hay numerosos trastornos relacionados con un exceso de síntesis y/o de liberación del CGRP. Particularmente se trata de enfermedades respiratorias e inflamatorias, de enfermedades alérgicas y de trastornos cutáneos, particularmente de afecciones dermatológicas tales como eccema, prurito o rosácea.

**[0116]** La presente invención concierne por lo tanto igualmente a una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP, tal como se define en la sección "*Preparación de una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP*" más arriba, para su utilización en el tratamiento de los trastornos relacionados con un exceso de síntesis y/o de liberación del CGRP.

**[0117]** También concierne a la utilización de una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP, tal como se define en la sección "*Preparación de una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP*" más arriba, para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de los trastornos relacionados con un exceso de síntesis y/o de liberación del CGRP.

**[0118]** Igualmente concierne a un procedimiento de tratamiento de los trastornos relacionados con un exceso de síntesis y/o de liberación del CGRP en un sujeto, en el que se administra, a un sujeto que la necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica tal como se define en la sección "*Composición cosmética o farmacéutica*" más arriba.

**[0119]** Por "cantidad terapéuticamente eficaz", se entiende aquí una cantidad suficiente de los agentes utilizados en el marco de la invención para el tratamiento y/o la prevención de dicha enfermedad, con una proporción de riesgo/beneficio razonable aceptable para cualquier tratamiento médico. No obstante, se comprenderá que la dosis específica terapéuticamente eficaz para un paciente en particular dependerá de diversos factores que incluyen la enfermedad que se va a tratar, la gravedad de la enfermedad, la actividad de los agentes específicos empleados,

la composición específica empleada, la duración del tratamiento, la edad, el peso y el estado del sujeto tratado, así como los factores análogos bien conocidos en el ámbito médico.

**[0120]** Los trastornos relacionados con un exceso de síntesis y/o de liberación del CGRP se eligen en particular entre el grupo constituido por enfermedades respiratorias e inflamatorias, enfermedades alérgicas y enfermedades dermatológicas tales como eccema, prurito, rosácea, pruritos graves, acné, úlceras en las piernas, psoriasis, pústulas y estrías.

**[0121]** Preferentemente, el trastorno relacionado con un exceso de síntesis y/o de liberación del CGRP tratado en el marco de la invención es una enfermedad dermatológica tal como eccema, prurito, rosácea, pruritos graves, acné, úlceras en las piernas, psoriasis, pústulas y estrías. De una forma ventajosa preferida, el trastorno relacionado con un exceso de síntesis y/o de liberación del CGRP tratado en el marco de la invención se elige entre el grupo constituido por eccema, prurito y rosácea. De la forma más preferida de todas, el trastorno relacionado con un exceso de síntesis y/o de liberación del CGRP tratado en el marco de la invención es la rosácea.

**[0122]** En la descripción y en los siguientes ejemplos, salvo que se indique lo contrario, los porcentajes son porcentajes en peso y los intervalos de valores indicados con la forma "entre ... y..." incluyen los extremos inferior y superior precisados.

## 20 EJEMPLOS

### **Ejemplo 1: preparación del inductor**

**[0123]** Este ejemplo muestra un procedimiento de preparación de un extracto de *Lactobacillus delbrueckii spp lactis* que puede ser utilizado para usar la invención.

**[0124]** El *Lactobacillus delbrueckii spp lactis* es cultivado en un medio tradicional denominado MRS.

**[0125]** Al final del crecimiento, las células se someten a un paso por la prensa francesa. Después de una filtración en cascada, el extracto es liofilizado.

### **Ejemplo 2: preparación de extractos de células vegetales desdiferenciadas de lirio**

**[0126]** Este ejemplo muestra un procedimiento de preparación de un extracto de células vegetales desdiferenciadas de lirio que puede ser utilizado para usar la invención.

a) Cultivo de las células vegetales desdiferenciadas de lirio

**[0127]**

40 - Medio de cultivo: Murashige & Skoog ácido naftalenacético (ANA) 2 y kinetina 0,6, sacarosa 20 g/l.  
 - Cultivo en Erlenmeyer: volumen de cultivo de 400 ml. El cultivo se lleva a cabo a 26 °C, con una agitación de 100 rpm durante 15 días.  
 - Cultivo en un fermentador de 10 l: fermentador de 10 litros reales, pH no regulado, pO<sub>2</sub> del 15 % regulada por aire.  
 45 El cultivo se lleva a cabo a 26 °C con una agitación de 100 rpm (Rushton).

**[0128]** En 14 días de Batch se obtienen 120 g de peso frasco de células / litro, es decir, 8 g del peso seco / litro.

50 **[0129]** 7 días después de la siembra del fermentador con el precultivo de células de *Iris pallida*, se introduce el inductor en solución acuosa de forma estéril en el fermentador. El cultivo se mantiene en las mismas condiciones durante 7 días.

b) Extracción de las células vegetales desdiferenciadas de lirio producidas en a)

55

**[0130]** El cultivo es filtrado a través de un filtro Nilon con una porosidad de 50 µm para recuperar la biomasa y eliminar el medio de cultivo condicionado.

**[0131]** La biomasa se pone de nuevo en suspensión en agua osmotizada, en una cantidad equivalente al

cultivo de partida.

**[0132]** La suspensión se pasa por el homogeneizador de alta presión (HHP) en microfluído a 1250 Bar, después se centrifuga a 6000 g durante 20 min, a 4 °C, y se filtra a través de GFD y de GFF.

5

**[0133]** El producto final se congela a continuación a -20 °C y se liofiliza.

**[0134]** Así se obtienen entre 2,5 y 3,5 g de extracto / 100 g de células frescas, es decir, entre 3 y 4 g/l de cultivo

10

**Ejemplo 3: constatación del efecto inductor de *Lactobacillus delbrueckii***

**[0135]** Este ejemplo muestra que la utilización de un extracto de *Lactobacillus delbrueckii spp lactis* permite la inducción de la expresión y la secreción de una actividad antagonista del CGRP por parte de las células vegetales desdiferenciadas de lirio.

15

Material y procedimientos

**[0136]** Los extractos de lirio, preparados según el Ejemplo 2, puestos en contacto o no con diferentes dosis de extractos de *Lactobacillus delbrueckii spp lactis* preparados según el Ejemplo 1, han sido ensayados sobre la línea celular HEK transflectada de forma estable por el receptor hCALCRL y la proteína asociada hRAMP1. Esta línea expresa el gen indicador de la β-lactamasa bajo el control del elemento de respuesta al AMP cíclico (CRE).

20

**[0137]** Composición del medio de cultivo:

25

- 500 ml de medio DMEM a 4,5 g/l (Glucosa)
- 50 ml de suero dializado
- 12,5 ml de Hepes (1 M)
- 5 ml de peni/Strepto/fungizone (100X)

30

**[0138]** Los extractos se han diluido extemporáneamente en 1 ml de medio de cultivo completado con un 1 % de DMSO y un 0,1 % de ácido plurónico, es decir, una concentración inicial de 20 mg/ml.

**[0139]** Para algunas muestras la solubilización no ha sido completa, y por lo tanto se han puntuado visualmente:

35

- « OK »: solubilización total.
- « Suspensión »: mezcla homogénea de pequeñas partículas del mismo tamaño.
- « Particular »: mezcla no homogénea de partículas de tamaños diferentes.

40

**[0140]** Las células se han sembrado la víspera en placas de 384 pocillos y se han incubado a 37 °C y un 5 % de CO<sub>2</sub>.

**[0141]** Después de 24 horas, las células se han tratado con el ligando de referencia CGRP a su EC80 (0,2 nM final) y las dosis respuesta de los extractos que se van a ensayar. Los extractos se han diluido previamente en dosis-respuesta sobre 10 puntos, a 2000 mg/ml final para la primera concentración, y diluciones sucesivas a ¼.

45

**[0142]** Después de 3 horas de incubación a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub>, se ha añadido el sustrato de la β-lactamasa.

50

**[0143]** Después de 2 horas de incubación a la temperatura ambiente, se han leído las placas con un espectrofotómetro.

**[0144]** Los datos se han normalizado entre el 0 % y el 100 % de actividad, gracias a los blancos incluidos en la placa. Se han trazado las curvas de dosis-respuesta con la ayuda del programa informático XLfit, las IC50 se expresan en µg/ml.

55

Resultados

[0145] La siguiente **tabla 1** presenta los resultados obtenidos.

**Tabla 1:** actividad antagonista del CGRP expresada por las células vegetales de lirio puestas en contacto con *L. delbrueckii*

Fuente	Lote	Concentración de <i>L. delbrueckii</i>	IC50 (µg/ml)	% de inhibición	Solubilización
Medio condicionado	1	0	75	96	particular
Medio condicionado	2	0	10	94	particular
Medio condicionado	1	0,1 %	35	97	particular
Medio condicionado	2	0,1 %	1,8	112	particular
Medio condicionado	1	0,15 %	30	104	particular
Medio condicionado	2	0,15 %	39	95	particular
Medio condicionado	1	0,20 %	2,7	97	particular
Medio condicionado	2	0,20 %	1,1	90	suspensión
Medio virgen		0	N/A	N/A	OK
Medio virgen		0,1 %	N/A	N/A	OK
Medio virgen		0,15 %	N/A	N/A	OK
Medio virgen		0,20 %	N/A	N/A	OK
Células vegetales desdiferenciadas	1	0	1,4	112	particular
Células vegetales desdiferenciadas	2	0	2,9	105	suspensión
Células vegetales desdiferenciadas	1	0,1 %	4,6	91	suspensión
Células vegetales desdiferenciadas vegetales	2	0,1 %	4,1	97	particular
Células vegetales desdiferenciadas	1	0,15 %	4,9	96	suspensión
Células vegetales desdiferenciadas	2	0,15 %	5,6	105	suspensión
Células vegetales desdiferenciadas	1	0,20 %	0,5	111	particular
Células vegetales desdiferenciadas	2	0,20 %	0,6	107	particular

5

[0146] El medio condicionado es un medio que ha estado en contacto con las células vegetales.

[0147] El medio virgen es el medio antes de la siembra, que no ha estado en contacto con las células vegetales.

10

[0148] Estos resultados demuestran por lo tanto que la adición del inductor *L. delbrueckii* a la concentración de 0,2 % se traduce en una ganancia de actividad con respecto a los blancos sin inductor. Por el contrario, el inductor *L. delbrueckii* solo no presenta actividad.

15

[0149] Así, la Solicitante ha preparado una técnica de inducción para las células vegetales que permite a la vez la producción intracelular e igualmente la excreción del principio activo antagonista del CGRP de una forma extracelular, aumentando mediante la misma los rendimientos de producción en al menos un factor de 2.

**Ejemplo 4: comparación de la eficacia de *Lactobacillus delbrueckii* con respecto a otros inductores**

20

Material y procedimientos

**[0150]** Se han ensayado varios inductores "tradicionales" de lirio: el metil-jasmonato, la quitina y el alginato, así como otros inductores "no tradicionales": CaCl<sub>2</sub>, *Stafilococcus epidermidis*, *Lactobacillus delbrueckii*, β-D-glucano, AlCl<sub>3</sub> y SrCl<sub>2</sub>.

5 **[0151]** Todos los inductores se han ensayado a 3 concentraciones y por triplicado sobre las células vegetales desdiferenciadas de lirio preparadas según el Ejemplo 2.

**[0152]** La actividad antagonista del CGRP se ha medido según se describe en el Ejemplo 3.

10 Resultados

**[0153]** La siguiente **tabla 2** presenta los resultados obtenidos.

15 **Tabla 2:** actividad antagonista del CGRP expresada por las células vegetales de lirio puestas en contacto con diferentes inductores

Inductor	Concentración	Fuente	% de inhibición
-	-	Intracelular	51
-	-	Intracelular	32
Metil-jasmonato	20 mM	Intracelular	57
Metil-jasmonato	20 mM	Extracelular	4
Metil-jasmonato	100 mM	Intracelular	54
Metil-jasmonato	100 mM	Extracelular	5
Metil-jasmonato	500 mM	Intracelular	55
Metil-jasmonato	500 mM	Extracelular	0
Quitina	0,2 g/l	Intracelular	57
Quitina	0,2 g/l	Extracelular	10
Quitina	1 g/l	Intracelular	42
Quitina	1 g/l	Extracelular	12
Quitina	5 g/l	Intracelular	37
Quitina	5 g/l	Extracelular	0
Alginato	0,2 g/l	Intracelular	60
Alginato	0,2 g/l	Extracelular	39
Alginato	1 g/l	Intracelular	53
Alginato	1 g/l	Extracelular	61
Alginato	5 g/l	Intracelular	61
Alginato	5 g/l	Extracelular	16
<i>S. epidermidis</i>	0,20 %	Intracelular	54
<i>S. epidermidis</i>	0,20 %	Extracelular	9
<i>S. epidermidis</i>	1 %	Intracelular	50
<i>S. epidermidis</i>	1 %	Extracelular	14
<i>S. epidermidis</i>	5 %	Intracelular	50
<i>S. epidermidis</i>	5 %	Extracelular	16
CaCl <sub>2</sub>	0,20 %	Intracelular	42
CaCl <sub>2</sub>	0,20 %	Extracelular	57
CaCl <sub>2</sub>	1 %	Intracelular	49
CaCl <sub>2</sub>	1 %	Extracelular	68

CaCl <sub>2</sub>	5 %	Intracelular	69
CaCl <sub>2</sub>	5 %	Extracelular	70
β-D-glucano	0,2 g/l	Intracelular	83
β-D-glucano	0,2 g/l	Extracelular	1
β-D-glucano	0,8 g/l	Intracelular	82
β-D-glucano	0,8 g/l	Extracelular	-1
β-D-glucano	2,25 g/l	Intracelular	82
β-D-glucano	2,25 g/l	Extracelular	0
SrCl <sub>2</sub>	0,69 mg/l	Intracelular	79
SrCl <sub>2</sub>	0,69 mg/l	Extracelular	0
SrCl <sub>2</sub>	69,9 mg/l	Intracelular	79
SrCl <sub>2</sub>	69,9 mg/l	Extracelular	1
SrCl <sub>2</sub>	699 mg/l	Intracelular	80
SrCl <sub>2</sub>	699 mg/l	Extracelular	1
SrCl <sub>2</sub>	6,99 g/l	Intracelular	79
SrCl <sub>2</sub>	6,99 g/l	Extracelular	7
AlCl <sub>3</sub>	0,024 g/l	Intracelular	77
AlCl <sub>3</sub>	0,024 g/l	Extracelular	1
AlCl <sub>3</sub>	0,121 g/l	Intracelular	80
AlCl <sub>3</sub>	0,121 g/l	Extracelular	2
AlCl <sub>3</sub>	0,603 g/l	Intracelular	81
AlCl <sub>3</sub>	0,603 g/l	Extracelular	26
<i>L. delbrueckii</i>	0,20 %	Intracelular	98
<i>L. delbrueckii</i>	0,20 %	Extracelular	97
<i>L. delbrueckii</i>	1 %	Intracelular	78
<i>L. delbrueckii</i>	1 %	Extracelular	86
<i>L. delbrueckii</i>	5 %	Intracelular	44
<i>L. delbrueckii</i>	5 %	Extracelular	75

**[0154]** Sólo el extracto de *Lactobacillus delbrueckii* spp *lactis* se comporta como inductor: se observa una inhibición próxima al 100 %. Es uno de los raros inductores que hacen que el medio de cultivo sea muy activo (97 % de inhibición en sustancia seca equivalente). En conclusión, este inductor es muy activo a la concentración más baja, es decir, del 0,2 %.

**[0155]** Debe apreciarse que *S. epidermidis* es igualmente una bacteria grampositiva y que no tiene efecto sobre el cultivo de lirio.

**REIVINDICACIONES**

1. Utilización de *Lactobacillus delbrueckii* en forma de un extracto para la inducción de una célula vegetal de una iridácea del género *Romulea*, *Crocus*, *Iris*, *Gladiolus*, *Sisyrinchium* o *Hermodactilus*.  
5
2. Utilización de *Lactobacillus delbrueckii* en forma de un extracto para la inducción de la producción de un antagonista del CGRP por parte de una célula vegetal de una iridácea del género *Romulea*, *Crocus*, *Iris*, *Gladiolus*, *Sisyrinchium* o *Hermodactilus*.
- 10 3. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la célula vegetal es una célula desdiferenciada de una iridácea.
4. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la célula vegetal es una célula vegetal de *Iris*.  
15
5. Procedimiento de inducción de células vegetales de una iridácea del género *Romulea*, *Crocus*, *Iris*, *Gladiolus*, *Sisyrinchium* o *Hermodactilus*, que comprende poner en contacto células vegetales de una iridácea del género *Romulea*, *Crocus*, *Iris*, *Gladiolus*, *Sisyrinchium* o *Hermodactilus* con *Lactobacillus delbrueckii* en forma de un extracto en unas condiciones apropiadas para la inducción de la expresión de una actividad antagonista del CGRP.  
20
6. Procedimiento de preparación de una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP que comprende las etapas que consisten en:
  - a) poner en contacto, en un medio de cultivo, células vegetales de una iridácea del género *Romulea*, *Crocus*, *Iris*,  
25 *Gladiolus*, *Sisyrinchium* o *Hermodactilus* con *Lactobacillus delbrueckii* en forma de un extracto en unas condiciones apropiadas para la inducción de la expresión de una actividad antagonista del CGRP,
  - b) eventualmente separar las células vegetales cultivadas en la etapa a) del medio de cultivo, y
  - c) recuperar una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP.
- 30 7. Composición que tiene una actividad antagonista del CGRP susceptible de ser obtenida mediante el procedimiento de preparación según la reivindicación 6.
8. Composición cosmética que comprende una composición que tiene una actividad antagonista del CGRP según la reivindicación 7, y un vehículo cosméticamente aceptable.  
35
9. Composición cosmética según la reivindicación 8 para su utilización en el tratamiento de las pieles sensibles.
10. Utilización de la composición cosmética según la reivindicación 8 en el tratamiento anticaspa.  
40
11. Composición que tiene una actividad antagonista del CGRP según la reivindicación 7 para su utilización en el tratamiento de los trastornos relacionados con un exceso de síntesis y/o de liberación del CGRP.
12. Composición que tiene una actividad antagonista del CGRP según la reivindicación 7 para su  
45 utilización según la reivindicación 11, estando dicho trastorno relacionado con un exceso de síntesis y/o de liberación del CGRP eligiéndose entre el grupo constituido por eccema, prurito y rosácea.