

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 425**

21 Número de solicitud: 201231060

51 Int. Cl.:

A61K 38/47 (2006.01)

C07K 14/195 (2006.01)

C12N 9/36 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 17/10 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

05.07.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.09.2012

Fecha de la concesión:

21.01.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

31.01.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)
Hospital Real, Cuesta del Hospicio s/n
18071 Granada (Granada) ES**

72 Inventor/es:

**MAQUEDA ABREU, Mercedes;
MARTÍNEZ BUENO, Manuel;
VALDIVIA MARTÍNEZ, Eva;
ANANOU JALED, Samir y
CEBRIÁN CASTILLO, Rubén**

54 Título: **COMPOSICIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES BACTERIANAS DE LA PIEL Y MUCOSAS**

57 Resumen:

Composición para el tratamiento de infecciones bacterianas de la piel y mucosas.

La presente invención se refiere a una composición para el tratamiento y la profilaxis de infecciones bacterianas de la piel que comprenden la bacteriocina AS-48 en combinación con lisozima. Más concretamente, se trata de composiciones con los principios activos disueltos en extractos adecuados para las aplicaciones frente Propionibacterium acnes y Staphylococcus aureus, de forma estabilizada en un preparado farmacéuticamente aceptable.

ES 2 387 425 B2

DESCRIPCIÓN

COMPOSICIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES BACTERIANAS DE LA PIEL Y MUCOSAS

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuentra dentro del sector farmacéutico, y más concretamente en el campo de las composiciones para el tratamiento de infecciones bacterianas de la piel con compuestos antibacterianos.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

La piel humana sana está colonizada por numerosos microorganismos que son responsables del mantenimiento de su equilibrio microbiano natural. De hecho, su microbiota normal está constituida por poblaciones residentes o transitorias de bacterias y diversas especies de hongos (en particular levaduras), algunas de ellas muy estables. Los microorganismos residentes más habituales de la piel se limitan a algunos géneros de bacterias Gram+, cuyas especies pueden llegar a representar hasta el 50%. Entre ellos destacan las pertenecientes al *Phylum Firmicutes* con bajo contenido en G+C (géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus*) y al *Phylum Actinobacteria* (géneros *Corynebacterium* y *Propionibacterium*). Los restantes grupos bacterianos, incluidas las bacterias Gram-, son mucho más transitorios ya que alrededor del 70% sufren cambios con el paso del tiempo y las condiciones del individuo.

15

20

25

30

35

Hay, sin embargo, una serie de bacterias causantes de infecciones cutáneas como la mastitis y el acné, entre las que destacan por su frecuencia *S. aureus* y *Propionibacterium acnes*, respectivamente. La mastitis infecciosa de las glándulas mamarias se caracteriza por múltiples síntomas locales y sistémicos en madres lactantes. Es causada principalmente por *S. aureus* y especies de *Streptococcus*, que suelen ser multirresistentes a los antibióticos, por lo que el tratamiento mediante antibioterapia es, en muchos casos, insatisfactorio y el problema tiende a ser recurrente. Su incidencia oscila entre el 3-33% de ellas, y determina un alto porcentaje de cese de la lactancia. Por su parte, el acné común (*acne vulgaris*) es una infección de la piel, en particular de aquellas áreas con mayor densidad de folículos sebáceos. Se trata de la infección cutánea más común entre los seres humanos, debida a cambios de los folículos pilosos y las glándulas sebáceas asociadas, que tienen lugar

principalmente en la pubertad (el 85% de los adolescentes padecen en algún grado este problema), como una respuesta multifactorial que incluye mecanismos hormonales, microbiológicos e inmunológicos.

5 El empleo de péptidos antibacterianos producidos por bacterias (bacteriocinas) frente a infecciones bacterianas, se está consolidando como alternativa a la falta de quimioterápicos, debido a la resistencia a los antibióticos. Las bacteriocinas están hoy en el punto de mira de novedosos estudios sobre su aplicación frente a patógenos comunes en clínica, por lo que es ya una tendencia creciente en el campo de las
10 composiciones farmacéuticas y en los métodos de tratamiento antibacterianos (revisado por Montalban-Lopez, M., Sanchez-Hidalgo, M., Valdivia, M., Martinez-Bueno, M., and Maqueda, M. 2011. Are bacteriocins underexploited? Novel applications for ancient antimicrobials. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12: 1205-1220). Ejemplos de ello son las patentes existentes protegiendo el uso de péptidos
15 antibióticos (WO9957281, WO2004082701, US5635594, CA2453112) o de bacteriocinas producidas por bacterias (Mutacin CA2268744 y S6521596, gallidermin CA1338310 (C)- 1996-05-07 y de la Enterocin L50A/B producida por *E. faecalis* SL-5 que ha sido registrada como Lactopadt™ Acne como ingrediente cosmético (INCI) (CTFA file No. 9082) por Cell Biotech Co. Ltd. (KOSDAQ) con el objetivo de utilizarla
20 con propósitos cosméticos, en las capas superiores de la piel).

Las composiciones que integran bacteriocinas tienen la ventaja de evitar el desarrollo de resistencias por patógenos que colonizan e infectan la piel. Por este motivo hay algunas publicaciones sobre la habilidad de algunas bacteriocinas para inhibir a *P.*
25 *acnés*, reduciendo las lesiones inflamatorias causadas por esta bacteria. Tal es el caso de las producidas por *Lactococcus* sp. HY 449 o *Enterococcus faecalis* SL-5 antes comentada. De forma similar se ha descrito la utilización de bacteriocinas, incluida AS-48, frente a diferentes cepas MRSA de *Staphylococcus*, y/o aquéllas productoras de mastitis.

30 Aquí se propone el empleo de la bacteriocina AS-48 producida por especies de *Enterococcus*, en combinación con un agente potenciador, la lisozima, un enzima que hidroliza la pared celular de las bacterias, que incrementa la potencia de AS-48 con el fin de combatir especies patógenas causantes de infecciones en la piel, en concreto *P.*
35 *acnes* y *S. aureus*. La posible explicación de esta sinergia es un efecto de barreras múltiples que se produce debido a que la aplicación simultánea, a dosis moderadas,

de varios factores que actúan a diferentes niveles, resulta mucho más eficaz que la aplicación de uno sólo, que, al actuar a un solo nivel, requiere una dosis más alta (Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. Int. J. Food Microbiol. 55: 181-186).

5

La bacteriocina AS-48 es una proteína circular de síntesis ribosómica constituida por 70 aminoácidos naturales. Su naturaleza es fuertemente anfipática lo que le permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Así en soluciones acuosas, AS-48 adopta una forma dimérica (DF-I) en la que expone dominios hidrófilos, pero esta asociación cambia en ambientes hidrofóbicos como sería el caso de la piel o la presencia de membranas celulares, adoptando una nueva forma dimérica (DF-II) en la que se exponen los dominios hidrófobos, lo que sin duda facilita su inserción en membranas fuertemente cargadas negativamente como ocurre en el caso de las bacteria, pero sin actividad frente a células eucariotas.

15

AS-48 ha sido reconocida como una de las bacteriocinas con mayor potencialidad, debido a su amplio espectro de acción frente a las membranas bacterianas de la mayoría de las bacterias Gram+ ensayadas y algunas bacterias Gram-. Favorece su actividad y por ende sus posibles aplicaciones biotecnológicas, la gran estabilidad que AS-48 presenta en amplios intervalos de pH, temperatura y tratamientos surfactantes, debido a sus características estructurales (una proteína circular), lo que justifica el éxito que tiene su empleo en la bioconservación de alimentos.

La lisozima, también llamada 1,4 N-acetil muramidasa, es un enzima hidrolítica que cataliza específicamente la hidrólisis de las uniones beta 1,4 existentes entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina del peptidoglicano bacteriano, un compuesto mayoritario de la pared celular bacteriana, en particular de las bacterias Gram-positivas. Este enzima carece de actividad proteasa, quinasa, lipasa, amilasa o fosfatasa y se encuentra de forma natural en numerosas secreciones (lágrimas, mocos, saliva y leche) y en gran cantidad en la clara de huevo, que es su fuente de obtención para uso industrial (Sigma).

30

La aplicación de múltiples barreras en el control de los microorganismos puede tener un efecto inhibitor aditivo o incluso sinérgico, sobre todo si actúan sobre distintas

dianas del microorganismo. Este es el caso que describimos en el que AS-48 forma poros en la membrana celular, y dicha actividad se favorecida por la acción de lisozima que al hidrolizar parcialmente la pared celular, facilita el acceso de AS-48 a su diana, la membrana citoplasmática bacteriana.

5

Actualmente hay un gran interés en la aplicación de bacteriocinas solas o en combinación con otros inhibidores y también con agentes físicos o químicos que actúan de forma sinérgica frente a bacterias patógenas y/o alterantes, permitiendo en algunos casos ampliar su espectro de acción a bacterias Gram-negativas. Así, la nisina se ha empleado conjuntamente con otras bacteriocinas y con conservantes químicos (nitritos) para el control de *Clostridium*. Las altas presiones han sido combinadas con diversas bacteriocinas y cepas productoras de las mismas (nisina, lactícina 3147, lacticina 481, AS-48, TAB 57, pediocina AcH y las enterocinas 1, A y B) en diferentes alimentos para el control de la microbiota alterante y patógena. Se ha comprobado también que la nisina y la lisozima actúan sinérgicamente en el control de *Lactobacillus* y *S. aureus* y que su espectro puede ser ampliado a bacterias Gram- mediante la adición de agentes quelantes. De igual forma, AS-48 se ha combinado con éxito con otros antibacterianos, incluida la lisozima, para la eliminación de patógenos en alimentos.

20

No se puede dejar de mencionar la existencia de tratamientos que podrían ser considerados erróneamente como medicina naturopática u homeopática, como algunas aplicaciones caseras empleadas para combatir el acné mediante clara de huevo (por su riqueza en lisozima) así como con yogur, caliza o miel, por citar algunas. Sin embargo, estos tratamientos suelen ser tan inocuos como inefectivos para la eliminación de una bacteria como *P. acnes* de difícil acceso por estar localizada en las glándulas sebáceas.

30

OBJETO DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención es una composición que comprende AS-48 en combinación con lisozima para el tratamiento y la profilaxis de infecciones bacterianas de la piel y mucosas. Además, esta composición permite eliminar totalmente las baterías *P. acnes* y *S. aureus*.

35

Más concretamente, se describe el uso de estas composiciones, con los principios activos disueltos en extractos adecuados, frente a *P. acnes* y *S. aureus*, de forma estabilizada en un preparado farmacéuticamente aceptable.

- 5 De acuerdo con ensayos de actividad *in vitro* de los principios activos objeto de esta invención, disueltos en gel neutro o en soluciones acuosas, o bien emulsionados en una crema a base de glicerina, el vehículo más apropiado para la actividad es la crema, seguida del gel neutro y la solución acuosa, ambos por igual.
- 10 Estas composiciones permiten el control de bacterias, especialmente de las especies de *Staphylococcus* involucradas en infecciones y superinfecciones de la piel, así como de *P. acnés*, responsable de las lesiones inflamatorias (*acne vulgaris*), que en muchas ocasiones carecen del tratamiento antibiótico adecuado por haberse desarrollado resistencias.

15

Las composiciones se utilizarán preferentemente mediante aplicación tópica, dos o más veces al día, formulándose en crema, gel y/o disolución acuosa.

La invención propuesta presenta las siguientes ventajas:

- 20
- La actividad inhibidora de AS-48 se incrementa por un factor de 10 en presencia de lisozima
 - Las composiciones no han producido, en ninguno de los casos ensayados *in vivo*, irritación (alergias, eritemas) en la piel, a pesar de haberse empleado tópicamente de forma repetida sobre personas sanas durante numerosos días.
- 25
- Los preparados no sufren disminución o pérdida de actividad durante su almacenamiento a diferentes temperaturas, o por interacción de las moléculas activas con compuestos cosméticos (emulsionantes y/o componentes lipídicos o acuosos) ni tampoco por antagonismo entre los diferentes agentes empleados.
- 30
- Se ha comprobado que AS-48 sola o en combinación con lisozima carece de actividad hemolítica.
 - También se ha confirmado la ausencia de citotoxicidad sobre la línea celular CCD18 de fibroblastos (procedente de colon humano normal) y sobre la línea epitelial de glándula mamaria humana MCF 10A.

- Se ha seleccionado AS-48 como agente antibacteriano para infecciones de la piel por sus características bioquímicas y estructurales. El carácter anfipático de AS-48 y su particular mecanismo de acción favorecido por las diferentes conformaciones que AS-48 adopta en función del ambiente en el que se encuentra, facilita su acceso a las diferentes capas de la piel donde se encuentran los estafilococos y también a los folículos sebáceos obstruidos por el exceso de sebo, donde se encuentra *P. acnes*.
- Debido a las características estructurales que AS-48 presenta, su actividad antibacteriana y estabilidad es muy superior a la de la mayoría de las bacteriocinas descritas frente a los patógenos propuestos, incluida L50A/B que ha sido registrada como Lactopadt™ Acne.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

La concentración de un agente antibacteriano necesaria para eliminar completamente una bacteria se denomina "concentración mínima bactericida" (CMB). Esta CMB se expresa en función del logaritmo de las unidades formadoras de colonias (log de UFCs) resultantes, tras la incubación de la bacteria en presencia de compuestos antibacterianos a diferentes concentraciones, bien de forma conjunta y/o por separado.

20

En las figuras 1 y 2 se exponen la concentración mínima bactericida (CMB) de AS-48 ensayada sola (fig. 1) y en presencia de lisozima (fig. 2) frente a *P. acnes* a lo largo del tiempo (144 h) en un cultivo de laboratorio a 37°C. En la figura 3 se expone el efecto sinérgico de la lisozima y AS-48 en la eliminación de *S. aureus* CECT 976 en un cultivo de laboratorio (BHI a 37°C).

25

Figura 1.- Determinación de la CMB de AS-48 frente a *P. acnes* en BHI. La viabilidad de *P. acnes* se expresa en UFC/ml.

30

Figura 2.- Determinación de la CMB de AS-48 combinada con 4 mg/ml de lisozima frente a *P. acnes* en BHI. La viabilidad de *P. acnes* se expresa en UFC/ml.

Figura 3.- Determinación de la CMB de AS-48 (10 µg/ml) en combinación con lisozima (8 mg/ml) frente a *S. aureus* CECT 976 en medio BHI a 37 °C. La viabilidad de *S. aureus* se expresa como log de las UFC/ml.

35

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La presente invención describe composiciones que comprenden la bacteriocina AS-48, una molécula muy estable que posee una amplia actividad antibacteriana, en combinación con lisozima, un enzima con actividad muramidasa, que potencia de forma significativa la actividad de la primera, para el control de *Propionibacterium acnés*, *Staphylococcus aureus* y otras bacterias involucradas en infecciones de la piel.

10

Entre las afecciones producidas por infecciones bacterianas que se pueden tratar con las composiciones de la presente invención se incluyen las lesiones producidas por *P. acnes* (*acne vulgaris*) y las infecciones y/o superinfecciones dérmicas debidas a *S. aureus*, una bacteria que es también el agente infeccioso más importante en los
15 pacientes que sufren eczema atópico.

El compuesto activo AS-48 incrementa sensiblemente su actividad en presencia de lisozima, mientras que la lisozima, por sí sola, no presenta actividad en las condiciones de ensayo).

20

El efecto sinérgico que tiene esta aplicación conjunta permite reducir de forma significativa la dosis necesaria de AS-48 para obtener el mismo efecto inhibitor, tanto "in vivo" como "in vitro" en el control de infecciones por los mencionados patógenos.

25 Las composiciones de la presente invención, cuya falta de toxicidad ha sido confirmada, están formuladas preferentemente para aplicaciones tópicas. Las composiciones contienen los principios activos y reúnen las propiedades físico-químicas más convenientes para su aplicación tópica, considerando las características de las infecciones a tratar.

30

Visto el comportamiento de AS-48 en las diferentes formulaciones, y los diferentes niveles de sensibilidad de las bacterias ensayadas, se considera que, en el tratamiento frente a *S. aureus*, es más apropiado utilizar una base grasa como la crema a base de vaselina, para su aplicación a las concentraciones que luego se indican.

En el caso de *P. acnes* una formulación con compuestos grasos está contraindicado porque incidiría en el aumento de grasa en la piel, por lo que se recomienda el uso de gel neutro o solución acuosa, a las concentraciones después expuestas.

5 MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

La bacteriocina usada en las composiciones y métodos de la presente invención es AS-48 obtenida de sobrenadantes de la cepa probiótica UGR10 de *Enterococcus faecalis* aislada de quesos (Cebrián, R., Baños, A, Valdivia, E., Pérez-Pulido, R, 10 Martínez-Bueno, M, Maqueda M. 2012. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. Food Microbiol. 30, 59-67).

Como medio de cultivo de la cepa productora se emplearán residuos de la industria 15 láctea en las condiciones previamente optimizadas en nuestro laboratorio.

La lisozima utilizada es comercial y se obtiene a partir de clara de huevo (Sigma L6876).

20

Formulaciones/composiciones desarrolladas

Composición frente a *S. aureus*

25 **Crema:** emulsión de vaselina filante fundida con los agentes antibacterianos en proporción entre 100 y 200 µg AS-48 y 8 mg de lisozima por g de crema. La emulsión se lleva a cabo empleando un homogenizador.

Composición frente a *P. acnes*

30 **Gel neutro** adicionado de los agentes antibacterianos en proporción entre 10 y 20 µg de AS-48 y 4 u 8 mg de lisozima (Sigma) por g de gel. La disolución se llevará a cabo empleando un homogenizador.

Solución acuosa adicionada de los agentes antibacterianos en proporción entre 10 y 20 µg de AS-48 y 4 u 8 mg de lisozima (Sigma) por ml. La mezcla se homogenizará bien antes del uso.

5 **Datos comparativos de la eficacia de AS-48 sola o en combinación sinérgica con lisozima**

En las figuras se muestran la actividad de AS-48 ensayada a diferentes concentraciones, sola o en combinación con lisozima frente a *P. acnés* (figuras 1 y 2) y frente a *S. aureus* (figura 3)

10

Concentración\Tiempo	0 h	3 h	6 h	24 h	48 h	96 h	144 h
Control	4,30	3,84	4,42	5,09	7,26	7,09	7,86
0,01 µm/ml	4,30	3,51	3,48	4,87	3,16	4,46	5,58
0,1 µm/ml	4,30	3,46	3,22	2,44	2,51	1,039	2,96
1,0 µm/ml	4,30	2,78	2,59	2,12	2,31	0,30	0,0
5,0 µm/ml	4,30	2,32	1,43	1,81	0,84	0	0
10,0 µm/ml	4,30	1,18	0,57	0,39	0	0	0

15 **Tabla 1.- Crecimiento de *P. acnes* (UFC/ml) en BHI a lo largo de 144 h de incubación en anaerobiosis en presencia de diferentes concentraciones de AS-48**

Concentración\Tiempo	0 h	3 h	6 h	24 h	48 h	96 h	144 h
Control	4,30	3,84	4,42	5,09	7,26	7,09	7,86
AS-48 0,01 µm/ml	4,30	3,51	3,48	4,87	3,16	4,46	5,58
AS-48 0,1 µm/ml	4,30	3,46	3,22	2,44	2,51	1,04	2,96
Lisozima 4 mg/ml	4,30	3,48	3,30	4,53	7,55	6,50	7,24
Lisozima 4 mg/ml + AS-48 0,01 µm/ml	4,30	3,75	3,71	1,89	0,30	0,30	0,15
Lisozima 4 mg/ml + AS-48 0,1 µm/ml	4,30	3,23	2,41	1,20	0	0	0

Tabla 2.- Crecimiento de *P. acnés* (UFC/ml) en BHI a lo largo de 144 h de incubación en anaerobiosis en presencia de AS-48, lisozima o combinaciones de ambos

En la tabla 1 se proporcionan los datos de la CMB frente a *P. acnés* de distintas composiciones conteniendo concentraciones crecientes de AS-48 (de 0,01 a 10 µg/ml) y en la tabla 2 los de la CMB de AS-48 combinada con lisozima (4 mg/ml) frente a la misma bacteria. Los controles sin agentes activos y con lisozima por separado, también se exponen.

- Los resultados asociados a la tabla 1 se presentan en la figura 1 y muestran que en un sistema cerrado como un cultivo de laboratorio, se requiere una concentración de 10 µg/ml de AS-48 para eliminar a *P. acnes* en 48 h. Concentraciones más bajas, como 5 o 1 µg/ml de AS-48 requieren de 96 h o 144 h respectivamente, para ejercer el mismo efecto.
- Sin embargo la actividad de AS-48 (figura 2) se incrementa por un factor de 10 en presencia de lisozima (4 mg/ml), siendo suficientes 0,1 µg/ml de AS-48 para eliminar a *P. acnes* en 48 h. Se observa, además, que la lisozima carece completamente de actividad en las condiciones del ensayo.

Concentración\Tiempo	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	14 h	18 h	22 h	24 h
Control	6,18	6,79	7,84	8,20	8,99	9,08	9,07	9,27	9,39
Lisozima 8 mg/ml	6,18	6,48	7,67	8,48	8,47	9,14	9,14	9,14	8,77
AS-48 10 µm/ml	6,18	3,81	3,18	2,36	4,35	7,71	7,44	8,16	8,63
Lisozima 8 mg/ml + AS-48 5 µm/ml	6,46	4,07	3,13	4,59	3,41	ND	ND	ND	9,06
Lisozima 8 mg/ml + AS-48 10 µm/ml	6,18	3,69	2,65	1,89	1,78	0	0	0	0

Tabla 3.- Crecimiento de *S. aureus* (UFC/ml) en BHI a lo largo de 24 h de incubación en presencia de AS-48, lisozima o combinaciones de ambos

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos frente a *S. aureus*, con AS-48 sola y adicionada de lisozima (8 mg/ml).

- Como puede observarse en la figura 3, 10 µg/ml de AS-48 no son capaces de eliminar a la bacteria, mientras que la adición de lisozima (8 mg/ml) a la

misma concentración de AS-48, consigue su total eliminación en 14 h, confirmando así el efecto sinérgico entre ambos compuestos activos, en condiciones de laboratorio.

- 5
- Estos resultados ponen además de manifiesto que *S. aureus* es menos sensible que *P. acnes* a esta bacteriocina.

Se considera que, al tratarse de aplicaciones tópicas, las formulaciones, que serán diferentes para ambas bacterias, serán preparadas incrementando las concentraciones de los principios activos, de acuerdo con lo propuesto a continuación:

10

- Dada la inocuidad confirmada de los preparados y de acuerdo con la eficacia de los vehículos utilizados, que ha sido previamente confirmada en ensayos de actividad de los principios activos *in vitro*, es preferible aumentar al menos hasta al menos 1 mg/ml la concentración de AS-48 en los preparados neutros o acuosos (por la menor eficacia de éstos y la dificultad de acceso a la bacteria) y en la composición con base de vaselina filante, con el fin de que quede asegurada su eficacia *in vivo* frente a *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente.
- En el caso de la lisozima empleada con éxito a razón de 4 mg/ml frente a *P. acnes*, es preferible incrementar su concentración al doble (8 mg/ml o bien 8mg/g). En el caso de *Staphylococcus aureus* se mantiene la concentración ensayada (8 mg/ml o bien 8 mg/g) por los óptimos resultados que se obtienen.

15

20

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende bacteriocina AS-48 y lisozima para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de infecciones bacterianas de la piel y mucosas.
2. Uso según la reivindicación 1 en el que las infecciones bacterianas de la piel y mucosas son causadas por *Propionibacterium acnes* o *Staphylococcus aureus*.
3. Uso según la reivindicación 2 en el que la cantidad de bacteriocina AS-48 es de al menos 10 µg/ml y la infección bacteriana es causada por *P. acnes*.
4. Uso según la reivindicación 2 en el que la cantidad de bacteriocina AS-48 es de al menos 100 µg/ml y la infección bacteriana es causada por *S. aureus*.
5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que la cantidad de lisozima es de al menos 4 mg/ml.
6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que la cantidad de lisozima es de al menos 8 mg/ml.
7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 5 ó 6 en el que el medicamento es un gel neutro y la infección bacteriana es causada por *P. acnes*.
8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 5 ó 6 en el que el medicamento es una solución acuosa y la infección bacteriana es causada por *P. acnes*.
9. Uso según la reivindicación 7 u 8 en el que la cantidad de bacteriocina AS-48 es de al menos 1 mg/ml.
10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 ó 6 en el que el medicamento es una crema tópica y la infección bacteriana es causada por *S. aureus*.
11. Uso según la reivindicación 10 en el que la crema tópica es una emulsión estable de vaselina filante fundida con la bacteriocina AS-48 y la lisozima.
12. Uso según la reivindicación 10 u 11 en el que la cantidad de bacteriocina AS-48 es de al menos 1 mg/ml.

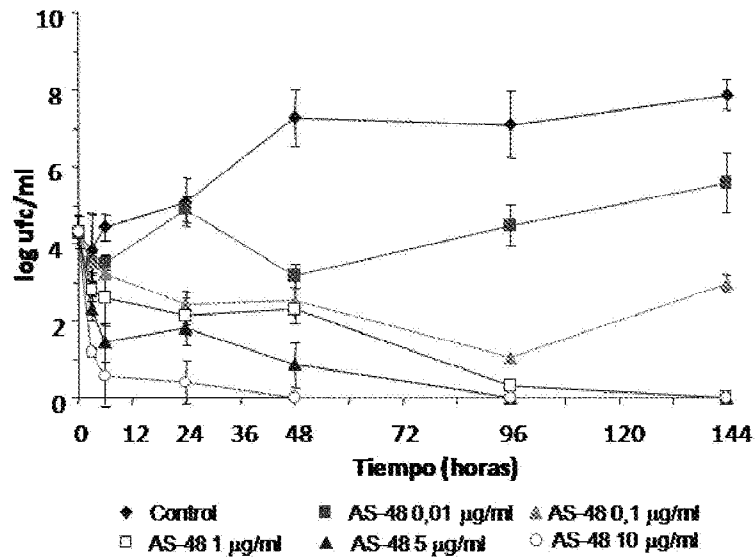


Figura 1

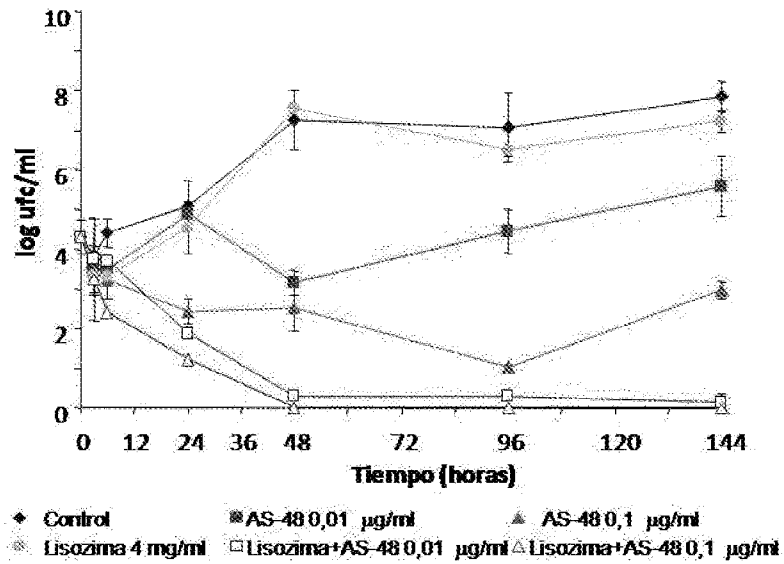


Figura 2

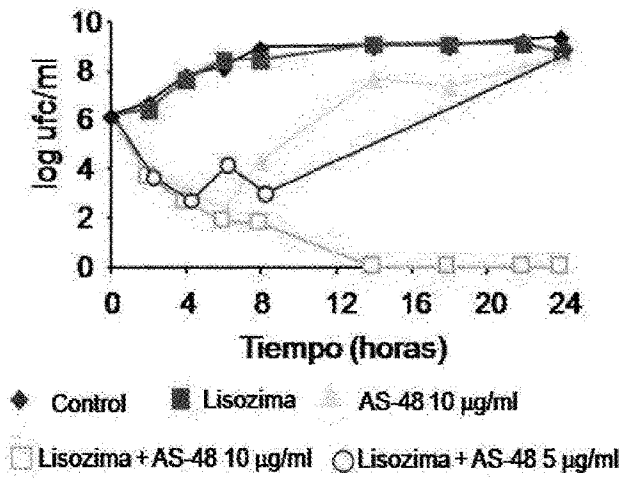


Figura 3



21 N.º solicitud: 201231060

22 Fecha de presentación de la solicitud: 05.07.2012

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SOBRINO-LOPEZ, A. et al. The effect of adding antimicrobial peptides to milk inoculated with <i>Staphylococcus aureus</i> and processed by high-intensity pulsed-electric field. Journal of Dairy Science. Junio 2009, Vol. 92, N° 6, páginas: 2514 - 2523. ISSN 0022-0302. <Doi:10.3168/jds.2008-1996>	2, 4-6, 10, 12
A	LESZCZYNSKA, K. et al. Potential of ceragenin CSA-13 and its mixture with pluronic F-127 as treatment of topical bacterial infections. Journal of Applied Microbiology. Enero 2011, Vol. 110, N° 1, páginas: 229 - 238. NIH Public Access Author Manuscript. [29.06.2012] [base de datos en línea][recuperado el 30.08.2012] Recuperado de la base de datos PMC por medio de internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3386848/>	1, 2, 4-6, 10, 11
A	HOQ, MD. I. et al. Potent antimicrobial action of triclosan-lysozyme complex against skin pathogens mediated through drug-targeted delivery mechanism. European Journal of Pharmaceutical Sciences. Enero 2011, Vol. 42, N° 1-2, páginas: 130 - 137. ISSN 0928-0987. <Doi:10.1016/j.ejps.2010.11.002>	1-3, 5-8
A	ANANOOU, S. et al. Bactericidal synergism through enterocin AS-48 and chemical preservatives against <i>Staphylococcus aureus</i> . Letters in Applied Microbiology. Julio 2007, Vol. 45, N° 1, páginas: 19 - 23. ISSN 0266-8254. <Doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02155.x>	2, 4, 10, 12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.08.2012

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201231060

22 Fecha de presentación de la solicitud: 05.07.2012

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MENDOZA, F. et al. Antilisterial activity of peptide AS-48 and study of changes induced in the cell envelope properties of an AS-48-adapted strain of <i>Listeria monocytogenes</i> . Applied and Environmental Microbiology. Febrero 1999, Vol. 65, N° 2, páginas: 618 - 625. ISSN 0099-2240.	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.08.2012

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
2/6

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K38/47 (2006.01)
C07K14/195 (2006.01)
C12N9/36 (2006.01)
A61P31/04 (2006.01)
A61P17/10 (2006.01)

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

A61K, C07K, C12N, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, MENDLINE, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPDX, NPL, XPESP, XPESP2, FSTA, HCAPLUS,

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.08.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SOBRINO-LOPEZ A et al. Journal of Dairy Science. Junio 2009, Vol. 92, Nº 6, páginas: 2514 - 2523. ISSN 0022-0302.	06.2009
D02	LESZCZYNSKA K et al. Journal of Applied Microbiology. Enero 2011, Vol. 110, No. 1, páginas: 229 - 238.	01.2011
D03	HOQ MD I et al. European Journal of Pharmaceutical Sciences. Enero 2011, Vol. 42, No. 1-2, páginas: 130 - 137.	01.2011
D04	ANANOOU, S. et al. Letters in Applied Microbiology. Julio 2007, Vol. 45, No. 1, páginas: 19-23.	07.2007
D05	MENDOZA, F. et al. Applied and Environmental Microbiology. Febrero 1999, Vol. 65, Nº 2, páginas: 618 - 625.	02.1999

En D01 se presenta un estudio sobre el efecto que produce la adición de determinadas sustancias antimicrobianas, entre ellas AS-48 y lisozima, en una muestra de leche inoculada con *S. aureus*. No se consideró efectiva ni la bacteriocina AS-48 sola, ni la mezcla de AS-48 junto con lisozima.

D02 analiza la actividad del péptido antibacteriano CSA-13 frente a *S. aureus*. La lisozima potencia la actividad bactericida de dicho péptido, lo que podría utilizarse en el tratamiento de infecciones de la piel.

En D03 se anticipa el efecto sinérgico que produce el complejo no covalente triclosan-lisozima frente al triclosan solo. La lisozima hace que se produzca un incremento de la efectividad bactericida frente a *P. acnes*. Este complejo se podría utilizar en el tratamiento de infecciones de la piel en humanos.

D04 divulga la capacidad bactericida de AS-48 frente a *S. aureus*. Además, tanto el ácido láctico como el tripolifostato de sodio, incrementan la actividad de AS-48, siendo éste efectivo a partir de una concentración de 10 µg/ml.

En D05 se investiga la capacidad bactericida de AS-48 frente a *Listeria monocytogenes*. Esta bacteria es muy sensible a AS-48. Sin embargo, se pueden obtener cepas adaptadas a este antibiótico, que a su vez son más resistentes al tratamiento con lisozima.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la presente solicitud, es el uso de una composición que comprende la bacteriocina AS-48 y lisozima, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de infecciones bacterianas de la piel y las mucosas, en concreto las producidas por *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus aureus* (reivindicaciones de la 1 a la 6). Dicho medicamento, puede estar en forma de gel neutro o solución acuosa, en el caso de infecciones de *P. acnes* (reivindicaciones de la 7 a la 9), o en forma de crema tópica o vaselina para *S. aureus* (reivindicaciones de la 10 a la 12).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 Y 8.1 LP 11/1986)

La reivindicación 1 tiene por objeto, el uso una composición que comprende AS-48 y lisozima, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de infecciones bacterianas de piel y mucosas.

En D01 se investiga la capacidad bactericida del péptido AS-48 junto con la lisozima, frente a inóculos de *S. aureus* en leche. La presencia de la lisozima no mejora la actividad bactericida del péptido. Además AS-48 no es efectivo en el control del crecimiento bacteriano, quizá por encontrarse a una concentración demasiado baja.

Aunque D04 divulga la eficacia de AS-48 como bactericida frente a *S. aureus*, no apunta la posibilidad de su uso en el tratamiento de piel y mucosas, sino en alimentación. Asimismo, tampoco incitaría al experto en la materia a la investigación del efecto de la adición de la lisozima, en la actividad bactericida de este péptido.

Por otro lado, si bien D02 y D03 presentan sendos estudios en los que la lisozima incrementa el efecto bactericida de otros compuestos en infecciones de piel producidas por *S. aureus* o *P. acnes* respectivamente, estos documentos no llevan al estudio de un posible efecto sinérgico de AS-48 junto con lisozima.

En consecuencia, ninguno de los documentos citados, tomados solos o en combinación, induciría al experto en la materia al uso de una composición que comprenda AS-48 y lisozima, para fabricar un medicamento para el tratamiento de infecciones bacterianas de piel y mucosas.

Por lo tanto, se entiende que la reivindicación 1 cumple el requisito de novedad y actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).

Las reivindicaciones de la 2 a la 12 son dependientes de la reivindicación 1, y como ésta presentan novedad y actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).