

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 382**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/61** (2006.01)  
**A61P 17/10** (2006.01)  
**A61K 8/97** (2007.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61Q 19/00** (2006.01)  
**A61K 31/122** (2006.01)  
**A61K 31/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2013 PCT/EP2013/064415**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14009325**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2013 E 13737198 (5)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2869827**

54 Título: **Utilización de un extracto de mirto como agente anti-biopelícula contra P. acnes**

30 Prioridad:

**09.07.2012 FR 1256607**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.10.2017**

73 Titular/es:

**PIERRE FABRE DERMO-COSMÉTIQUE (100.0%)  
45, place Abel-Gance  
92100 Boulogne-Billancourt, FR**

72 Inventor/es:

**LUC, JOELLE y  
FIORINI-PUYBARET, CHRISTEL**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 635 382 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 un extracto de mirto como agente anti-biopelícula contra *P. acnes*.

5 La presente invención se refiere a la utilización en una composición dermatológica de un extracto de mirto como agente anti-biopelícula contra *Propionibacterium acnes*.

10 La presente invención se refiere a una composición dermatológica que contiene un extracto de mirto para su utilización como agente anti-adhesión de las bacterias planctónicas de *Propionibacterium acnes* y/o como agente de erradicación o de destrucción de las bacterias sésiles de *Propionibacterium acnes* organizadas en biopelícula, siendo esta utilización tópica y estando destinada a disminuir la resistencia a un antibiótico que actúa sobre *P. acnes*.

15 Este extracto de mirto como agente anti-biopelícula también ha resultado eficaz para disminuir la resistencia a los antibióticos administrados habitualmente en el tratamiento del acné o de la foliculitis decalvante.

El acné es una patología cutánea común, que resulta de una inflamación de los folículos pilosebáceos debida en gran parte a la colonización de *Propionibacterium acnes* en el infundíbulo.

20 La foliculitis decalvante es una pustulosis inflamatoria crónica del cuero cabelludo responsable de una alopecia cicatrizante residual. La foliculitis decalvante es una enfermedad huérfana cuya fisiopatología es poco conocida, pero probablemente está relacionada con una reacción inflamatoria predominantemente neutrofílica contra bacterias, probablemente las bacterias de *Propionibacterium acnes*.

25 La bacteria *P. acnes* metaboliza los triglicéridos cutáneos en ácidos grasos irritantes a través de las lipasas que agreden la pared del folículo y de la dermis circundante, y también produce varias enzimas y quimioatrayentes de las células fagocitarias de la inmunidad que agravan la inflamación.

30 La lucha contra esta especie bacteriana es por lo tanto prioritaria en el tratamiento del acné o de la foliculitis decalvante. Actualmente se utilizan de forma amplia varios antimicrobianos tópicos (peróxido de benzoilo, clindamicina, eritromicina, triclosán).

35 Una antibioterapia sistémica más o menos prolongada se le puede asociar según la gravedad de la afección (tetraciclinas, doxiciclina, minociclina, eritromicina).

Estos últimos años, se ha constatado fracasos frecuentes en estos tratamientos debidos a una elevada proporción de cepas resistentes de *P. acnes* a uno o varios antibióticos.

40 Esta resistencia incrementada puede ser la consecuencia de una organización de las poblaciones bacterianas planctónicas (en suspensión) en biopelícula. Las biopelículas son unas comunidades celulares bacterianas integradas en una matriz extracelular excretada por los microorganismos, compuesta por polímeros de azúcares (EPS por Extracellular Polymeric Substances), denominada un glicocáliz. La biopelícula es por lo tanto una cubierta polisacáridica que aísla la bacteria del medio circundante. Ésta adapta su metabolismo, ralentizándolo. La biopelícula permite así que la bacteria:

- 45 - se adhiera a los queratinocitos del epitelio del folículo pilosebáceo, lo cual facilita sus actividades de modulación en la diferenciación y la proliferación queratinocitaria,
- 50 - se desarrolle en el folículo pilosebáceo en colonia, y
- llegue a ser resistente a los antibióticos usados contra el acné, en particular las ciclinas y los macrólidos.

55 El estilo de vida en biopelícula de las bacterias es uno de los dos estilos de vida de los organismos unicelulares. Este sería el estilo de vida natural de la mayoría de los microorganismos, en particular en medio hostil. El segundo estilo de vida es la flotación libre de las bacterias en un medio líquido. Las bacterias asociadas al estilo de vida en flotación libre se denominan bacterias planctónicas. Las bacterias asociadas a la biopelícula se denominan bacterias sésiles.

60 La formación, representada en la figura 1, de la biopelícula de *P. acnes* en el folículo pilosebáceo se realiza en cuatro etapas:

- 1) transferencia de *P. acnes* planctónicas hacia la pared interna del folículo pilosebáceo
- 2) adhesión inicial de *P. acnes* en la pared
- 3) colonización y estructuración de *P. acnes* sésiles
- 65 4) desprendimiento de *P. acnes* y recolonización.

Las bacterias sésiles (asociadas a la biopelícula) son fenotípicamente y fisiológicamente diferentes de las bacterias planctónicas (libres).

5 Esta organización en biopelícula se ha evocado para explicar los fracasos terapéuticos de los tratamientos del acné (Burkart C.N., Burkart C.G., 2003. Microbiology's principle of biofilms as a major factor in the pathogenesis of acne vulgaris. Int. J. Dermatol. 42. 925-927).

Estudios recientes han confirmado la aptitud de *P. acnes* para formar unas biopelículas, tanto:

- 10 - *in vitro* (Bayston R., Ashraf W., Barker-Davis R., Tucker E, Clement R., Clayton J., Freeman B.J., Nuradeen B. 2007. Biofilm formation by Propionibacterium acnes on biomaterials in vitro and in vivo: impact on diagnosis and treatment. J. Biomed. Mast. Res. A81, 705-709) (Coneye T., Peeters E., Nelis H.J. 2007a. Biofilm formation by Propionibacterium acnes is associated with increased resistance against antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. Res. Microbiol. 158. 386-392)
- 15 (Holmberg A. Lood R, Mörgelin M. Söderquist B., Holst E. Collin M., Christensson B., Rasmussen M. 2009. Biofilm formation by Propionibacterium acnes is a characteristic of invasive isolates. Clin. Microbiol. Infect. 15, 787-795)
- 20 - como in vivo en unos dispositivos médicos (Coneye T., Honraet K., Rossel B. Nelys HJ Biofilm in skin infection : Propionibacterium acnes et acne vulgaris. Infect Disord Drug Target 2008. 14. 649-659) (Ramage G, Tunney MM, Patrick S, Gorman SP and Nixon JR. 2003. Formation of Propionibacterium acnes biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials. Biomaterials; 24: 3221-3227) (Craig G., Burkhart MD, Craig N. 2007. Expanding the microcomedone theory and acne therapeutics: Propionibacterium acnes biofilm produces biological glue that hold cornéocytes together to form plug. J Am Acad Dermatol. Octubre).
- 25

Las tecnologías incluso recientes no permiten visualizar la biopelícula *in situ* en los folículos, pero un estudio reciente ha permitido detectar la presencia de macrocolonias/biopelícula de *P. acnes* en los folículos pilosebáceos a partir de biopsias cutáneas (Jahns AC, Lundskog B., Ganceviciene R., Palmer RH, Golovleva I, Zouboulis CC, McDowell A, Patrick S., Alexeyev OA. 2012. An increased incidence of Propionibacterium acnes biofilms in acne vulgaris : a case-control study. Br J Dermatol. Feb 22).

30

El concepto de la biopelícula de *P. acnes*, aceptado mayoritariamente en la actualidad, abre la vía a nuevas dianas para la terapia, tales como: la inhibición de la formación de biopelícula, la inhibición de la diseminación o también la erradicación química o mecánica de la biopelícula instalada.

35

Estas vías representan una alternativa a la actividad biocida utilizada habitualmente para combatir la instalación de los microorganismos. Estos 2 tipos de actividad, biocida y anti-biopelícula, ponen en juego unas propiedades diferentes, no anticipando una a la otra.

40

La presente invención tiene por objetivo demostrar la actividad del extracto de mirto, por una parte en la inhibición de la formación de la biopelícula de *P. acnes*, y por otra parte en la inhibición de la diseminación o la erradicación (o destrucción) de la biopelícula establecida.

45 La presente invención se refiere a los trabajos emprendidos en la especie *Myrtus communis*.

Preferentemente, el extracto se prepara a partir de las hojas de *Myrtus communis*.

50 Preferentemente, se trata de una fracción apolar de las partes aéreas de mirto.

El extracto según la presente invención se puede obtener mediante extracción con la ayuda de un solvente o mezcla de solventes seleccionado de entre:

- 55 - los alcoholes tales como el etanol, el metanol, el isopropanol
- las cetonas de las cuales, la acetona y la metiletilacetona
- el hexano
- el cloruro de metileno
- el éter isopropílico
- el acetato de etilo;
- 60

o mediante CO<sub>2</sub> supercrítico.

El extracto también se puede estabilizar por adición de un antioxidante, como por ejemplo el butilhidroxitolueno o alfa tocoferol en unas cantidades entre 0,05 y 1 g%g de extracto seco.

65

El extracto según la presente divulgación tiene la característica de ser rico en mirtuocomulonas y en ácido

ursólico. Las mirtucomulonas A, B', D, B, isoS (isosemimirtucomulona) y S (semimirtucomulona) son las principales mirtucomulonas presentes.

Ventajosamente, el contenido en mirtucomulonas totales en el extracto está comprendido entre 3 y 10% en peso.

El contenido en ácido ursólico está comprendido entre 10 y 30%, preferentemente  $\geq 15\%$  en peso.

Estas moléculas tienen la actividad reivindicada en el marco de la presente invención.

En una forma de realización particular de la invención, el extracto de mirto será preferentemente tal como el descrito en la patente EP 1 112 079. Este documento describe las propiedades antibacterianas del extracto de *Myrtus communis* y sus aplicaciones en unas composiciones cosméticas o dermatológicas.

Un aspecto notable de la presente invención es que la actividad anti-biopelícula de la composición según la invención se observa incluso a muy bajas concentraciones de extracto de mirto; es decir a partir de 0,01% en peso con respecto al peso total de la composición.

La cantidad de extracto en la composición está comprendida entre 0,01% y 1%, y preferentemente entre 0,03% y 1%.

Ventajosamente, la cantidad de extracto es inferior o igual a 0,1%.

Más particularmente, la cantidad de extracto es superior o igual a 0,01% e inferior o igual a 0,1%. De manera aún más preferida, la cantidad de extracto es superior o igual a 0,03% e inferior o igual a 0,1%.

Por "agente anti-biopelícula contra *Propionibacterium acnes*" se entiende en el sentido de la presente invención, un agente que permite:

- inhibir la adhesión de la biopelícula de *Propionibacterium acnes* (evitar la formación de la biopelícula de *Propionibacterium acnes*), y/o
- erradicar la biopelícula de *Propionibacterium acnes* establecida (destrucción, desprendimiento).

Con el fin de demostrar la actividad del agente anti-biopelícula, un modelo dinámico de la formación de la biopelícula sobre un soporte inerte, ya usado en otras áreas de investigación (Campanac C., Pineau L., Payard M., Baziard-Mouysset G., Roques C. 2002. Interaction between biocide cationic agents and bacterial biofilms. Antimicrob. Ag. Chemother. May 46 (5) 1469-1474), ha sido específicamente declinado en *P. acnes*. De esta manera, se exploraron los dos aspectos mencionados:

- influencia del extracto en la génesis de la biopelícula de *P. acnes*: esta actividad pone en juego las estructuras implicadas en la adhesión de las células en una superficie, así como en la estructuración de la biopelícula,
- en la erradicación de la biopelícula ya establecida, que pone en juego otras propiedades (detersión, etc.).

El extracto de mirto según la divulgación contribuye a luchar contra *P. acnes* limitando su organización en biopelícula. Esta acción anti-adhesión de las bacterias planctónicas de *P. acnes* y desestructurante de la biopelícula establecida de *P. acnes*, favorecerá la desaparición de las lesiones acnéicas de las pieles acnéicas y/o de las pieles grasas con tendencia acnéica.

El solicitante continuó sus investigaciones sobre la utilización del extracto de mirto como agente anti-biopelícula, y descubrió de una manera sorprendente e inesperada que el extracto de mirto permite disminuir la resistencia de cepas de *P. acnes* -preferentemente las cepas de *P. acnes* organizadas en biopelícula- a los antibióticos administrados que actúan sobre *P. acnes*, preferentemente en forma tópica.

La presente invención describe por lo tanto una composición dermatológica que contiene un extracto de mirto a una concentración superior o igual a 0,01% en peso, para su utilización como agente anti-biopelícula contra *Propionibacterium acnes*.

Ventajosamente, la presente invención describe una composición dermatológica que contiene un extracto de mirto a una concentración superior o igual a 0,01% en peso, para su utilización como agente anti-adhesión de las bacterias planctónicas de *Propionibacterium acnes* y/o como agente de erradicación o de destrucción de las bacterias sésiles de *Propionibacterium acnes* organizadas en biopelícula.

En particular, la presente invención describe una composición dermatológica que contiene un extracto de mirto a una concentración superior o igual a 0,01% en peso, para su utilización como agente anti-adhesión de las

bacterias planctónicas para favorecer su flotación libre.

5 Más particularmente, la presente invención describe una composición dermatológica que contiene un extracto de mirto a una concentración superior o igual a 0,01% en peso, para su utilización anti-biopelícula preventiva contra la adhesión de las bacterias planctónicas.

10 Más particularmente, la presente invención describe una composición dermatológica que contiene un extracto de mirto a una concentración superior o igual a 0,01% en peso, para su utilización preventiva contra la reorganización de las bacterias planctónicas en biopelícula después de su destrucción.

Otro aspecto de la presente invención describe una composición que contiene un extracto de mirto a una concentración de 0,01% a 1% en peso.

15 Según otro aspecto de la presente invención, la cantidad de extracto es superior o igual a 0,01% e inferior o igual a 0,1% en peso.

Según otro aspecto de la presente invención, el extracto de mirto es una fracción apolar que comprende las mirtucomulonas y ácido ursólico.

20 La utilización tópica de la composición según la presente invención está destinada a disminuir la resistencia a un antibiótico administrado preferentemente en forma tópica y que actúa sobre *P. acnes*.

25 Según otro aspecto de la presente invención, la composición se utiliza en el tratamiento del acné o de la foliculitis decalvante.

30 Según otro aspecto de la presente invención, se refiere a un producto de combinación de una composición dermatológica que contiene un extracto de mirto a una concentración de 0,01% a 1% en peso y de una composición dermatológica que contiene por lo menos un antibiótico, en particular, un antibiótico tópico activo sobre *P. acnes*, destinado a una utilización simultánea, separada o espaciada en el tiempo para el tratamiento del acné o de la foliculitis decalvante.

La composición dermatológica del producto de combinación según la invención, contiene una cantidad de extracto de mirto superior o igual a 0,01% e inferior o igual a 0,1% en peso.

35 Según otro aspecto de la invención, el extracto de mirto está a una concentración de 0,1% en peso.

Dichos antibióticos usados habitualmente son la eritromicina, la doxiciclina y la clindamicina.

40 El agente anti-biopelícula según la invención mejora la eficacia terapéutica del antibiótico.

Los antibióticos mencionados anteriormente asociados al extracto de mirto, tienen unas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) inferiores a las de los antibióticos solos.

45 La CMI es la concentración más baja de producto que inhibe el crecimiento de las bacterias.

En el marco del tratamiento de acné, hay un interés real de asociar una antibioterapia con la aplicación de una composición a base de un extracto de mirto como agente anti-biopelícula. Esto permite en efecto, disminuir la resistencia de ciertas cepas de *P. acnes* a la eritromicina o a la clindamicina.

## 50 Formulación/forma galénica

La composición según la presente divulgación puede presentarse en cualquier forma adaptada a la aplicación tópica: crema, gel, barra, suero.

55 La invención se podrá comprender mejor con la ayuda de los siguientes ejemplos y evaluaciones farmacológicas:

### **Ejemplos**

#### 60 1.- Preparación de extracto

##### 60 **1.1.- Ejemplo 1**

65 Se extrae 1 kg de hojas de mirto trituradas mediante 10 volúmenes de acetato de isopropilo bajo agitación a reflujo. Se extrae a reflujo durante 1 hora con agitación. Después de la filtración y aclarado del orujo, se decoloran los jugos de extracción al añadir carbón activado. Después de la filtración, el filtrado decolorado se concentra hasta 2 litros y después, se seca en agua hasta la eliminación del acetato de isopropilo. La fase

acuosa obtenida se seca entonces por liofilización.

1 kg de hojas de mirto permite obtener aproximadamente 25 g de extracto seco de mirto. Éste contiene 7% de mirtucomulonas y 25% de ácido ursólico.

5

## 1.2.- Ejemplo 2

Se extrae 1 kg de hojas trituradas de mirto mediante 5 volúmenes de acetato de isopropilo bajo agitación a reflujo durante 1 hora. Después de la filtración y aclarado del orujo, se decoloran los zumos de extracción al añadir carbón activado. Después de la filtración, el filtrado decolorado se concentra hasta 2 litros y después, se seca en etanol hasta la eliminación del acetato de isopropilo. La fase acuosa obtenida se desodoriza entonces por tratamiento térmico, y después se seca por liofilización.

10

1 kg de hojas de mirto permite obtener aproximadamente 25 g de extracto seco de mirto. Este contiene 7% de mirtucomulonas y 25% de ácido ursólico.

15

## 2- Formulaciones

### 2.1.- Ejemplo 3: FÓRMULA para gel limpiador

20

Sulfato de zinc Coceth (Zetesol Zn<sup>®</sup>, Zchimmer & Schwarz) de 5 a 20%  
 DECILGLUCÓSIDO  
 LAURILBETAÍNA  
 Polisorbato 20 de 0,5 a 4%  
 PEG-5-ETILHEXANOATO de 1 a 3%  
 Ceteareth-60-miristil glicol de 0,5 a 3%  
 SALICILATO DE ZINC de 0,1 a 0,5%  
 EXT. SERENOA REPENS de 0,1 a 0,3%  
 EXTRACTO SECO LIPÓFILO DE MIRTO de 0,01 a 0,1%  
 BENZOATO DE SODIO/ÁCIDO CÍTRICO/HIDRÓXIDO DE SODIO csp

25

30

### 2.2.- Ejemplo 4: Crema

Extracto de mirto 0,03 a 0,1%  
 AHA BHA 1 a 8%  
 Goma de xantano 0,1%  
 Dimeticona 1%  
 Isononanoato cetoestearílico, 12%  
 Estearato de glicerilo 2%  
 Alcohol cetearílico y Ceteareth-33 6%  
 Polimetilmetacrilato 2%  
 Agua csp 100%

35

40

## Evaluación

45

- Obtención de una biopelícula de *P. acnes* en un flujo continuo

El montaje que permite obtener la formación de la biopelícula se describe en la figura 2.

50

Las dos bombas usadas sirven respectivamente:

- para el suministro del bucle en sustrato (bomba nº 1),
- para la agitación del contenido del sistema (bomba nº 2).

55

El conjunto del montaje experimental descrito en la figura 2 se coloca bajo una campana de flujo laminar.

El circuito es alimentado con medio de cultivo. La inoculación se realiza a continuación inyectando a nivel del punto B, una cantidad de suspensión bacteriana de *P. acnes* CIP 53117 para obtener una concentración final en microorganismos de aproximadamente 10<sup>7</sup> UFC/ml.

60

Se distribuyen los microorganismos del inóculo en la totalidad del bucle = fase de homogeneización seguida por una alimentación de sustrato mediante la bomba nº 1.

65

Después de 48 horas de la formación, se obtiene una biopelícula de *P. acnes* CIP 53117.

En el dispositivo experimental ilustrado en la figura 2, las referencias en el dibujo tienen los siguientes

significados:

- P1: Bomba de alimentación de sustrato
- P2: Bomba que sirve para la agitación del circuito
- 5 A-B: Zona de toma de muestras de las porciones de tubo
- B: Zona de inoculación del bucle.
- A-B+: Porción de tubo que contiene la bomba P2.

10 Evaluación de la inhibición de la adhesión del extracto de mirto sobre la la formación de una biopelícula de *P. acnes*.

15 Con el fin de evaluar el efecto inhibidor de adhesión del extracto seco de mirto preparado según el ejemplo 2 en la formación de una biopelícula de *P. acnes* CIP 53117, se prepararon dos montajes como se describe en el párrafo anterior. El primero servirá como de control. El segundo se alimentará con medio de cultivo adicionado con extracto seco de mirto a la concentración final de 0,1% (concentración no letal). El ensayo se lleva a cabo dos veces.

20 Se contaron las bacterias adheridas y planctónicas a 5 h, 24 h y 48 h en el soporte "tratado" *versus* un control sin tratamiento según el siguiente protocolo. La muestra de tubo se recorta longitudinalmente en cuatro tramos idénticos y se raspan las superficies internas de cada una de estas porciones usando una lámina de escalpelo estéril en 10 ml de diluyente.

25 Las porciones del tubo y el líquido se transfieren a continuación a un tubo de ensayo y se someten a agitación durante aproximadamente 1 minuto.

Se cuentan a continuación las bacterias -por esparcido- en una gelosa de cultivo.

30 En los mismos tiempos, se recupera una muestra de efluente para contar las bacterias planctónicas, según el mismo protocolo.

Las placas se incuban a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , bajo condiciones anaeróbicas.

Las UFC se cuentan después de 96 horas de incubación.

35 Los resultados se expresan en UFC/cm<sup>2</sup> para las bacterias adheridas y en UFC/ml de efluente para las bacterias planctónicas.

Resultados

40 Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1.

La estimación de la población cultivable adherida se expresa en log UFC/cm<sup>2</sup> de tubo y la de la población cultivable planctónica en log UFC/ml.

45 Tabla 1. Resultados de la inhibición de adhesión de *P. acnes* por el extracto seco de mirto al 0,1% (p/v). Resultados expresados en log (UFC/cm<sup>2</sup> o ml)

Tiempo de formación	Ensayo	Control		Extracto seco de mirto al 0,1% (p/v)	
		Adheridas	Planctónicas	Adheridas	Planctónicas
		Log (UFC/cm <sup>2</sup> )	Log (UFC/ml)	Log (UFC/cm <sup>2</sup> )	Log (UFC/ml)
5 horas	Ensayo 1	4,28	5,11	3,23	4,04
	Ensayo 2	4,57	4,97	3,20	4,51
	Media	4,42	5,04	3,22	4,27
24 horas	Ensayo 1	4,08	3,67	0,70	3,93
	Ensayo 2	4,77	3,18	2,77	3,32
	Media	4,43	3,42	1,73	3,63
48 horas	Ensayo 1	4,18	2,38	2,04	1
	Ensayo 2	3,46	3,23	0,48	1,08
	Media	3,82	2,81	1,26	1,04

50 Las medias de los resultados obtenidos en las poblaciones adheridas, expresadas en log UFC/cm<sup>2</sup>, se muestran en la figura 3 siguiente.

Una inhibición de la adhesión de *P. acnes* se observa 5 horas después de la inoculación para el montaje con

extracto seco de mirto. Esta inhibición es del orden de 1,2 log. La estimación de la población planctónica es del mismo orden entre los dos montajes (tratado y de control). Después de 24 horas de formación, el fenómeno se mantiene con una inhibición del orden de 2,7 log. Después de 48 horas, esta inhibición se ha mantenido constante, del orden de 2,6 log. Durante este período de tiempo, se observa un descenso significativo de la población planctónica cultivable para los dos montajes (tratado y de control).

Estos resultados demuestran una inhibición de adhesión en las condiciones de prueba, inducida por el extracto seco de mirto al 0,1% (p/v).

10 Evaluación de actividad de desprendimiento

Con el fin de evaluar la actividad de desprendimiento del extracto seco de mirto preparado según el ejemplo 2 en una biopelícula de *P. acnes* CIP 53117 obtenida después de 48 horas de formación como se HA descrito anteriormente.

15 Las condiciones de prueba (véase la figura 4) son las siguientes:

- Actividad de desprendimiento del extracto seco de mirto al 0,1% (p/v) versus agua destilada estéril,
- Tiempo de contacto: 1, 5 y 10 minutos de contacto,
- Temperatura ambiente.

Después de cada tiempo de contacto definido, se toman varias muestras:

- una muestra de tubo para contar las bacterias residuales (2 cm),
- una muestra de la solución de circulación para contar las bacterias resuspendidas.

En el dispositivo experimental mostrado en la figura 4, las referencias tienen los siguientes significados:

- a = muestra de tubo para contar las bacterias residuales
- b = solución en circulación
- P = bomba.

El ensayo se llevó a cabo por duplicado para el extracto seco de mirto y una vez para el agua destilada estéril.

Se realizó un recuento del número de microorganismos adheridos antes de empezar los diferentes tratamientos (control).

Resultados

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2.

La estimación de la población cultivable adherida se expresa en log UFC/cm<sup>2</sup> de tubo y la de la población planctónica cultivable en log UFC/200 ml (volumen de la solución de circulación).

Tabla 2: Resultados de la actividad de desprendimiento de una solución de extracto seco de mirto al 0,1% (p/v) versus agua destilada estéril (EDS) en una biopelícula de *P. acnes* (después de 48 h de formación). Resultados expresados en log (UFC/cm<sup>2</sup> o ml)

Tiempo de contacto	Ensayo	Agua destilada estéril Adheridas Log (UFC/cm <sup>2</sup> )	Extracto seco de mirto al 0,1% (p/v) Adheridas Log (UFC/cm <sup>2</sup> )
T0	Ensayo 1	4,46	4,46
	Ensayo 2	4,23	4,23
Media	Media	4,35	4,35
1 minuto	Ensayo 1	3,28	1,00
	Ensayo 2	-	1,72
		3,28	1,36
5 minutos	Ensayo 1	4,00	0,90
	Ensayo 2	-	0,48
Media	Media	4,00	0,69
10 minutos	Ensayo 1	3,30	0,48
	Ensayo 2		0,90
Media	Media	3,30	0,69

La serie de control realizada con agua destilada estéril permitió validar el ensayo puesto que no se observó ninguna reducción notable de población cultivable adherida (<1 log de reducción = eliminación de las primeras

capas superficiales de la biopelícula).

5 La actividad de desprendimiento de una solución de extracto seco de mirto al 0,1% (p/v) *versus* agua destilada estéril en una biopelícula de *P. acnes* (después de 48 horas de formación) expresada en log (UFC/cm<sup>2</sup>) se muestra en la figura 5.

En presencia de extracto seco de mirto al 0,1% (p/v), se observa una reducción significativa de la población adherida. Es del orden de 3 log después de 1 minuto de contacto.

10 La ampliación del tiempo de circulación de la solución de 1 a 5 minutos, permite una ganancia suplementaria en términos de desprendimiento del orden de 0,7 log.

Evaluación de la actividad de la asociación eritromicina/extracto de mirto en una biopelícula de *P. acnes*

15 Se prepara el extracto de mirto según el ejemplo 2.

Identificación de las cepas

Se consideraron cuatro cepas de *Propionibacterium acnes*:

20 2 cepas resistentes a la eritromicina (ERY R)

- *Propionibacterium acnes* CIP 110371
- aislado clínico R4

25 2 cepas sensibles a la eritromicina (ERY S)

- *Propionibacterium acnes* CIP 53117T
- aislado clínico B872

30 Protocolo

Una suspensión titulada en aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/ml de *P. acnes*, en un caldo mínimo que no permite crecimiento bacteriano, se depositó en unas cúpulas de una microplaca de 24 pocillos.

35 Las microplacas se colocan en condiciones anaeróbicas a 37 ± 2°C durante 48 h, el tiempo de formación de una biopelícula establecida.

40 Después de 48 h, se elimina el sobrenadante de cada pocillo, y después se enjuagan las cúpulas. Se añade la eritromicina y el extracto de mirto en diferentes concentraciones durante un tiempo de contacto de 24 h en las células adheridas (o sea, 72 horas de adhesión en total). La concentración de eritromicina seleccionada es de 1000 µg/ml. A esta concentración, se verificó, en las bacterias aisladas, que este antibiótico tenía una actividad bactericida (entre 4 y 5 log de reducción en 24 horas) frente a las 2 cepas ery sensibles y no tenía ninguna actividad bactericida frente a las 2 cepas ERY R.

45 Después de 72 h de adhesión:

- se cuentan las células planctónicas
- se cuentan las células adheridas (sésiles) después de enjuagar el pocillo y después de raspado en la sal de triptona

Se realizaron unos controles en paralelo (células adheridas + planctónicas)

- 55
- control biopelícula 72H (con etapa de renovación del medio a las 48 h)
  - control mirto a diferentes concentraciones (adición después de 48 h/contacto 24 h)
  - control eritromicina 1000 µg/ml (adición a las 48 h/contacto 24 h)
  - control extracto de mirto a las concentraciones ensayadas

60 Para todos los pocillos en contacto con la eritromicina, se filtró 1 ml de cada dilución sobre una membrana (Microfil<sup>®</sup>, Millipore) y después, el filtro se enjuagó tres veces con 50 ml de agua destilada estéril. Las membranas se depositaron sobre gelosa Columbia + 5% de sangre de cordero. Las placas se incubaron a 37 ± 2°C bajo condiciones anaeróbicas. Después de 72 h a 96 h de incubación, se cuentan las UFC (Unidades Formadoras de Colonias).

65 Para todos los controles biopelícula y extracto de mirto solo, se inoculan 100 µl de cada dilución por esparcido

sobre gelosa Columbia + 5% de sangre de cordero. Las placas se incuban a  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$  bajo condiciones anaeróbicas. Después de 72 h a 96 h de incubación, se cuentan las UFC.

Resultados

5 Este ensayo consistió en evaluar la actividad de la eritromicina (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) combinada con el extracto de mirto, a las concentraciones de 0,03%, 0,001% y 0,0001%. Los resultados se expresan en log de la población contada.

10 Tabla 3: Cepas de colección/límite de detección a 1,3 log

Condiciones		Log (número de UFC/pocillo)			
		<i>P. acnes</i> CIP 53117T (eryS)		<i>P. acnes</i> CIP 110371 (eryR)	
		Células adheridas	Células planctónicas	Células adheridas	Células planctónicas
T 72h	Control	5,1	5,5	5,3	5,0
	Control Eri 1000	4,3	1,3	4,1	4,2
	Control Mir 0,03%	1,3	1,3	1,3	1,3
	Control Mir 0,001%	3,5	3,6	3,8	4,1
	Control Mir 0,0001%	5,0	5,2	4,6	5,2
	Eri 1000 + Mir 0,03%	1,3	1,3	1,3	1,3
	Eri 1000 + Mir 0,001%	2,4	1,3	2,1	2,9
	Eri 1000 + Mir 0,0001%	3,0	1,3	2,4	2,8

Resultados ERY S - cepas de colección

15 La actividad de la eritromicina (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) combinada con el extracto de mirto, a las concentraciones de 0,03%, 0,001% y 0,0001%, se muestra en la figura 6.

Resultados ERY R - cepas de colección

20 La actividad de la eritromicina (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) combinada con el extracto de mirto, a las concentraciones de 0,03%, 0,001% y 0,0001%, se muestra en la figura 7.

Tabla 4: Aislados

Condiciones		Log (número de UFC/pocillo)			
		<i>P. acnes</i> B872 (eryS)		<i>P. acnes</i> R4 (eryR)	
		Células adheridas	Células planctónicas	Células adheridas	Células planctónicas
T 72h	Control	4,4	4,0	4,5	3,7
	Control Eri 1000	4,0	1,3	3,5	3,5
	Control Mir 0,03%	1,3	1,3	1,3	1,3
	Control Mir 0,001%	3,6	3,4	3,7	3,5
	Control Mir 0,0001%	4,4	4,2	4,6	4,4
	Eri 1000 + Mir 0,03%	1,4	1,3	1,4	1,3
	Eri 1000 + Mir 0,001%	2,3	1,3	1,8	2,0
	Eri 1000 + Mir 0,0001%	2,4	1,3	2,5	3,2

25 Resultados ERY S - aislados

La actividad de la eritromicina (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) combinada con el extracto de mirto, a las concentraciones de 0,03%, 0,001% y 0,0001%, se muestra en la figura 8.

30 Resultados ERY R - aislados

La actividad de la eritromicina (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) combinada con el extracto de mirto, a las concentraciones de 0,03%, 0,001% y 0,0001%, se muestra en figura 9.

35 **Conclusión general**

*Extracto solo*

40 Se observa una actividad bactericida importante del extracto de mirto solo para la concentración de 0,03%, tanto frente a las cepas eryS como frente a las cepas eryR.

Los resultados obtenidos ilustran asimismo que el extracto de mirto solo tiene una actividad significativa - ciertamente sobre las bacterias planctónicas- pero también sobre las bacterias *P. acnes* adheridas (efecto dependiente de la dosis).

- 5 Las concentraciones menos activas de extracto de mirto (0,001% y 0,001%) se eligieron para poder poner en evidencia los efectos de la tratamiento extracto de mirto-tratamiento antibiótico de tipo eritromicina.

*Eritromicina sola*

- 10 Los resultados confirman que la organización de las bacterias de *P. acnes* en biopelícula (eryS y eryR) disminuye su sensibilidad a la eritromicina.

Se ha verificado además que las cepas eryR planctónicas presentan una resistencia a la eritromicina.

- 15 Finalmente, la actividad bactericida de la eritromicina es elevada sobre las cepas eryS.

Asociación extracto de mirto y eritromicina

- 20 Una destrucción de la biopelícula (disminución del número de bacterias de *P. acnes* organizadas en biopelícula) y una eliminación de una parte de la población planctónica (bacterias desprendidas de la biopelícula) se observa para los 3 pares evaluados. Se observa una ganancia de por lo menos 1 log de reducción de la población adherida para las concentraciones más bajas de extracto de mirto (0,001% y 0,0001%) asociado con la eritromicina, en comparación con la eritromicina sola o con el extracto solo. Para la concentración de extracto de mirto superior (0,03%), el efecto de una sinergia está enmascarado por la fuerte actividad del extracto.

- 25 De esta manera, se observó una potenciación de acción al combinar un extracto de mirto con un antibiótico de referencia. En efecto, el extracto de mirto permite disminuir la resistencia de las cepas *P. acnes* en biopelícula a la molécula de referencia en la terapia de antibiótico. El extracto de mirto optimiza la acción de la eritromicina frente a las bacterias *P. acnes*.

30

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición dermatológica que contiene un extracto de mirto a una concentración de 0,01% a 1% en peso, para su utilización como agente anti-adhesión de las bacterias planctónicas de *Propionibacterium acnes* y/o como agente de erradicación o de destrucción de las bacterias sésiles de *Propionibacterium acnes* organizadas en biopelícula, siendo esta utilización tópica y estando destinada a disminuir la resistencia a un antibiótico que actúa sobre *P. acnes*.
- 10 2. Composición para su utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que la utilización es una utilización como agente anti-adhesión de las bacterias planctónicas para favorecer su flotación libre.
3. Composición para su utilización según la reivindicación 2, caracterizada por que la utilización es una utilización anti-biopelícula preventiva contra la adhesión de las bacterias planctónicas.
- 15 4. Composición para su utilización según la reivindicación 2, caracterizada por que la utilización es una utilización preventiva contra la reorganización de las bacterias planctónicas en biopelícula tras su destrucción.
- 20 5. Composición para su utilización según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que la cantidad de extracto es superior o igual a 0,01% e inferior o igual a 0,1% en peso.
6. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que el extracto de mirto es una fracción apolar que comprende las mirtucomulonas y ácido ursólico.
- 25 7. Composición para su utilización según la reivindicación 6, caracterizada por que las mirtucomulonas comprenden principalmente las mirtucomulonas A, B', D, B, la isosemimirtucomulona y la semimirtucomulona, ventajosamente con un contenido en mirtucomulonas totales comprendido entre 3% y 10% en peso, con respecto al peso total del extracto de mirto.
- 30 8. Composición para su utilización según la reivindicación 6, caracterizada por que el contenido en ácido ursólico está comprendido entre 10% y 30% en peso, con respecto al peso total del extracto de mirto.
9. Composición para su utilización según la reivindicación 6, caracterizada por que el contenido en ácido ursólico es inferior a 15% en peso, con respecto al peso total del extracto de mirto.
- 35 10. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada por que el antibiótico es administrado en forma tópica.
- 40 11. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada por que la composición se utiliza en el tratamiento del acné.
12. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada por que la composición se utiliza en el tratamiento de la foliculitis decalvante.
- 45 13. Producto de combinación de una composición dermatológica que contiene un extracto de mirto a una concentración de 0,01% a 1% en peso y de una composición dermatológica que contiene por lo menos un antibiótico, destinado a una utilización simultánea, separada o espaciada en el tiempo para el tratamiento del acné, o de la foliculitis decalvante.
- 50 14. Producto según la reivindicación 13, caracterizado por que la composición dermatológica contiene una cantidad de extracto de mirto superior o igual a 0,01% e inferior o igual a 0,1% en peso.

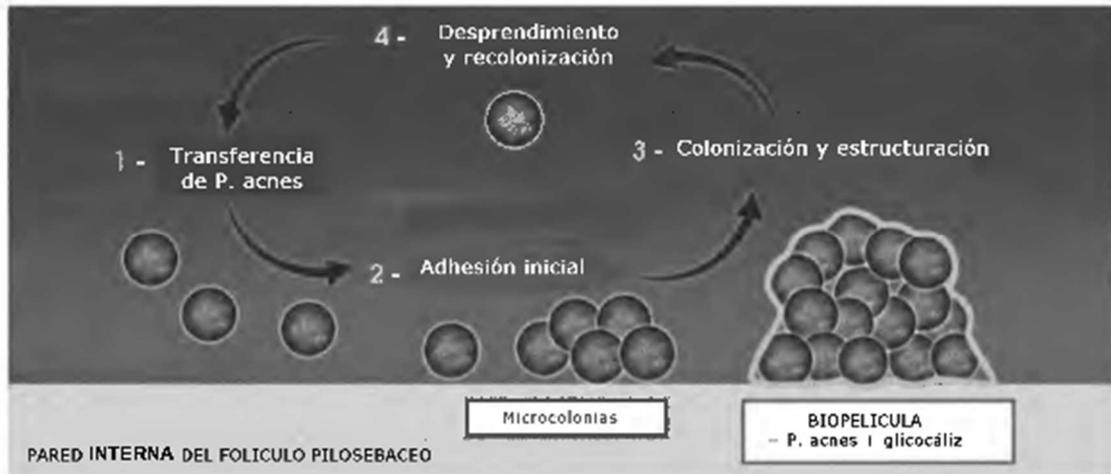


Figura 1

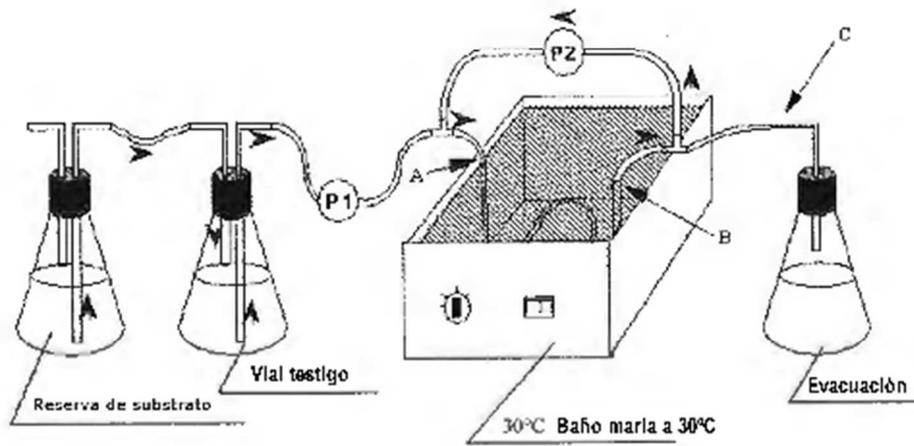


Figura 2

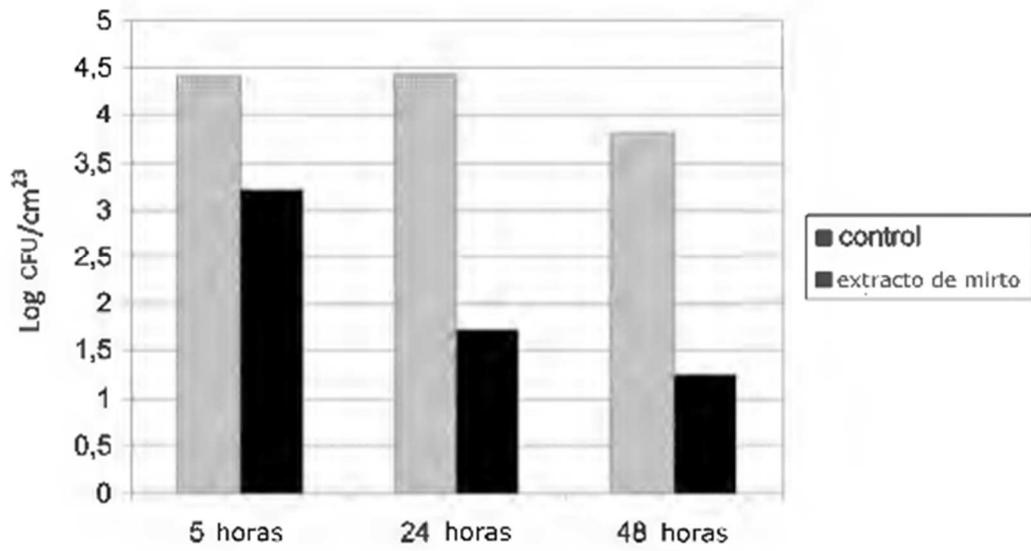


Figura 3

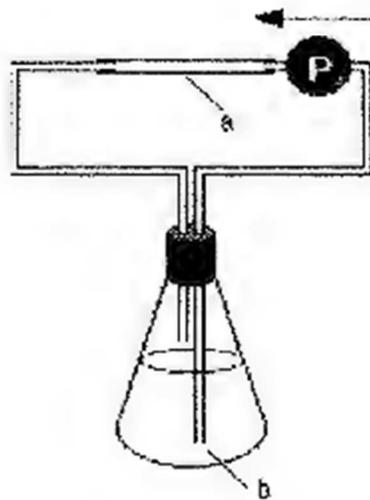


Figura 4

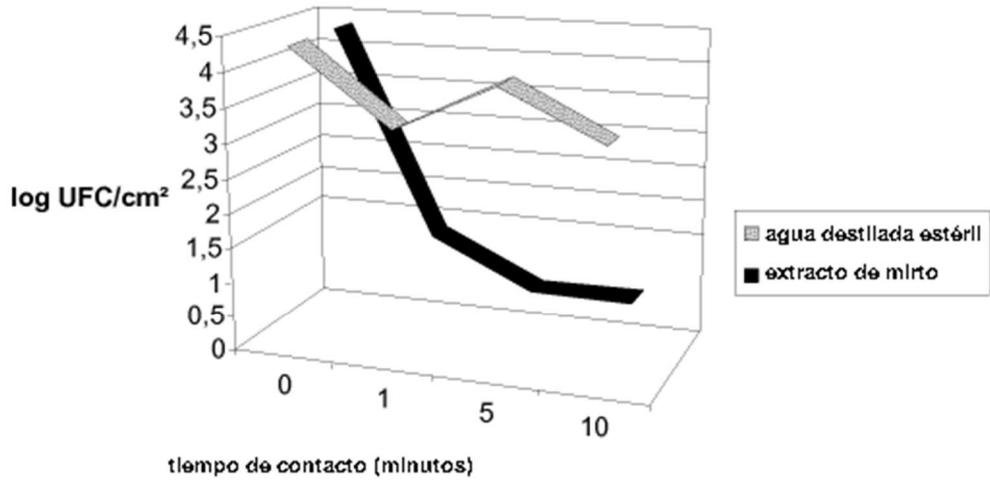


Figura 5

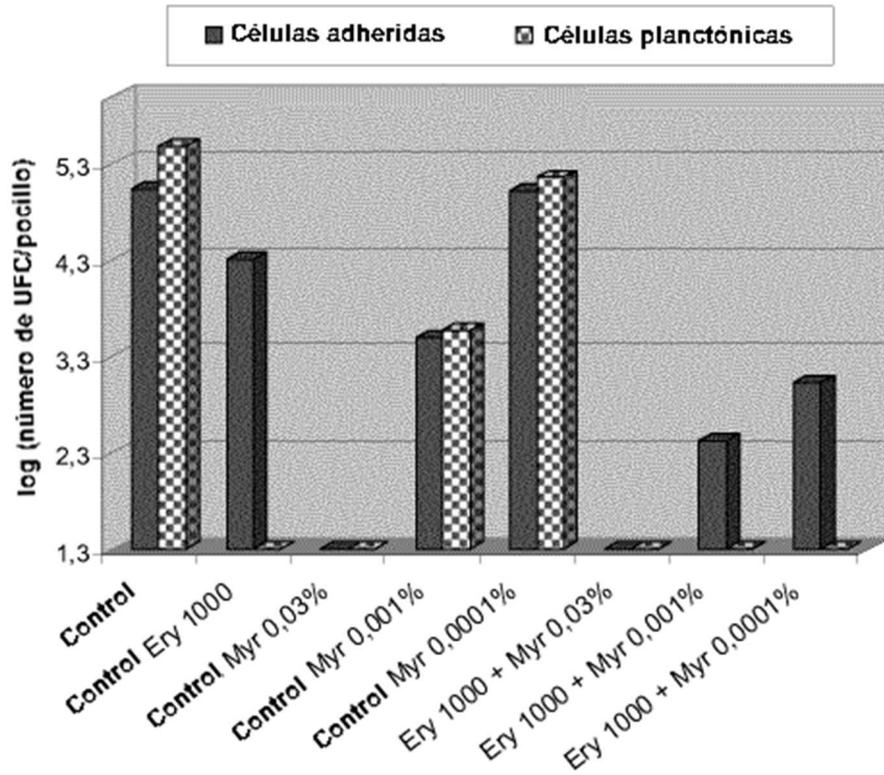


Figura 6

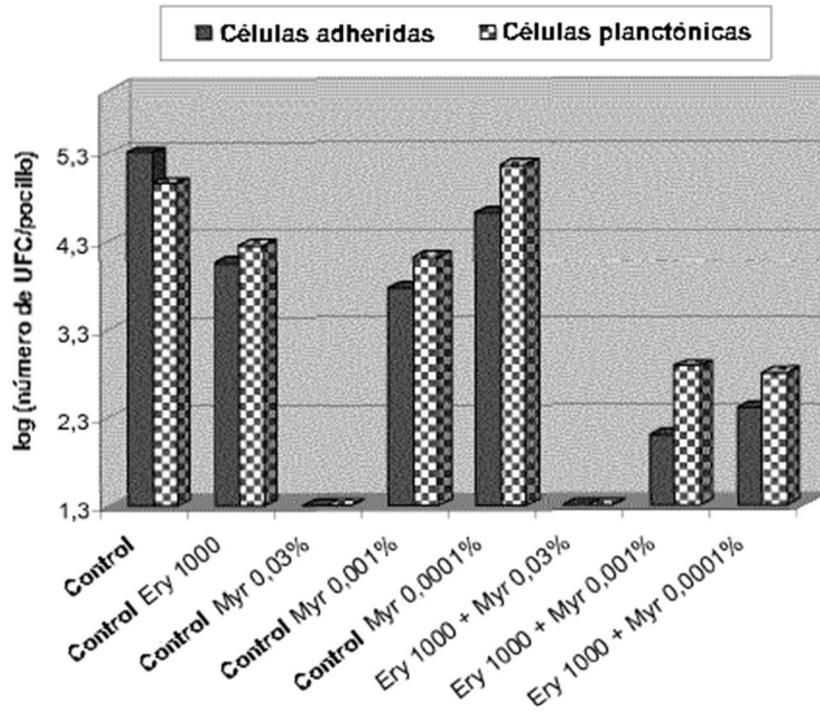


Figura 7

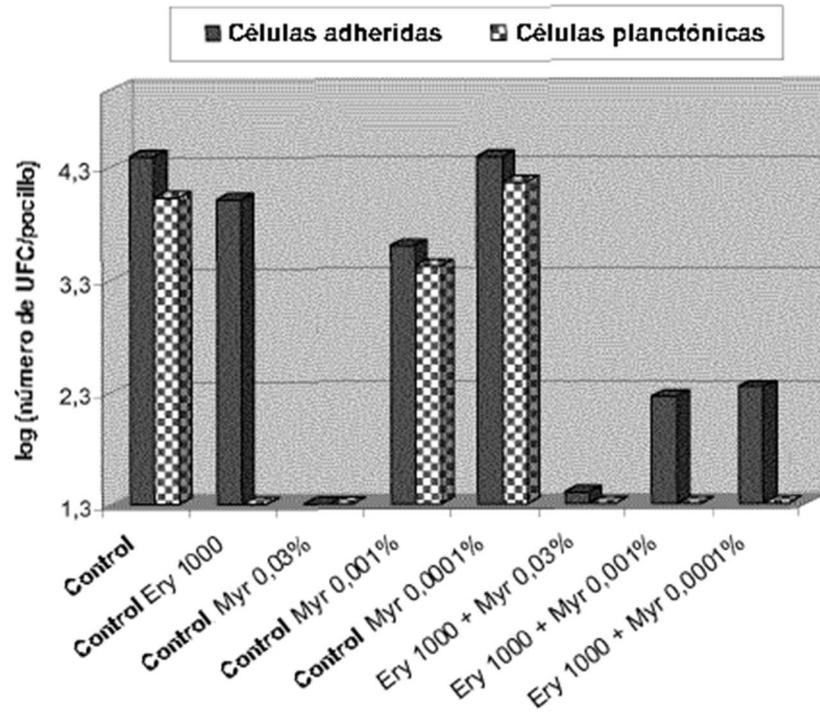
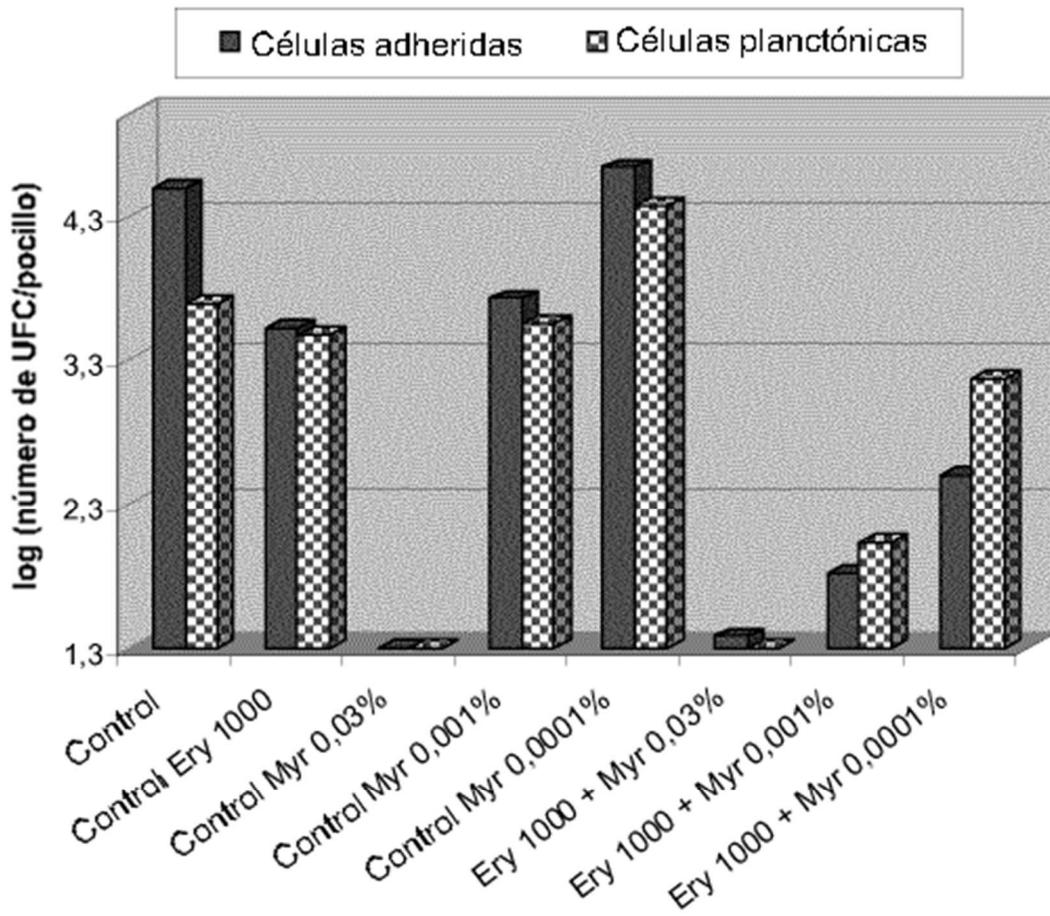


Figura 8



**Figura 9**