

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 530**

51 Int. Cl.:

A61K 35/64 (2015.01)

A61K 31/728 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2014 PCT/FR2014/051123**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14202851**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2014 E 14731686 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 3010516**

54 Título: **Composición cicatrizante y utilización**

30 Prioridad:

20.06.2013 FR 1355810

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

11.03.2019

73 Titular/es:

**MELIPHARM (100.0%)
Ester Technopole
87000 Limoges, FR**

72 Inventor/es:

**QUERO, FABIEN;
MALEPEYRE, CARMEN;
RAYNAUD, ANAÏS y
PETIT, JEAN-MICHEL**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 703 530 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición cicatrizante y utilización.

5 La presente invención se refiere a una composición particular constituida por miel y por lo menos un
constituyente de la matriz extracelular y/o por lo menos un betaglucano, y a su utilización sobre la piel o las
mucosas para una actividad cicatrizante y/o antibacteriana. Una herida es una ruptura de la barrera cutánea que,
además de la lesión de órganos subyacentes, puede provocar la penetración de agentes infecciosos en el
10 organismo. Los tejidos humanos y animales son capaces de reparar una herida mediante unos procesos de
reparación que les son propios, y la cicatrización es un fenómeno biológico natural. Esta capacidad sigue siendo
no obstante sometida a numerosas variaciones, dependiendo la rapidez y la calidad de la cicatrización de una
herida del estado general del organismo afectado, del estado y de la localización de la herida, y de la aparición o
de la ausencia de una infección.

15 Por eso, en caso de lesión cutánea, es necesario recurrir a la aplicación de productos que favorecen la
cicatrización. Existen actualmente varios productos cicatrizantes.

Algunos de estos productos cicatrizantes actúan manteniendo un entorno húmedo para favorecer la cicatrización,
como por ejemplo unos hidrocoloides constituidos por polímeros absorbentes y otros gelificantes, unos alginatos,
20 constituidos por alginato de calcio y de sodio, unos hidrogeles, unas vendas absorbentes o unas vendas con
ácido hialurónico. Estos productos, aunque favorecen la cicatrización generando un entorno húmedo, no
presentan propiedades antibacterianas. Unas variantes de estos productos a base de plata o de yodo han sido
desarrollados por lo tanto para contrarrestar esta laguna. Sin embargo, a pesar de ser muy antibacterianas, las
vendas con plata adolecen frecuentemente del inconveniente de ser citotóxicas. Inducen la muerte celular de las
25 células implicadas en la cicatrización de las heridas. Por lo tanto, se desaconseja utilizar las vendas a base de
plata durante largos periodos debido a su citotoxicidad. En cuanto a los productos a base de yodo, éstos son
también citotóxicos y su actividad antimicrobiana disminuye en gran medida en presencia de materia orgánica
(pus, fibrina o necrosis). Además, existen riesgos de sensibilización con eczema de contacto y alergia a estos
productos.

30 Por ello, la presente invención tiene por objetivo proponer una composición a base de miel que palia los
inconvenientes de la técnica anterior, simple de fabricación, económica, fácil de aplicación y que genera al mismo
tiempo un entorno húmedo y una actividad antibacteriana con el fin de reunir las condiciones favorables para una
cicatrización rápida y eficaz sin generar la toxicidad de los productos antes citados.

35 Con este fin, la invención prevé una composición que comprende una mezcla de miel y de por lo menos un
constituyente de la matriz extracelular seleccionado de entre el colágeno, la elastina y los glicosaminoglicanos,
en particular el ácido hialurónico y/o de por lo menos un betaglucano, para su utilización como producto de salud
cicatrizante y/o antibacteriano de aplicación tópica.

40 Es conocida la utilización de vendas y de cuidados con miel para el tratamiento de algunas infecciones a nivel de
las heridas. Se sabe en particular que la miel presenta unas propiedades antibacterianas y antifúngicas y que
permite reducir el tiempo de cicatrización, sin infección ni efectos secundarios.

45 Varios documentos describen la utilización de la miel para el tratamiento de las heridas como, en particular, las
patentes CH 699 182, US nº 6.630.442, US 2003/021834 o US 2011/10427, pero estos productos no son
eficaces como producto cicatrizante o antibacteriano. Es el caso también de las publicaciones: Cooper R A *et al.*
«Antibacterial activity of honey against strains of Staphylococcus aureus from infected wounds» Journal of the
Royal Society of Medicine, London GB, vol. 92, nº 6, 1 junio 1999 ; Alandejani T *et al.* «Effectiveness of honey on
50 Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa biofilms» Otolaryngology and head and neck surgery,
Rochester, US, vol. 141, nº 1, 1 julio 2009 ; Molan P C «Potential of honey in the treatment of wounds and burn »
American Journal of Clinical Dermatology, ADIS, US, vol. 2, nº 1, 1 febrero 2001.

Además, se han descrito otras soluciones de cicatrizaciones en las publicaciones siguientes: Solidati D *et al.*
55 «Mucosal wound healing after nasal surgery. A controlled clinical trial on the efficacy of hyaluronic acid containing
cream», Drugs under experimental and clinical research, vol. 25, nº 6, páginas 253-261; Leon-Villapalos J *et al.*:
«Topical management of facial burns», Burns, Butterworth Heinemann, GB, vol. 34, nº 7, 1 noviembre 2008,
páginas 903-911 ; Davis S C *et al.* : «Cosmeceuticals and natural products : wound healing», Clinics in
Dermatology, J.B. Lippincott, Philadelphia, PA, US, vol. 27, nº 5, 1 septiembre 2009 ; Singh Onkar *et al.* :
60 «Collagen dressing versus conventional dressings in burn and chronic wounds: a retrospective study», Journal of
Cutaneous and Aesthetic Surgery Ene 2011, vol. 4, nº 1, enero 2011; pero las soluciones propuestas no son
satisfactorias.

70 Ventajosamente, en comparación con los productos descritos en estos documentos, la mezcla según la
invención presenta un efecto sinérgico importante y sorprendente, que permite proponer una composición
cicatrizante, reparadora y antibacteriana, con una buena tolerancia y sin efectos secundarios notorios, y con unas

propiedades que superan a las de los productos que existen actualmente.

Otras características y ventajas se desprenderán de la descripción detallada de la invención siguiente.

5 La invención prevé por lo tanto una composición para su utilización como producto de salud cicatrizante y/o antibacteriano de aplicación tópica sobre la piel o las mucosas, que comprende:

- entre 5% y 99,8% de miel, y

10 - por lo menos un constituyente de la matriz extracelular seleccionado de entre colágeno, elastina y glicosaminoglicanos entre los cuales el ácido hialurónico que, si está comprendido en la composición, está presente a razón de 0,05 a 10% y/o por lo menos un betaglucano.

Los porcentajes se dan en peso con respecto al peso de materia seca de la composición.

15 Por miel, en el sentido de la invención, se entiende una miel natural o una miel artificial, o también una mezcla de varias mieles naturales y/o artificiales.

20 Por miel artificial, se entiende por lo menos un azúcar. Puede tratarse también de la combinación de por lo menos dos azúcares.

Preferentemente, la miel es una miel natural seleccionada de entre las mieles de tomillo, de melazo, de alforfón, de manuka y sus mezclas. Puede tratarse, por ejemplo, de una miel tal como se describe en la solicitud FR 1 258 722.

25 Si la miel utilizada en la composición es una miel artificial, se trata preferentemente de una mezcla sacarídica que comprende mayoritariamente glucosa y/o fructosa y/o sacarosa.

La composición según la invención, además de la miel, comprende:

30 - por lo menos un constituyente de la matriz extracelular seleccionado de entre colágeno, elastina y glicosaminoglicanos tales como ácido hialurónico, heparanos sulfatos, queratanos sulfatos o condroitinas sulfatos, y/o

35 - por lo menos un betaglucano.

Los betaglucanos presentes en la composición son unos polisacáridos constituidos por unidades glucosa unidas por unos enlaces $\beta(1,3)$ y/o $\beta(1,4)$ y/o $\beta(1,6)$.

40 Puede tratarse, por ejemplo, de betaglucanos que tienen un peso molecular comprendido entre $0,5 \cdot 10^6$ Da y $1 \cdot 10^6$ Da.

45 Los glicosaminoglicanos presentes en la composición se pueden seleccionar de entre el ácido hialurónico, los heparanos sulfatos, los queratanos sulfatos y/o los condroitinas sulfatos. El ácido hialurónico presente en la composición es preferentemente una sal de ácido hialurónico o un derivado de ácido hialurónico, aún más preferentemente una sal sódica de ácido hialurónico de peso molecular superior a 20 kDa.

50 Según un modo de realización adaptado, el ácido hialurónico presente en la composición presenta un peso molecular superior a 100000 Da.

El colágeno presente en la composición es preferentemente un péptido de colágeno procedente de hidrolizado de colágenos de pescado, de cerdo o de buey, o un péptido biomimético de colágeno.

55 La elastina presente en la composición es preferentemente un hidrolizado de tendón de buey o un biomimético de elastina.

Según un modo de realización particularmente adaptado, la composición comprende entre 5% y 99,8% de miel en peso de materia seca de la composición.

60 Si la composición comprende ácido hialurónico, éste está presente entre 0,05% y 10% en peso de materia seca de la composición, aún más preferentemente entre 0,5% y 1%.

Si la composición comprende colágeno, éste está presente entre 0,001% y 50% en peso de materia seca de la composición, aún más preferentemente entre 0,001% y 5%.

65 Si la composición comprende elastina, ésta está presente entre 1% y 25% en peso de materia seca de la

composición, aún más preferentemente entre 5% y 10%.

Si la composición comprende un glicosaminoglicano diferente del ácido hialurónico, éste está presente entre 0,1% y 20% en peso de materia seca de la composición, aún más preferentemente entre 0,1% y 10%.

Si la composición comprende un betaglucano, éste está presente entre 0,01% y 10% en peso de materia seca de la composición, aún más preferentemente entre 0,01% y 5%.

La composición puede estar compuesta exclusivamente:

- por miel, y
- por colágeno y/o por elastina y/o por glicosaminoglicanos (en particular por ácido hialurónico) y/o por betaglucano, o por una mezcla de éstos.

Puede también contener además lactoferrina, glucosa-oxidasa, óxido de zinc, lactoperoxidasa, tiocianatos, lisozima, xilitol, vanillina, azúcares tales como galactosa, dextrosa, ramnosa, manosa, téflose[®], oligosacáridos, ácido lactobiónico, bisabobol, alantoína, aloe vera, própolis, escualeno, vitaminas, pantenol, ceramidas, bentonita y/o caolín.

Puede también contener unos excipientes seleccionados de entre los excipientes dermatológicamente compatibles y/o aplicables sobre las mucosas con el fin de obtener una composición líquida tal como una loción, o semisólida, tales como una crema, una pomada, un spray, un gel, una pasta, un supositorio, un óvulo o un polvo. Puede tratarse, por ejemplo, de excipientes tales como unos azúcares y derivados de azúcares, unos polisacáridos (pectinas, almidón y derivados, alginatos y derivados, quitosano y derivados, derivados de celulosa, gomas), unos polímeros de síntesis, unas ceras, unos aceites naturales o no, unas mantecas, unas ceras, unos productos minerales (sílice, talco, arcillas, óxido de titanio), unos glicéridos y otros ésteres grasos, unos tensioactivos, agua, etanol, propilenglicol, butilenglicol, polietilenglicol, glicerol, sorbitol, hidrocarburos y siliconas, proteínas y péptidos y otros excipientes conocidos por el experto en la materia.

La composición puede contener también unos aditivos auxiliares de formulación tales como tensioactivos, agentes gelificantes, agentes absorbentes, agentes humectantes, disolventes, agentes de esparcimiento, estabilizantes, complejantes, modificadores reológicos, conservantes, antioxidantes y antimicrobianos, colorantes y perfumes.

Según una variante particularmente adaptada de la invención, la composición comprende además de la miel, por lo menos ácido hialurónico y por lo menos un betaglucano.

La composición según la invención puede ser estéril, es decir que ha sufrido un procedimiento de esterilización. La esterilización se realiza preferentemente por radiación gamma.

La composición según la invención se puede obtener por simple mezcla de los constituyentes. Preferentemente, si la composición contiene:

- un glicosaminoglicano: se obtiene mediante la dispersión de un polvo (por ejemplo un polvo fino de ácido hialurónico) o de una solución (por ejemplo una solución de ácido hialurónico) en una composición de miel,
- un betaglucano: se obtiene por dispersión del betaglucano en una composición de miel, o bien en forma de polvo, o bien en forma de una solución de betaglucano,
- colágeno: se obtiene por adición del colágeno en una composición de miel en forma de polvo o en forma de una solución,
- elastina: se obtiene por dispersión de una solución de elastina en una composición de miel.

Si el procedimiento es un procedimiento en caliente, la temperatura de calentamiento de la miel o de la mezcla que contiene la miel debe ser inferior a 40°C.

La composición según la invención puede presentarse en polvo o en diferentes formas líquidas o semilíquidas, en particular loción, crema, emulsión, gel, pomada, spray, óvulo vaginal, supositorios.

La composición se utiliza como producto cicatrizante y/o antibacteriano. En efecto, la mezcla de miel y de betaglucano y/o de componente de la matriz extracelular, actúa en sinergia para al mismo tiempo:

- aumentar la proliferación y la migración de las células de la piel, en particular de los fibroblastos y de los

queratinocitos,

- disminuir la carga bacteriana, y favorecer así indirectamente la cicatrización.

5 Los efectos obtenidos son mucho mejores que los obtenidos con la miel sola o los betagluconos solos o un
componente de la matriz extracelular solo. Existe un efecto sinérgico sorprendente. A nivel celular, la miel sola o
los betagluconos solos o los componentes de la matriz extracelular solos permiten aumentar la proliferación de
los fibroblastos y de los queratinocitos, pero cuando se utilizan juntos, el aumento de la proliferación de los
10 fibroblastos y de los queratinocitos es más importante que la suma de las proliferaciones inducidas por los
constituyentes solos (véanse en particular los resultados de ensayos de los puntos 3 a 6). Además, a nivel
bacteriano, ni el ácido hialurónico, ni los betagluconos, ni la miel cuando están muy diluidos, presentan una
actividad antibacteriana. Sin embargo, la asociación de los constituyentes según la invención, en particular la
asociación del ácido hialurónico con la miel o de betaglucono con la miel o del ácido hialurónico y de betaglucono
15 con la miel, con la misma concentración, muestra una inhibición importante de la proliferación bacteriana (véase
la tabla 1).

Según la invención, la composición puede ser por lo tanto utilizada ventajosamente como producto de salud de
aplicación tópica sobre la piel o las mucosas en el ser humano o el animal, muy preferentemente como:

- 20 - dispositivo médico destinado a ser aplicado sobre irritaciones o lesiones cutáneas, en particular para:

- * el tratamiento de las quemaduras de primer y segundo grado,
- * el tratamiento y/o la prevención de las desuniones posoperatorias de cicatriz,
- * el tratamiento y/o la prevención posoperatoria de las cavidades residuales de los sinus pilonidales,
- 25 * el tratamiento de las cicatrices quirúrgicas infectadas después del aplanamiento,
- * el tratamiento de las úlceras y escaras,
- * el tratamiento de heridas traumáticas y/o quirúrgicas,
- * el tratamiento de heridas agudas y crónicas,
- * el tratamiento de heridas cancerológicas,
- 30 * el tratamiento de sitios de estomías,
- * el tratamiento de dermoabrasiones,
- * el tratamiento de heridas superficiales.

- 35 - una composición, por ejemplo un dispositivo médico o una composición dermatológica, para el tratamiento
de las dermatitis, del acné o de los eritemas de las nalgas, impétigo, foliculitis, furúnculo, panadizo,
micosis,

- gel bucal, en particular destinado a tratar las aftas y las mucositis,
- barra o bálsamo de labios destinado a tratar las grietas,
- 40 - crema para las manos y los pies destinada en particular al tratamiento de las fisuras y de los sabañones,
- bálsamo destinado a la prevención, al cuidado y/o al tratamiento de las fisuras del pezón,
- gel vaginal,
- gel rectal, supositorio o crema rectal.

45 Por dispositivo médico, se entiende un producto destinado a ser utilizado en el ser humano o el animal con fines
en particular de prevención, de control, de tratamiento y/o de atenuación de una enfermedad o de una herida.

Si se trata de un dispositivo médico para la cicatrización de lesiones cutáneas que se presentan en forma de
polvo, spray, gel, crema o pomada, la composición según la invención puede aplicarse en particular según el
50 protocolo de utilización siguiente:

- aclarar la herida y secarla suavemente,
- recubrir la integralidad de la herida o la venda secundaria con una película de la composición según la
55 invención,
- recubrir con compresas y con una venda oclusiva durante las primeras aplicaciones para las heridas muy
exudativas.

60 En fase de detersión, y en función del estado de la herida, se aconseja volver a realizar el vendaje una a dos
veces en 24 horas.

En fase de brote, se aconseja volver a realizar el vendaje cada 48 a 72 horas.

65 En fase de epitelización, se aconseja volver a realizar el vendaje cada 3 o 4 días.

La invención se ilustra ahora mediante unos ejemplos de composición y unos resultados de ensayos que demuestran su eficacia.

A. Ejemplos de composición según la invención

5

1. Ejemplo 1

La composición del ejemplo 1 es un gel hiperosmótico. Está constituida por:

- 10
- 99,8% de una mezcla de mieles de tomillo, melazo, alforfón y manuka,
 - 0,2% de hialuronato de sodio.

siendo los porcentajes dados en peso con respecto al peso total de materia seca de la composición.

15 La composición se obtiene por mezcla de los dos compuestos.

2. Ejemplo 2

La composición del ejemplo 2 es una pomada constituida por:

20

- csp 100% de miel de tomillo,
- 25% de triglicéridos,
- 11% de cera de abeja,
- 7,5% de manteca de karité,
- 25 - 1,83% de tocoferol acetato,
- 5% de gliceril estearato,
- 0,2% de hialuronato de sodio,
- 0,07% de tocoferol,

30 siendo los porcentajes unos porcentajes en peso con respecto al peso total de la materia seca de la composición.

La composición se obtiene mediante la realización de las etapas siguientes:

35

- dispersar finamente el hialuronato de sodio en la miel,
- calentar la mezcla a menos de 40°C,
- calentar la fase lipófila (cera, manteca y glicérido) a aproximadamente 70°C para fundir los sólidos,
- cuando la fase lipófila ha alcanzado la temperatura de 40°C, añadir el tocoferol acetato y el tocoferol y la mezcla de miel y de hialuronato de sodio,
- 40 - mezclar la pomada hasta enfriamiento.

3. Ejemplo 3

45 La composición del ejemplo 3 es una crema constituida por:

50

- csp 100% de miel artificial,
- 30% de glicerol,
- 10,3% de manteca de karité,
- 50 - 5% de cetearil alcohol y cetearil glucósido,
- 2% de cera de abeja blanca,
- 1,82% de tocoferol acetato,
- 0,8% de ácido esteárico,
- 0,2% de hialuronato de sodio,
- 55 - 0,07% de tocoferol,
- 0,01% de palmitato de ascorbilo,

siendo los porcentajes unos porcentajes en peso con respecto al peso total de la materia seca de la composición.

60 La composición se obtiene mediante la realización de las etapas siguientes:

65

- dispersar finamente el hialuronato de sodio en la miel,
- calentar la mezcla a menos de 40°C,
- calentar la fase lipófila (cera, manteca) y el glicerol separadamente a aproximadamente 70°C,
- 65 - añadir la fase lipófila al glicerol y cuando esta mezcla alcance aproximadamente 40°C, añadir el tocoferol

acetato, el tocoferol, el palmitato de ascorbilo, y después la mezcla de miel y de hialuronato de sodio,

- mezclar la crema hasta enfriamiento.

5 **4. Ejemplo 4**

La composición del ejemplo 4 es un gel hiperosmótico. Está constituida por:

- 90% de miel de alforfón,
- 10 - 9,8% de glicerol,
- 0,2% de hialuronato de sodio.

siendo los porcentajes unos porcentajes en peso con respecto al peso total de la materia seca de la composición.

15 La composición se obtiene mediante la realización de las etapas siguientes:

- se prepara una solución de hialuronato de sodio al 2% en una mezcla agua/glicerol/etanol (en una relación 10/10/3) y después se deshidrata por destilación al vacío;
- 20 - esta solución de hialuronato de sodio gliceroleada se mezcla después en la miel a temperatura ambiente.

5. Ejemplo 5

La composición del ejemplo 5 es un gel hiperosmótico. Está constituida por:

- 25 - 94,8% de una mezcla de mieles de tomillo, melazo, alforfón y manuka,
- 5% de un colágeno de pescado,
- 0,2% de hialuronato de sodio,

30 siendo los porcentajes unos porcentajes en peso con respecto al peso total de la materia seca de la composición.

La composición se obtiene mediante la mezcla de los tres compuestos.

6. Ejemplo 6

35 La composición del ejemplo 6 es un gel hiperosmótico. Está constituida por:

- 95% de una mezcla de mieles de tomillo, melazo, alforfón y manuka,
- 40 - 5% de una solución de betaglucanos,

siendo los porcentajes unos porcentajes en peso con respecto al peso total de la materia seca de la composición.

La composición se obtiene mediante la mezcla de los dos compuestos.

7. Ejemplo 7

La composición del ejemplo 7 es un gel hiperosmótico. Está constituida por:

- 50 - 94,8% de una mezcla de mieles de tomillo, melazo, alforfón y manuka,
- 5% de una solución de betaglucanos,
- 0,2% de hialuronato de sodio,

siendo los porcentajes unos porcentajes en peso con respecto al peso total de la materia seca de la composición.

55 La composición se obtiene mediante la mezcla de los tres compuestos.

B. Evaluación de la eficacia de la composición según la invención

60 Se han realizado unos ensayos para demostrar la eficacia cicatrizante y antibacteriana de varias composiciones según la invención por un lado y comparar esta eficacia con la del constituyente solo.

1. Evaluación de la actividad antibacteriana de la composición según la invención y comparación con respecto a los ingredientes solos

65 El objetivo de este estudio es evaluar la actividad antibacteriana de la composición según la invención (ejemplos 1, 6 y 7), en comparación con la de la miel sola. Las muestras se ensayaron a 3, 5, 7 y 9% v/v.

El protocolo de realización es el siguiente.

5 La proliferación bacteriana en presencia de los productos a ensayar se determina mediante un método en microplaca de 96 pocillos. Cada pocillo es inoculado con 50 µl de suspensión bacteriana a ensayar realizada en un caldo Muller-Hinton (MH) + 150 µl de solución de producto a ensayar diluido. La concentración bacteriana en el pocillo se fija a 10⁶ CFU/ml. El control positivo (150 µl de suspensión bacteriana + 50 µl de medio MH) corresponde al 100% de proliferación bacteriana. El control negativo (200 µl de medio de cultivo) corresponde al 0% de proliferación bacteriana. Cada muestra se ensaya por triplicado. Las densidades ópticas (DO) se leen una
10 primera vez en tiempo 0 (T0) a 450 nm. Las placas son incubadas a continuación durante 24 h a 37°C bajo agitación. Al final de la incubación, se vuelve a medir la DO a 450 nm (T24). El porcentaje de proliferación se calcula de esta manera:

15
$$\text{Proliferación} = (\text{DO}_{T24} - \text{DO}_{T0}) / (\text{DO}_{T24 \text{ Control +}} - \text{DO}_{T0 \text{ Control +}})$$

Los resultados obtenidos en porcentaje de proliferación bacteriana se presentan en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1: Evaluación de la actividad antibacteriana

	Concentraciones ensayadas (en % v/v)	Porcentaje de proliferación bacteriana (<i>Staphylococcus aureus</i>)
Miel sola	3	32%
	5	25%
	7	19%
	9	15%
Composición ejemplo 1	3	25%
	5	15%
	7	13%
	9	1%
Composición ejemplo 6	3	28%
	5	23%
	7	11%
	9	2%
Composición ejemplo 7	3	27%
	5	20%
	7	13%
	9	6%

20 Se constata que las composiciones según la invención presentan una mejora de la actividad antibacteriana. Además, esta actividad es más importante que la de la miel sola.

25 2. Evaluación de la actividad cicatrizante - proliferación celular del ácido hialurónico

El objetivo de este estudio es evaluar la actividad cicatrizante de una composición según la invención, en comparación con la de la miel sola y con la del ácido hialurónico solo, y verificar la estabilidad de la composición después de la esterificación por radiación gamma.

30 Las muestras ensayadas son las siguientes:

- miel bruta: miel de tomillo,
- ácido hialurónico ensayado solo al 0,5%,

35 - composición constituida por miel bruta de tomillo en la que se ha añadido 0,2% o 0,5% de ácido hialurónico,

- composición constituida por miel bruta de tomillo en la que se ha añadido 0,2% de ácido hialurónico, y tratada por irradiación gamma (30 kGy).

40 Los productos son diluidos para obtener una concentración del 5,12% v/v de la muestra.

El protocolo de realización es el siguiente:

45 Los cultivos primarios de fibroblastos humanos PAF 08052 son inoculados en microplacas de 48 pocillos a razón de 10000 células por pocillo con un volumen de medio de cultivo completo de 500 µl. Las células se adherirán a continuación en el fondo de los pocillos durante 24 horas. El medio se sustituirá después por la composición

según la invención diluida en medio de cultivo privado de suero. La concentración ensayada es 1,3% v/v a razón de 500 µl por pocillo y se incuba durante 48 horas a 37°C + 5% de CO₂. Las células se despegan a continuación con tripsina y después contadas sobre lámina de Malassez con un colorante de exclusión (azul tripano). Los resultados se indican en número de células por pocillo.

5 Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2: Evaluación de la actividad cicatrizante

	Número de células por pocillo
Miel sola	13333,3
Ácido hialurónico 0,5%	15833,3
Miel + Ácido hialurónico 0,2%	20833,3
Miel + Ácido hialurónico 0,5%	20000
Miel + Ácido hialurónico 0,2% + irradiación gamma	20000

10 Se constata que la composición según la invención favorece la proliferación de los fibroblastos y por lo tanto la cicatrización y que este efecto ha mejorado claramente en comparación con el de la miel sola o el del ácido hialurónico solo.

15 Además, esta actividad se mantiene incluso después de la esterilización por radiación gamma.

3. Evaluación del efecto sinérgico de una mezcla miel + ácido hialurónico

Estos ensayos tienen como objetivo demostrar el efecto sinérgico de la mezcla según la invención.

20 El porcentaje de proliferación fibroblástica se determina con respecto a un control no tratado con la composición.

a) Ensayo de Berenbaum

25 El ensayo de Berenbaum permite determinar unos efectos aditivos, sinérgicos o antagonistas entre dos productos puestos en mezclas en contacto con células (Berenbaum, 1977). Este ensayo fue desarrollado con el fin de determinar con la ayuda de datos experimentales insertados en una fórmula matemática el impacto de varios compuestos mezclados. Es aplicable a numerosos campos de la biología.

30 Este ensayo se aplica en la presente memoria a la miel y al ácido hialurónico (AH). Para ello, se utilizan unas gamas de AH y de miel para estimular los fibroblastos durante 48 h. La miel y el AH se ponen en el medio de cultivo a unas concentraciones inferiores al máximo de estimulación. Después de 48 h de estimulación, se cuentan las células y se calcula el porcentaje de proliferación.

35 El análisis de los resultados de recuento se realiza en base a una búsqueda de actividad equivalente para cada compuesto. Por ejemplo, la actividad buscada es la proliferación de 150%. La dosis de miel necesaria para obtener 150% de proliferación (en el caso del presente ejemplo) está designado por Aeq para la miel. Beq designa la dosis necesaria para obtener el mismo efecto (150% de proliferación) con el AH. Esta búsqueda de concentraciones equivalentes se realiza gracias a la realización de la gama de miel sola y de la gama de AH solo.

40 En un segundo tiempo, la mezcla de los dos compuestos permite determinar las dosis de cada producto a introducir juntos para obtener el mismo efecto (150% de proliferación) que con Aeq o Beq. Se designa entonces la dosis necesaria de miel como dosis de A y la de AH como dosis de B.

45 A continuación, es posible introducir estos datos en la ecuación siguiente:

$$\frac{\text{Dosis de A}}{\text{Aeq}} + \frac{\text{Dosis de B}}{\text{Beq}}$$

50 Si el resultado de esta ecuación es igual a 1, el efecto de los 2 compuestos será aditivo. Si el resultado es inferior a 1, se podrá hablar de sinergia. Por el contrario, si el resultado es superior a 1 los compuestos son designados como antagonistas.

b) Realización de una gama de ácido hialurónico (AH)

Duración del tratamiento = 48 h
Células ensayadas = fibroblastos

5

Las concentraciones ensayadas corresponden a las concentraciones en ácido hialurónico encontradas en los pocillos de cultivo una vez diluidos los productos de los ejemplos. Estas diluciones son necesarias para la realización de este ensayo.

Tabla 3

Cantidad de ácido hialurónico (%)	0%	0,00023%	0,00047%	0,00094%	0,0018%	0,0037%	0,0075%	0,015%
Porcentaje de proliferación (%)	100%	100%	109%	127%	182%	182%	182%	190%

c) Realización de una gama de miel de tomillo

5 Duración del tratamiento = 48 h
Células ensayadas = fibroblastos

Tabla 4

Cantidad de miel (%)	0%	0,3%	0,6%	1,28%	2,56%
Porcentaje de proliferación (%)	100%	138%	145%	154%	163%

10 d) Realización de mezclas miel de tomillo + AH

Duración del tratamiento = 48 h
Células ensayadas = fibroblastos

15 Tabla 5: Balance de los resultados obtenidos y cálculo de las concentraciones a utilizar en la composición - balance de las concentraciones que tienen efectos sinérgicos

Porcentajes de composición ensayados	Cantidad de AH calculada en la composición con una cantidad de miel del orden de 100%	Miel (aproximadamente 100%) (% de proliferación)	Ácido hialurónico (% de proliferación)	Miel + Ácido hialurónico (% de proliferación)	Índice de Berenbaum
Ensayado al 0,6%	0,05%	145,5%	100%	173%	0,36
Ensayado al 0,30%	0,1%	138,2%	100%	167%	0,24
Ensayado al 0,3%	0,2%	138,2%	109%	164%	0,28
Ensayado al 0,6%	0,2%	145,5%	127%	180%	0,75

20 Para cada una de las composiciones que comprenden entre 0,05% y 0,2% de ácido hialurónico, el índice de Berenbaum es inferior a 1. Este resultado indica una sinergia entre la miel y el ácido hialurónico induciendo un aumento de la proliferación de los fibroblastos a estas concentraciones.

e) Resultados sobre la estimulación de la síntesis de colágeno III

25 El colágeno III es uno de los compuestos principales de la matriz extracelular. El colágeno asegura la estructura fibrilar de la matriz extracelular permitiendo el mantenimiento mecánico del tejido celular.

30 Tabla 6: balance de los resultados obtenidos sobre la dosificación del colágeno III (por dosificación de tipo ELISA) en los sobrenadantes de cultivo de fibroblastos que han sido tratados con las diferentes fórmulas durante 48 h. Los resultados están expresados en cantidad relativa con respecto al control no tratado

Cantidad relativa de colágeno III dosificada en el control no tratado	Cantidad relativa de colágeno III dosificada en el sobrenadante de cultivo tratado con la miel sola	Cantidad relativa de colágeno III dosificada en el sobrenadante de cultivo tratado con la miel + HA
100%	106%	125%

35 Los efectos observados con la miel y el ácido hialurónico sobre la producción de colágeno III son superiores a los efectos inducidos por la miel sola. Un efecto beneficioso de esta composición se observa sobre la producción de colágeno III por los fibroblastos.

4. Evaluación del efecto sinérgico de una mezcla miel + colágeno

a. Proliferación fibroblástica

40 Tipo de colágeno ensayado = colágeno bovino (dosis utilizada en la composición 5%)
Concentración en composición ensayada = 1,28% v/v
Duración del tratamiento = 48 h
Células ensayadas = fibroblastos

45

Tabla 7

Muestras	Miel	Colágeno	Colágeno + miel
Porcentaje de proliferación fibroblastos (%)	188%	172%	261%

Se observa un efecto sinérgico de la miel y del colágeno sobre la proliferación de los fibroblastos.

5

b. Principio de los ensayos de proliferación sobre queratinocitos

Los productos son diluidos para obtener una concentración de 0,1% v/v de la muestra.

10 El protocolo de realización es el siguiente:

Se inocula una línea celular de queratinocitos en unas microplacas de 48 pocillos a razón de 20000 células por pocillo con un volumen de medio de cultivo completo (10% de suero) de 500 µl. Las células se adherirán a continuación en el fondo de los pocillos durante 24 horas. El medio será sustituido a continuación por el producto a ensayar diluido al 0,1% en medio de cultivo que contiene 2,5% de suero. El producto se ensaya a razón de 500 µl por pocillo y se incuba durante 24 horas a 37°C + 5% CO₂. Las células se despegan a continuación con tripsina y después se contabilizan sobre lámina de Malassez con un colorante de exclusión (azul tripano). El porcentaje de proliferación queratinocitaria se determina con respecto a un control no tratado con las muestras.

15

20 c. Proliferación queratinocitos

Tipo de colágeno ensayado = péptido de colágeno, dosis utilizada en la composición 1,5%

Concentración en composición ensayada = 0,1% v/v

Duración del tratamiento = 24 h

25 Células ensayadas = queratinocitos

Tabla 8

Muestras	Miel	Colágeno	Colágeno + miel
Porcentaje de proliferación queratinocitos (%)	143%	129%	186%

30 Se observa un efecto sinérgico de la asociación miel y colágeno sobre la proliferación queratinocitaria.

5. Evaluación del efecto sinérgico de una mezcla miel + betaglucano

a) Proliferación queratinocitos

35

Concentración en composición ensayada = 0,1% v/v

Duración del tratamiento = 24 h

Células ensayadas = queratinocitos

40 Tabla 9

Muestras	Miel	Betaglucanos	Miel + Betaglucanos
Porcentaje de proliferación queratinocitos (%)	131%	162%	193%

Se observa un efecto beneficioso de la asociación miel y betaglucanos sobre la proliferación de los queratinocitos.

45

b) Resultados sobre la estimulación de la síntesis de colágeno III

El colágeno III es uno de los compuestos mayoritarios de la matriz celular. El colágeno asegura la estructura fibrilar de la matriz extracelular que permite el mantenimiento mecánico del tejido celular.

50

Tabla 10: Balance de los resultados obtenidos sobre la dosificación del colágeno III (por dosificación de tipo ELISA) en los sobrenadantes de cultivo de fibroblastos que han sido tratados con las diferentes fórmulas durante 48 h. Los resultados están expresados en cantidad relativa con respecto al control no tratado.

Cantidad relativa de colágeno III dosificado en los sobrenadantes de cultivo tratados con			
Control no tratado	Miel sola	Betaglucanos	Miel + Betaglucanos
100%	106%	88%	119%

55

La cantidad de colágeno III producida por los fibroblastos es claramente más importante que la obtenida con la

miel sola o los betaglucanos solos. Este resultado indica que la miel en mezcla con los betaglucanos tiene un efecto sinérgico sobre la producción de colágeno III por los fibroblastos.

6. Evaluación del efecto sinérgico de una mezcla miel + ácido hialurónico + betaglucano

5

Concentración en muestra ensayada = 1,28% v/v
 Duración del tratamiento = 48 h
 Células ensayadas = fibroblastos

10 Tabla 11

Muestras	Miel	Ácido hialurónico	Betaglucanos	Miel + Betaglucanos	Miel + ácido hialurónico + Betaglucanos
Porcentaje de proliferación fibroblastos (%)	154	182	222	189	239

La asociación miel + ácido hialurónico + betaglucanos induce un aumento de la proliferación de los fibroblastos con respecto a los compuestos solos.

15

REIVINDICACIONES

1. Composición en forma líquida o semilíquida que comprende:
- 5 - entre 5% y 99,8% de miel, y
- por lo menos un constituyente de la matriz extracelular seleccionado de entre el colágeno, la elastina y los glicosaminoglicanos entre los cuales ácido hialurónico que, si está comprendido en la composición, está presente a razón de entre 0,05 y 10%, y/o por lo menos un betaglucono,
- 10 estando los porcentajes dados en peso con respecto al peso de materia seca de la composición,
- para su utilización como producto de salud cicatrizante y/o antibacteriano de aplicación tópica,
- 15 2. Composición para su utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que dicho por lo menos un constituyente de la matriz extracelular es el ácido hialurónico.
3. Composición para su utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que dicho por lo menos un constituyente de la matriz extracelular es un glicosaminoglicano seleccionado de entre heparanos sulfatos, queratanos sulfatos y condroitinas sulfatos.
- 20 4. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la miel es una miel de origen natural.
- 25 5. Composición para su utilización según la reivindicación 4, caracterizada por que la miel es miel de tomillo y/o de melazo y/o de alforfón y/o de manuka y/o sus mezclas.
6. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que la miel es miel artificial.
- 30 7. Composición para su utilización según la reivindicación 6, caracterizada por que la miel artificial está constituida mayoritariamente por glucosa y/o fructosa y/o sacarosa.
8. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que se presenta en forma de gel, pomada, espray, crema, emulsión u óvulo.
- 35 9. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que ha sido tratada por irradiación gamma.
- 40 10. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, para su utilización como dispositivo médico destinado al tratamiento de heridas.
11. Composición para su utilización según la reivindicación anterior, para su aplicación como dispositivo médico destinado al tratamiento de quemaduras de primer y segundo grado, al tratamiento y/o a la prevención de las desuniones posoperatorias de cicatriz, al tratamiento y/o a la prevención posoperatoria de las cavidades residuales de los sinus pilonidales, al tratamiento de cicatrices quirúrgicas infectadas después del aplanamiento, al tratamiento de úlceras y escaras, al tratamiento de heridas traumáticas, al tratamiento de heridas agudas y crónicas, al tratamiento de heridas cancerológicas, al tratamiento de sitios de estomías, al tratamiento de dermoabrasiones, y/o al tratamiento de heridas superficiales.
- 45 12. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, para su utilización como composición para el tratamiento de la dermatitis, del acné, de los eritemas de las nalgas, del impétigo, de furúnculos, de panadizo o de micosis, como gel bucal destinado a tratar las aftas y las mucositis, barra o bálsamo de labios destinado a tratar las grietas, crema para las manos y los pies destinada en particular a la reparación o al tratamiento de las fisuras y los sabañones, bálsamo destinado a la prevención y/o al tratamiento de las fisuras del pezón, gel vaginal o supositorio o crema rectal.
- 50 13. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende entre 0,05 y 1% de ácido hialurónico en peso de materia seca.
- 55 14. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende ácido hialurónico de peso molecular superior a 100000 Da.
- 60 15. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende ácido hialurónico y por lo menos un betaglucono.
- 65

16. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende unos betaglucanos constituidos por unidades glucosa unidas por unos enlaces $\beta(1,3)$ y/o $\beta(1,4)$ y/o $\beta(1,6)$.
- 5 17. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende entre 0,01% y 5% de betaglucanos en peso de materia seca.
18. Composición para su utilización según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende entre 0,001% y 50% de colágeno en peso de materia seca.