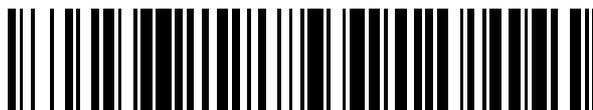


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 951**

51 Int. Cl.:

A61K 35/742 (2015.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2017** **E 17156432 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018** **EP 3210612**

54 Título: **Preparación simbiótica**

30 Prioridad:

26.02.2016 BE 201605140

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

08.05.2019

73 Titular/es:

**CHRISAL NV (100.0%)
Priester Daensstraat 9
3920 Lommel, BE**

72 Inventor/es:

**TEMMERMAN, ROBIN y
GIELEN, CORRIE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 711 951 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

Preparación simbiótica

Campo de la invención

5 La invención se refiere a composiciones que contienen prebióticos y probióticos para la aplicación en la piel o en tejidos intactos o dañados.

Introducción

10 Recientes revisiones de la bibliografía científica [Baquerizo *et al.* (2014) *J. Am. Acad Dermatol.* 71(4): 814-21; Sonal Sekhar *et al.* (2014) *Med. Hypotheses* 82(1): 86-8; Sikorska *et al.* (2013) *Med. Hypotheses* 82(1): 86-8] indican que el empleo de probióticos y prebióticos puede tener efectos favorables en el tratamiento de trastornos cutáneos o infecciones de heridas. Sin embargo, hasta la fecha no ha habido estudios en la bibliografía científica en el uso tópico de probióticos o prebióticos en seres humanos. El limitado número de estudios disponible ha empleado modelos *in vitro* o modelos de ratón, y a menudo han empleado lisados de células libres de cultivos probióticos. A partir de la bibliografía científica se sabe [Gungor *et al.* (2015) *Benef. Microbes* 6(5): 647-56] que la aplicación de bacterias no patógenas en la boca y sobre prótesis pueden causar una reducción de infecciones, caries, halitosis, y otros problemas orales.

15 La bibliografía científica sobre el uso de probióticos y prebióticos para tratar afecciones cutáneas o infecciones de heridas afecta principalmente a la ingestión oral de preparaciones de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que tienen un posible efecto de fortalecimiento de la estimulación de la vía interna cutánea del sistema inmunológico.

20 Por lo tanto, en base a la bibliografía científica no ha sido posible producir composiciones probióticas o prebióticas de aplicación por vía tópica que tengan una acción probada sobre afecciones cutáneas e infecciones de heridas.

25 Las patentes enseñan que los probióticos se pueden usar para combatir bacterias dañinas, y que la administración oral o tópica de probióticos o extractos celulares de los mismos pueden tener un efecto favorable en algunas afecciones cutáneas. La Patente WO 2006125283 enseña que la colonización de superficies con bacterias formadoras de esporas no patógenas a través de productos de limpieza tiene un efecto favorable en la reducción del número de microorganismos patógenos sobre tales superficies. Esto disminuye el riesgo de infecciones y tiene un efecto beneficioso sobre la salud en general. Las Patentes WO 2012150269 y WO 2013153358 describen el empleo de un probiótico, metabolito o lisado celular para el tratamiento tópico de infecciones cutáneas, pero está limitado a bacterias del ácido láctico y a extractos de las mismas. La Patente EP 0975227 describe el uso de esporas o de extractos celulares de *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus laterosporus* o *Bacillus laevolacticus* en combinación con fructo-oligosacáridos para combatir infecciones cutáneas, pero éstas se limitan a estos organismos específicos y a cadenas de azúcar cortas. La patente WO2011022790 divulga una mezcla de bacterias de *Bacillus* que se aplican sobre la piel humana o el pelo animal para repeler mosquitos. Otras patentes, tales como la US 20090035294, están limitadas al uso específico de componentes de paredes celulares específicos de bacterias para la aplicación en la piel. En estos casos, no se emplean microorganismos vivos o esporas de los mismos.

35 Compendio de la invención

La invención se refiere a una composición que contiene prebióticos y probióticos para la aplicación sobre la piel o un tejido intacto o dañado.

40 Un primer aspecto de la invención se refiere a una composición para uso dermatológico o cosmético que comprende una mezcla de esporas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus amyloliquefaciens* con un azúcar prebiótico.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una combinación de una mezcla de esporas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus amyloliquefaciens* con un azúcar prebiótico para usar en la prevención o el tratamiento de infecciones de la piel o un tejido sano o dañado.

45 En realizaciones particulares de la composición o el uso de la combinación, se encapsula en microcápsulas una parte de las esporas bacterianas anteriormente mencionadas y/o se encapsula una parte del azúcar anteriormente mencionado.

En realizaciones particulares de la composición o el uso de la combinación, el azúcar prebiótico es inulina.

En realizaciones particulares de la composición o el uso de la combinación, la mezcla de esporas bacterianas anteriormente mencionada se presenta en una concentración de 1×10^6 a 1×10^9 ufc por gramo de la formulación.

50 En realizaciones particulares de la composición o el uso de la combinación, el azúcar prebiótico anteriormente mencionado se presenta en una concentración de 100 mg a 100 g por kg de la formulación.

En realizaciones particulares de la composición o el uso de la combinación, las microcápsulas comprenden una

cubierta frágil rellena de una disolución no acuosa y esporas bacterianas, y pueden, por ejemplo, tener un diámetro de 1 a 300 µm.

La preparación simbiótica de la invención es adecuada tanto para uso humano como para uso veterinario.

5 Dependiendo del tipo de tratamiento y de la parte del cuerpo en cuestión, la composición se puede formular como un líquido, emulsión, crema, pomada, loción, gel, aceite, disolución, pulverizador en aerosol, polvo, o una formulación semi-sólida.

Descripción detallada de la invención

10 La invención describe un método para el tratamiento tópico de un tejido y piel humana y animal con una mezcla específica de esporas de *Bacillus* y un prebiótico en la forma de una preparación, concentrada opcionalmente en microcápsulas para determinadas aplicaciones.

La preparación se caracteriza por la presencia de esporas de *Bacillus* libre, prebióticos, y opcionalmente microcápsulas de liberación lenta (según la Patente US 20120076864), y también se pueden incluir esporas de *Bacillus* y prebióticos. Esta preparación puede ser un líquido.

Un simbiótico en el contexto de la presente invención se refiere a una combinación de un probiótico y un prebiótico.

15 Un probiótico en el contexto de la invención se refiere a esporas de especies de *Bacillus* o a una mezcla de esporas de diferentes spp de *Bacillus*., normalmente una mezcla de esporas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus amyloliquefaciens*.

En realizaciones específicas, esta mezcla se compone solamente de esporas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus amyloliquefaciens*.

20 En otras realizaciones, pueden estar presentes otras spp. de *Bacillus*. En una realización específica, dicha otra spp. de *Bacillus*, no es *Bacillus coagulans*.

25 Una mezcla de los cuatro tipos de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus amyloliquefaciens* normalmente contiene aproximadamente cantidades iguales de cada uno de los cuatro tipos (del 20 al 30%, con un total del 100% para los cuatro tipos). En algunas realizaciones, esto puede diferir, con al menos el 10% de cada uno de los cuatro tipos o puede presentarse también del 20 al 30% de los mismos, con un total del 100% para los cuatro tipos.

30 Las esporas deberían distribuirse proporcionalmente en una concentración de 1×10^6 a 1×10^9 por gramo de la preparación. En la germinación, estas esporas producen un número de enzimas [Boland *et al.* (2000) *Microbiology* 146: 57-64] que ejercen actividad antimicrobiana en determinados componentes de la pared celular o de microorganismos dañinos sobre la piel o una herida. La transformación de las esporas a células vegetativas da como resultado una absorción de humedad desde los tejidos circundantes al que se aplica esta preparación [Knudsen *et al.* (2015) *J. Bacteriol.* 19;198(1): 168-77]. Esta absorción de humedad disminuye el contenido de la humedad absoluta del tejido, ejerciendo, por tanto, una acción inhibitoria sobre otros microorganismos, particularmente hongos. Las células vegetativas de *Bacillus* producen una variedad de enzimas extracelulares sobre y en el tejido o herida [Priest (1977) *Bacteriol. Rev.* 41(3): 711-53]. Esta reducción ejerce una acción inhibitoria sobre otros microorganismos a través del agotamiento de nutrientes y el concepto general de exclusión competitiva [Ragione *et al.* (2003) *Vet. Microbiol.* 94(3): 245-56]. Además, las distintas células de *Bacillus* producen un número de compuestos extracelulares que ejercen una acción inhibitoria a través de la percepción de cuórum o autoinducción (en inglés, quorum sensing) y del quorum quenching [Boguslawski *et al.* (2015) *Mol. Microbiol.* 96(2): 325-48] sobre otros muchos microorganismos (potencialmente dañinos) en la piel y en el tejido o herida. Las células vegetativas de *Bacillus* producen bacteriocinas [Abriouel *et al.* (2010) *FEMS Microbiol Rev.* 35(1): 201-32], que tienen una acción inhibitoria sobre otros microorganismos de la piel o en el tejido o la herida. La invención emplea *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus amyloliquefaciens* ya que la combinación de los mismos produce la más amplia variedad posible de bacteriocinas, más específicamente 1,1, 1,2 y 1,3 subclases de *Bacillus subtilis*, 1,3 subclases y 2,3 para *Bacillus licheniformis*, 1,4 subclases para *Bacillus amyloliquefaciens* y 3 clases para *Bacillus megaterium*. Por otra parte, la variedad de diferentes especies de *Bacillus* en la preparación proporciona la máxima distribución a lo largo del tiempo (diferencia en la velocidad de germinación) y la máxima diversidad de enzimas extracelulares y de otros compuestos producidos (tales como bacteriocinas y moléculas y receptores quorum sensing).

50 Prebiótico en el contexto de la presente invención se refiere a un azúcar de cadena corta (normalmente de 3-9 unidades de monosacáridos), y más específicamente a uno o más galacto-oligosacáridos y/o fructo-oligosacáridos, tales como inulina. Estos azúcares prebióticos tienen un efecto doble. Por un lado, sirven como iniciadores para las bacterias probióticas presentes en la preparación para que éstas germinen más rápidamente y sobrevivan más tiempo tomando los azúcares prebióticos. Por otro lado, los azúcares prebióticos proporcionan en la piel o en el tejido la estimulación de bacterias beneficiosas ya presentes, tales como bacterias del ácido láctico [Al-Ghazzewi *et al.* (2014) *Benef. Microbes.* 5(2): 99-107].

Microcápsulas en el contexto de la invención son partículas que contienen un prebiótico y/o un probiótico. Las cápsulas per sé se describen en la Patente US 20120076864, y se pueden añadir opcionalmente en la preparación para proporcionar una estabilidad/vida útil a más largo plazo, y para retrasar la liberación de los probióticos y prebióticos en la piel o en el tejido o en la herida después de que los probióticos y los prebióticos libres de la preparación hayan ejercido ya su efecto. Estos resultados en la persistencia de la actividad de la preparación durante hasta 6 semanas, proporciona que se presente la fricción suficiente. Si la preparación se aplica sobre la piel, un tejido, o una herida que se cubre después con un molde de escayola sólida, la presencia de las microcápsulas asegura de una manera establecida que la preparación ejerza una acción más prolongada. En casos donde no sea posible el tratamiento frecuente de la piel, tejido, o herida, es ventajoso incluir las microcápsulas en la preparación. Las microcápsulas normalmente se componen de una cubierta frágil que comprende un líquido que contiene las esporas. La capa externa de esta cubierta puede contener grupos reactivos funcionales para la unión química, por ejemplo, a celulosa u a otros componentes de apósitos, y similares. El líquido en las cápsulas es normalmente no acuoso, y más específicamente, es inmiscible con agua (por ejemplo, un aceite orgánico, un aceite de silicona, un fluorocarbono, o mezclas de los mismos). Por ejemplo, la cubierta se compone de una capa polimérica, tal como un polímero de gelatina, poliuretano, poliolefinas, poliésteres, polisacáridos, resinas de silicona, resinas epoxi, quitosán y resinas aminoplásticas, tal como una resina de melanina formaldehído. Las microcápsulas son normalmente de 1 a 300 μm de diámetro. La proporción de peso de la cubierta con el líquido contenido en la misma es normalmente de 1:500 a 1:5000.

La invención describe métodos para el tratamiento de la piel, tejido y heridas de seres humanos y de animales con una composición que comprende bacterias formadoras de esporas no patogénicas y azúcares prebióticos, opcionalmente con microcápsulas adicionales (que contienen estas bacterias formadoras de esporas no patógenas y/o azúcares prebióticos).

Esta composición se puede formular, por ejemplo, como un líquido, emulsión, crema, pomada, loción, gel, aceite, disolución, pulverizador en aerosol, polvo, o una formulación semi-sólida. Ejemplos de bacterias formadoras de esporas no patógenas incluyen *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus amyloliquefaciens* y opcionalmente *Bacillus polymyxa*.

En realizaciones típicas, la concentración de estas bacterias formadoras de esporas no patógenas en la preparación es de 1×10^8 a 1×10^{10} esporas por gramo de la preparación, expresado como ufc (unidades formadoras de colonias). Este valor se refiere al número total de ufc de las 4 especies anteriores juntas (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. amyloliquefaciens*).

En realizaciones típicas, los azúcares prebióticos son compuestos azucarados pertenecientes al grupo de los oligosacáridos, tal como los fructo-oligosacáridos y los galacto-oligosacáridos.

En realizaciones típicas, la concentración de los azúcares prebióticos en la formulación es de 0,5 mg a 100 g por kg de la preparación.

Las microcápsulas comprenden normalmente una cubierta polimérica que se abre debido a la fricción y libera los contenidos de la cápsula, y normalmente se contienen en concentraciones de 100 mg a 100 g por kg de la preparación.

Las bacterias y los azúcares prebióticos se pueden presentar juntos o separados en una microcápsula. Las microcápsulas se pueden proporcionar también para que contengan cepas de bacterias individuales.

En la formulación, hasta el 10%, 20%, 30%, 50%, ó 75% de los prebióticos y/o probióticos se pueden encapsular en las microcápsulas.

Las microcápsulas se pueden dispersar en una composición líquida o viscosa. Se proporcionan también formulaciones en las que las cápsulas se unen a un vehículo (un parche, vendaje, tirta o similar).

El tratamiento puede consistir del lavado, pulverización, o aplicación, sobre la piel, tejidos o heridas de seres humanos o animales.

El tratamiento se emplea para retrasar o prevenir el crecimiento sobre la piel, un tejido, o en heridas, de bacterias, virus, levaduras, hongos, o virus, y pueden, por lo tanto, aplicarse para prevenir o combatir infecciones microbianas de la piel, tejidos, o heridas en seres humanos o animales.

Las bacterias formadoras de esporas no patógenas pueden ejercer una acción inhibitoria sobre otros microorganismos antes, durante y después de la germinación, por ejemplo, mediante la reducción de la humedad, agotamiento de compuestos orgánicos y producción de bacteriocinas o moléculas señal del quorum sensing.

La invención se puede aplicar sobre la piel sana para prevenir y combatir la colonización y la posible infección de bacterias y otros microorganismos patógenos (tal como el acné).

La invención se puede aplicar también para heridas, que incluyen tanto heridas desinfectadas para prevenir

infecciones y heridas infectadas para combatir infecciones o inhibir el crecimiento de bacterias y otros microorganismos patógenos.

5 Los azúcares prebióticos pueden tener también una acción estimulante sobre el crecimiento y la actividad de microorganismos no patógenos ya presentes en la piel, tal como Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria y Bacteroidetes, así como hongos.

Ejemplos

Ejemplo 1. Composición de una preparación

Un ejemplo de una preparación de la invención contiene las siguientes cantidades por gramo:

- 10
- 1 x 10⁹ esporas de cada una de las siguientes especies: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus amyloliquefaciens*.
 - 10 mg de inulina
 - 5 mg de galacto-oligosacáridos
 - 10 mg de microcápsulas

Ejemplo 2. Formulación de una pomada cutánea basada en la preparación

Agua	89,050%
Glicerol	4,000%
Triglicérido caprílico/cáprico	4,000%
Poliacrilato sódico, etilhexil estearato, Trideceth-6	1,000%
Cultivo bacteriano, no patógeno	1,000%
Fenoxietanol	0,450%
Inulina	0,100%
Galacto-oligosacárido	0,050%
Etilhexil glicerol	0,050%
Fragancia	0,300%
[todas las concentraciones indican porcentaje en peso]	

15 La formulación anterior se ha aplicado sobre la piel sana de 20 voluntarios por grupo durante 24 horas. Ninguno de ellos mostró signos de irritación (presencia de edema o de eritema en la piel).

20 La formulación se aplica para varios tipos de piel, tejidos, o heridas intactos y dañados. La morfología de la piel, del tejido, o de la herida se evalúa visualmente a intervalos regulares, y la formulación aplicada se examina para el crecimiento de *Bacillus* spp. de la formulación y la presencia de bacterias patógenas. Esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, por medios clásicos de caracterización y crecimiento de bacterias, o mediante amplificación por PCR con cebadores específicos seguido de la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE, de sus siglas en inglés).

REIVINDICACIONES

1. Composición para uso dermatológico o cosmético, que comprende una mezcla de esporas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus amyloliquefaciens* con un azúcar prebiótico.
2. Combinación de:
 - 5 -una mezcla de esporas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus amyloliquefaciens* con
 - un azúcar prebióticopara usar en la prevención o el tratamiento de infecciones de la piel o un tejido sano o dañado.
- 10 3. La composición según la reivindicación 1, o combinación para usar en la prevención y el tratamiento de la piel o un tejido intacto o dañado según la reivindicación 2, en donde una porción de las esporas bacterianas anteriormente mencionadas y una porción del azúcar anteriormente mencionado se encapsulan en microcápsulas.
4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, o combinación para usar en la prevención y el tratamiento de la piel o un tejido intacto o dañado según las reivindicaciones 2 ó 3, en donde el azúcar prebiótico es inulina.
- 15 5. La composición según las reivindicaciones 1, 3, ó 4, o combinación para usar en la prevención y el tratamiento de la piel o un tejido intacto dañado según las reivindicaciones de la 2 a la 4, en una formulación en donde la mezcla anteriormente mencionada de esporas bacterianas se presenta en una concentración de 1×10^6 a 1×10^9 ufc por gramo de la formulación.
- 20 6. La composición según las reivindicaciones de la 1 ó 3 a la 5, o combinación para usar en la prevención y el tratamiento de la piel o un tejido intacto o dañado según las reivindicaciones de la 2 a la 5, en una formulación en donde el azúcar prebiótico anteriormente mencionado se presenta en una concentración de 100 mg a 100 g por kg de la formulación.
- 25 7. La composición según las reivindicaciones de la 3 a la 6, o combinación para usar en la prevención y el tratamiento de la piel o un tejido intacto o dañado según las reivindicaciones de la 3 a la 6, en donde la microcápsula comprende una cubierta frágil rellena con una disolución no acuosa y esporas bacterianas.
8. La composición según la reivindicación 7, o combinación para usar en la prevención y el tratamiento de la piel o un tejido intacto o dañado según la reivindicación 7, en donde el diámetro de las microcápsulas es de 1 a 300 μm .
9. Combinación para usar en la prevención y el tratamiento de la piel o un tejido intacto o dañado según cualquiera de las reivindicaciones de la 2 a la 8 para uso veterinario.
- 30 10. La composición según una de las reivindicaciones 1 ó 3 a la 9, o combinación para usar en la prevención y el tratamiento de la piel o un tejido intacto o dañado según las reivindicaciones de la 2 a la 9, formulada como un líquido, emulsión, crema, pomada, loción, gel, aceite, disolución, pulverizador en aerosol, polvo, o una formulación semi-sólida.