(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
9 de enero de 2014 (09.01.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/006253 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 38/47 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01) *A61P 17/10* (2006.01)
C12N 9/36 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2013/070461

(22) Fecha de presentación internacional:
3 de julio de 2013 (03.07.2013)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201231060 5 de julio de 2012 (05.07.2012) ES

(71) Solicitante: **UNIVERSIDAD DE GRANADA** [ES/ES]; Hospital Real., Avda Hospicio S/N, E-18071 Granada (ES).

(72) Inventores: **MAQUEDA ABREU, Mercedes**; OTRI - Universidad de Granada, Complejo Administrativo Triunfo, Avda. Hospicio s/n, E-18071 Granada (ES). **MARTÍNEZ BUENO, Manuel**; OTRI - Universidad de Granada, Complejo Administrativo Triunfo, Avda. Hospicio s/n, E-18071 Granada (ES). **VALDIVIA MARTÍNEZ, Eva**; OTRI - Universidad de Granada, Complejo Administrativo Triunfo, Avda. Hospicio s/n, E-18071 Granada (ES). **ANANOU JALED, Samir**; OTRI - Universidad de Granada, Complejo Administrativo Triunfo, Avda. Hospicio s/n, E-18071 Granada (ES). **CEBRIÁN CASTILLO, Rubén**; OTRI - Universidad de Granada, Complejo Administrativo Triunfo, Avda. Hospicio s/n, E-18071 Granada (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

— *con información relativa a la incorporación por referencia de partes y/o elementos ausentes (Regla 20.6)*

(54) **Title**: COMPOSITION FOR TREATING BACTERIAL INFECTIONS OF THE SKIN AND MUCOUS MEMBRANES

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

(57) **Abstract**: The invention relates to a composition for the treatment and prophylaxis of bacterial infections of the skin, containing bacteriocin AS-48 combined with lysozyme. More concretely, the invention relates to compositions containing active substances dissolved in extracts suitable for applications targeting *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*, in a stabilised form in a pharmaceutically acceptable formulation.

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

WO 2014/006253 A1

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

SECTOR DE LA TÉCNICA

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

ESTADO DE LA TÉCNICA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

OBJETO DE LA INVENCIÓN

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

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

De acuerdo con ensayos de actividad in vitro de los principios activos objeto de esta invención, disueltos en gel neutro o en soluciones acuosas, o bien emulsionados en una crema a base de glicerina, el vehículo más apropiado para la actividad es la crema, seguida del gel neutro y la solución acuosa, ambos por igual.

Estas composiciones permiten el control de bacterias, especialmente de las especies de *Staphylococcus* involucradas en infecciones y superinfecciones de la piel, así como de *P. acnés,* responsable de las lesiones inflamatorias (*acne vulgaris*), que en muchas ocasiones carecen del tratamiento antibiótico adecuado por haberse desarrollado resistencias.

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

La invención propuesta presenta las siguientes ventajas:

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

- Se ha confirmado que AS-48 es débilmente inmunogénica cuando se administra intramuscularmente a animales de experimentación, ya que la obtención de sueros inmunes requirió la administración repetida de AS-48 junto al coadyuvante de Freund (Maqueda et al., 1993. Neutralizing Antibodies against the Peptide Antibiotic AS-48". Antimicrobial Agent and Chemotherapy, 1993. 37, 148-15).
- Se ha seleccionado AS-48 como agente antibacteriano para infecciones de la piel por sus características bioquímicas y estructurales. El carácter anfipático de AS-48 y su particular mecanismo de acción favorecido por las diferentes conformaciones que AS-48 adopta en función del ambiente en el que se encuentra, facilita su acceso a las diferentes capas de la piel donde se encuentran los estafilococos y también a los folículos sebáceos obstruidos por el exceso de sebo, donde se encuentra *P. acnes*.
- Debido a las características estructurales que AS-48 presenta, su actividad antibacteriana y estabilidad es muy superior a la de la mayoría de las bacteriocinas descritas frente a los patógenos propuestos, incluida L50A/B que ha sido registrada como Lactopadt™ Acne.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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

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

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

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

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

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

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

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

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

Las composiciones de la presente invención, cuya débil inmunogenicidad y escasa toxicidad ha sido confirmada (Maqueda, M. et al. "Neutralizing Antibodies against the Peptide Antibiotic AS-48". Antimicrobial Agent and Chemotherapy, 1993. 37, 148-15) están formuladas preferentemente para aplicaciones tópicas. Las composiciones contienen los principios activos y reúnen las propiedades físico-químicas más

convenientes para su aplicación tópica, considerando las características de las infecciones a tratar.

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

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

MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

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

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

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

Formulaciones/composiciones desarrolladas

Composición frente a *S. aureus*

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

Composición frente a *P. acnes*

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

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

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

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

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

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

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

Lisozima 4 mg/ml + AS-48 0,1 µm/ml	4,30	3,23	2,41	1,20	0	0	0

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

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

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

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

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

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

- Como puede observarse en la figura 3, 10 µg/ml de AS-48 no son capaces de eliminar a la bacteria, mientras que la adición de lisozima (8 mg/ml) a la misma concentración de AS-48, consigue su total eliminación en 14 h, confirmando así el efecto sinérgico entre ambos compuestos activos, en condiciones de laboratorio.
- Estos resultados ponen además de manifiesto que *S. aureus* es menos sensible que *P. acnes* a esta bacteriocina.

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

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

REIVINDICACIONES

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

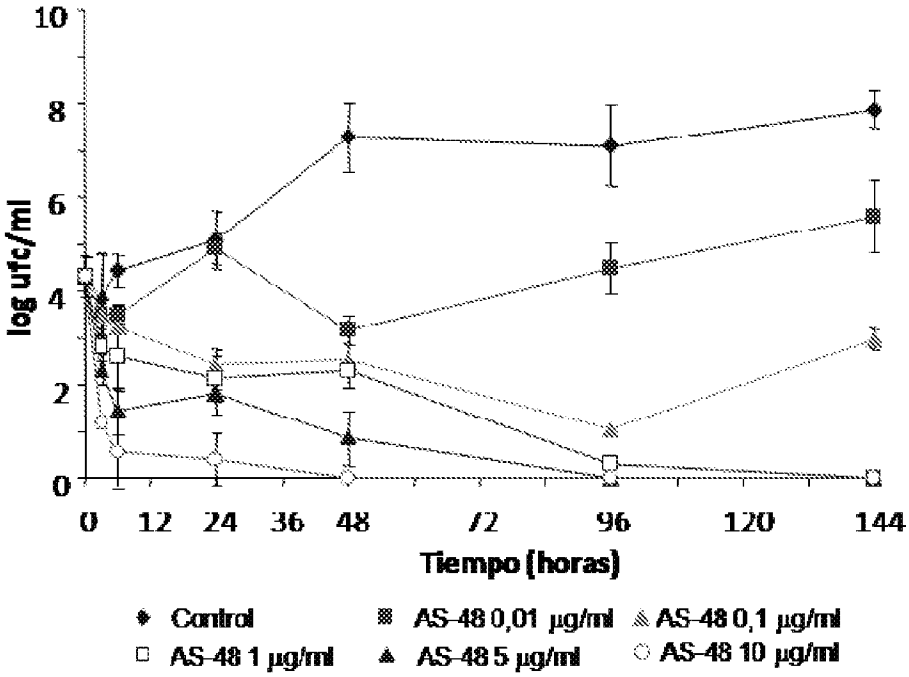


Figura 1

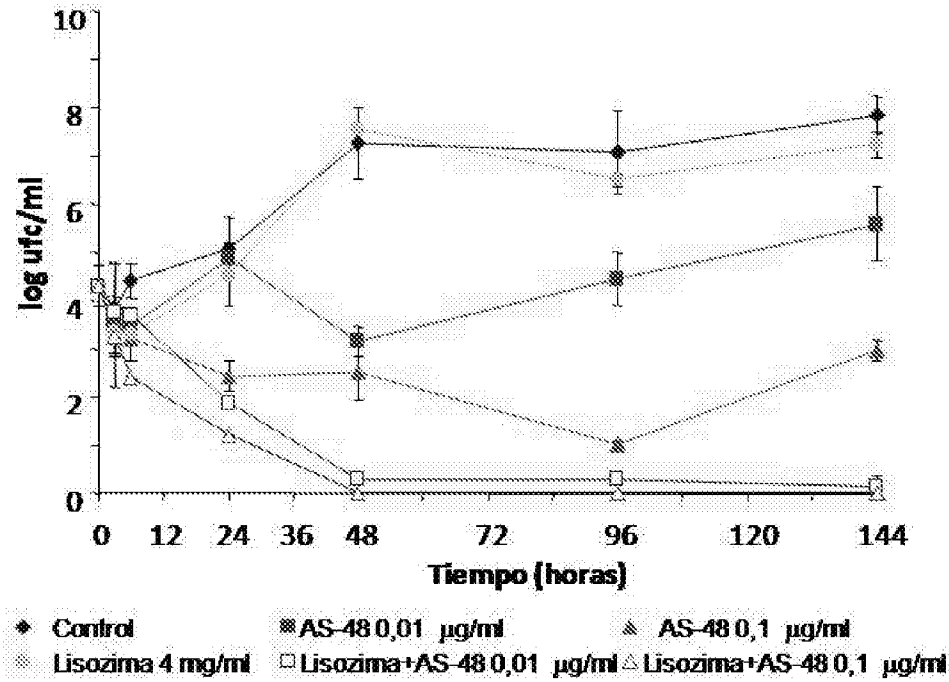


Figura 2

INCORPORADO POR REFERENCIA (Regla 20.6)

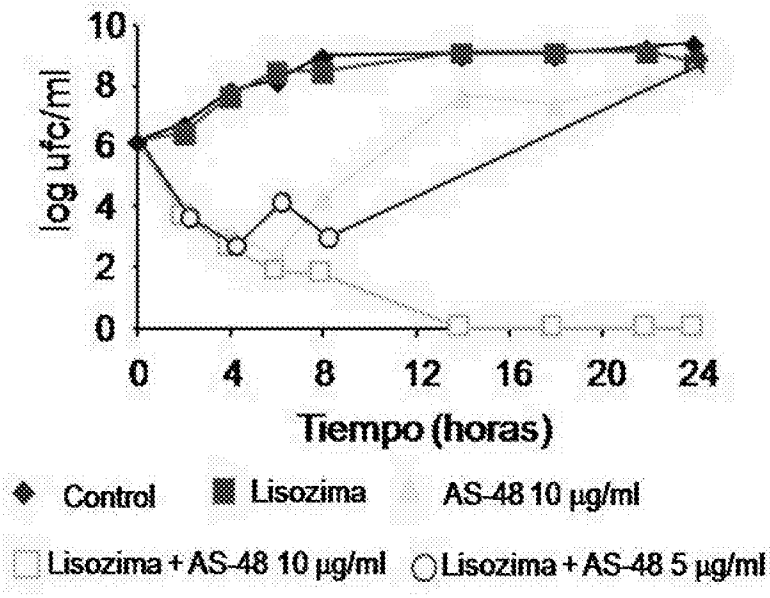

log ufc/ml
10
8
6
4
2
0
0
4
8
12
16
20
24
Tiempo (horas)
Control
Lisozima
AS-48 10 µg/ml
Lisozima + AS-48 10 µg/ml
Lisozima + AS-48 5 µg/ml

Figura 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2013/070461

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K, C07K, C12N, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SOBRINO-LOPEZ, A. et al. The effect of adding antimicrobial peptides to milk inoculated with *Staphylococcus aureus* and processed by high-intensity pulsed-electric field. Journal of Dairy Science. June 2009, Vol. 92, Nº 6, pages: 2514 - 2523. ISSN 0022-0302. <Doi:10.3168/jds.2008-1996>	2, 4-6, 10, 12
A	LESZCZYNSKA, K. et al. Potential of ceragenin CSA-13 and its mixture with pluronic F-127 as treatment of topical bacterial infections. Journal of Applied Microbiology. January 2011, Vol. 110, Nº 1, pages: 229 - 238. NIH Public Access Author Manuscript. [29.06.2012] [DataBase in line][retrieved on 30.08.2012] Retrieved from the DataBase PMC by medio of internet:<URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3386848/>	1, 2, 4-6, 10, 11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10/10/2013	**(16.10.2013)**
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer E. Relaño Reyes Telephone No. 91 3498504

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2013/070461

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HOQ, MD. I. et al. Potent antimicrobial action of triclosan-lysozyme complex against skin pathogens mediated through drug-targeted delivery mechanism. European Journal of Pharmaceutical Sciencies. January 2011, Vol. 42, Nº 1-2, pages: 130 - 137. ISSN 0928-0987. <Doi:10.1016/j.ejps.2010.11.002>	1-3, 5-8
A	ANANOU, S. et al. Bactericidal synergism through enterocin AS-48 and chemical preservatives against *Staphylococcus aureus*. Letters in Applied Microbiology. July 2007, Vol. 45, Nº 1, pages: 19 - 23. ISSN 0266-8254. <Doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02155.x>	2, 4, 10, 12
A	MENDOZA, F. et al. Antilisterial activity of peptide AS-48 and study of changes induced in the cell envelope properties of an AS-48-adapted strain of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology. February 1999, Vol. 65, Nº 2, pages: 618 - 625. ISSN 0099-2240.	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070461

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2013/070461

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A61K, C07K, C12N, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, MENDLINE, BIOSIS, EMBASE, COMPENDX, XPESP, XPESP2, FSTA, HCAPLUS, INSPEC

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	SOBRINO-LOPEZ, A. et al. The effect of adding antimicrobial peptides to milk inoculated with *Staphylococcus aureus* and processed by high-intensity pulsed-electric field. Journal of Dairy Science. Junio 2009, Vol. 92, Nº 6, páginas: 2514 - 2523. ISSN 0022-0302. <Doi:10.3168/jds.2008-1996>	2, 4-6, 10, 12
A	LESZCZYNSKA, K. et al. Potential of ceragenin CSA-13 and its mixture with pluronic F-127 as treatment of topical bacterial infections. Journal of Applied Microbiology. Enero 2011, Vol. 110, Nº 1, páginas: 229 - 238. NIH Public Access Author Manuscript. [29.06.2012] [base de datos en línea][recuperado el 30.08.2012] Recuperado de la base de datos PMC por medio de internet:<URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3386848/>	1, 2, 4-6, 10, 11

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
10/10/2013	**16 Octubre 2013 (16.10.2013)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado E. Relaño Reyes Nº de teléfono 91 3498504

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2013/070461

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	HOQ, MD. I. et al. Potent antimicrobial action of triclosan-lysozyme complex against skin pathogens mediated through drug-targeted delivery mechanism. European Journal of Pharmaceutical Sciencies. Enero 2011, Vol. 42, Nº 1-2, páginas: 130 - 137. ISSN 0928-0987. <Doi:10.1016/j.ejps.2010.11.002>	1-3, 5-8
A	ANANOU, S. et al. Bactericidal synergism through enterocin AS-48 and chemical preservatives against *Staphylococcus aureus*. Letters in Applied Microbiology. Julio 2007, Vol. 45, Nº 1, páginas: 19 - 23. ISSN 0266-8254. <Doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02155.x>	2, 4, 10, 12
A	MENDOZA, F. et al. Antilisterial activity of peptide AS-48 and study of changes induced in the cell envelope properties of an AS-48-adapted strain of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology. Febrero 1999, Vol. 65, Nº 2, páginas: 618 - 625. ISSN 0099-2240.	1

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070461

CLASIFICACIONES DE INVENCIÓN

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