



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



CSA046384

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

Organización y
Digitalización CSA Ltda

PCT



SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-62890

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

TISU PARA HIGIENE QUE COMPRENDE UNA COMPOSICION

INHIBIDORA DE MICROBIOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

SCA HYGIENE PRODUCTS AB

DOMICILIO

GOTEBORG, SUECIA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-062890- -00000-0000

Fecha: 2009-06-17 17:36:14

Dep. 2020 NUECREACIONE

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 379 FASENACIONALII

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 106

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:****1**☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I.☒ Capítulo II.**2****SOLICITANTE
(71)**Nombre: **SCA HYGIENE PRODUCTS AB**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Suecia.Dirección: 405 03 Göteborg,
SueciaDomicilio: Göteborg,
Suecia**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **EMILIO FERRERO**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 438.019 T.P 31.929**4****INVENTOR (ES)
(72)****1. Ulrika HUSMARK**Skogsvägen 6,
435 38 Mölnlycke,
Suecia**2. Ulla FORSGREN BRUSK**Plommonvägen 35,
435 43 Pixbo,
Suecia**5****PCT (86)**Solicitud Internacional No. PCT/SE2006/001312Fecha: 17 de noviembre de 2006Publicación Internacional No. WO 2008/060199 A1Fecha: 22 de mayo de 2008**6****Título (54)****TISU PARA HIGIENE QUE COMPRENDE UNA COMPOSICIÓN INHIBIDORA DE
MICROBIOS****7****Clasificación Internacional (51) A61L 015/046****8****Prioridad**SI ☐ NO ☒

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

9**Comprobante de pago No.: 09-39,960****Fecha: 1° de junio de 2009**

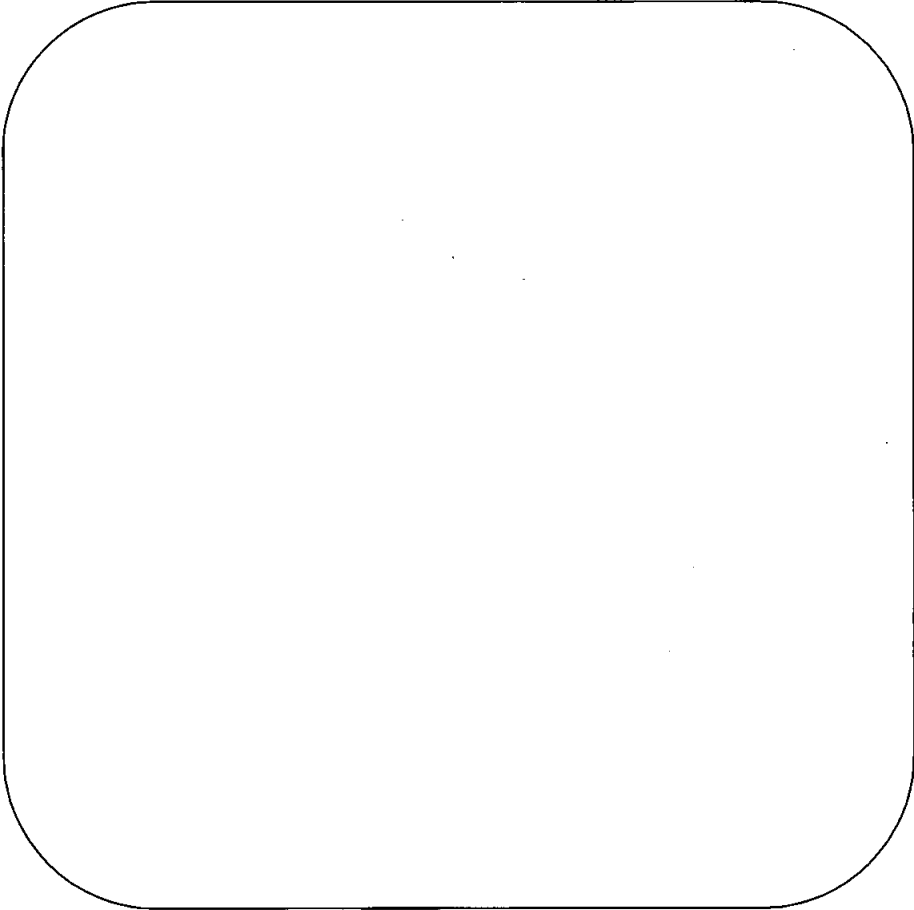
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.oo.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☒ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

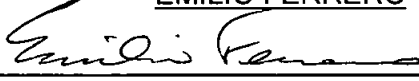
FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/060199 A1

Descripción:

Páginas 21 en el idioma original

Páginas 35 en español

Reivindicaciones: Número (s) 13

Figuras: Número (s) 6

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210:** Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional.
4. ☒ Extracto de publicación.

**SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

CAVELIER
BOGOTÁ
COLOMBIA

REPRESENTACION Y PODER

I (we), the undersigned / Yo (nosotros), abajo firmado (s)
SCA HYGIENE PRODUCTS AB

of / domiciliado (s) en: 405 03 Goteborg,
SWEDEN

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad Industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñanzas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistirse, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiales.

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñanzas, lemas comerciales.

REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentions and judicial, as well as before Arbitration Boards, in all matters concerning the following: a) Obtaining of patents of invention, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection of the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, interim measures, concession of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this / Dado y firmado hoy
Gothenburg 19 February 1999

In/en

Signature

Bengt Forshult
Head of Patent Department

Firma

SCA Hygiene Products AB

TRADUCCION No.: 17.0
MARIA ELVIRA MORTOLO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

LEGALIZACION

El Señor Cónsul de Colombia debe expedir un certificado consular sobre (1) la existencia legal de la compañía que otorga el poder, (2) que ésta ejerce su objeto social, y (3) que las personas que otorgan el poder están autorizadas para darlo. A este efecto les solicitamos que muestren al Señor Cónsul las pruebas que acreditan esos hechos (1), (2) y (3).

LEGALIZATION

The Colombia Consul must issue a consular certificate, on (1) the legal existence of the company, which grants the Power-of-Attorney, (2) that it is in actual exercise of its company purposes, and (3) that the persons who execute the Power of Attorney is authorized to do so. To this effect, please show the Consul the evidence to prove the above facts (1), (2) and (3).

TRADUCCION No. 1707199
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

RESPONSABLE DEL TEXTO
N.º DE ASISTENTE
2000 FEB 14 A 11:50
DE LEGALIZACIONES
FECHAS DE LEGALIZACION

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

I, the undersigned, RICKARD STRÖM, Notary Public of Gothenburg, Sweden, do hereby certify,

that **Bengt Forshult**

has personally signed this document overleaf, and

according to a Power of Attorney, dated 1998-08-11, signed by GUNNAR ANDERSSON and SVEN-ERIK WINLÖF, who are duly authorized to sign jointly for and on behalf of

SCA HYGIENE PRODUCTS AKTIEBOLAG - Org.No. 556007-2356

According to a Swedish Certificate of Registration, dated 1998-07-20, Bengt Forshult is duly authorized

to sign such a document on behalf of the company.

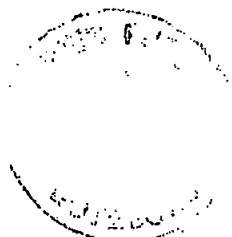
In Gothenburg, this 25th day of February 1999

Ex. No.:

RICKARD STRÖM

Exp.No.: 79234

Fee: SEK 350:-



PAGADO
Impuesto de Timbre
Derechos Consulares
Aven
7
dólares US\$
100

NO. 3066

The Ministry for Foreign Affairs in Stockholm, hereby certifies that

Mr **Rickard Ström**

Notary Public of Gothenburg

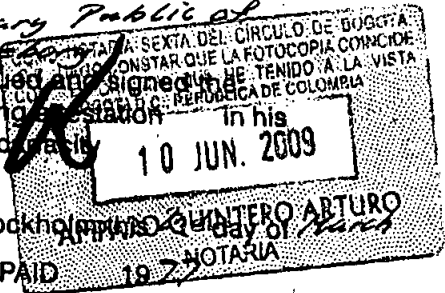
has issued and signed the foregoing in his official capacity

Fee Stockholm

Kr 120/- PAID

1999-03-05

Lars Höjberg
Lars Höjberg



MARIA SMITH RUEDA
Encargada de las Funciones Consulares

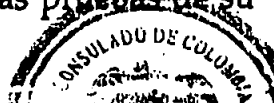
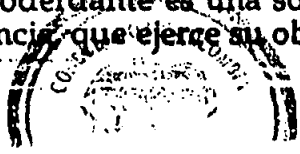
Fecha: 1999-03-05

No. 022

que el señor **Bengt Forshult** quien firma el documento se autodeclaró ejercer para **Representante** de la Sociedad **SCA Hygiene Products Aktiebolag** que existe y actúa de acuerdo a las leyes de Suecia según se me presentó en los documentos que tuve a la vista.

CERTIFICADO
Bengt Forshult

NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL DE COLOMBIA: Según los artículos 65 del C. de P.C. y 480 del C. de Co., si el poderdante es una sociedad, el Señor Cónsul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su existencia que ejerce su objeto social y que quien confiere el poder es su representante.



5

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

Mario Smith Rueda
2828333
Cuya firma aparece en el
documento desempeña
las funciones indicadas

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

019530

99 JUL 28 1984

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

TRADUCCION No. 1707
MARIA DEL VIVAR MARRERO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
10 JUN. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA



EL CONSULADO DE COLOMBIA EN
ESTOCOLMO, SUECIA

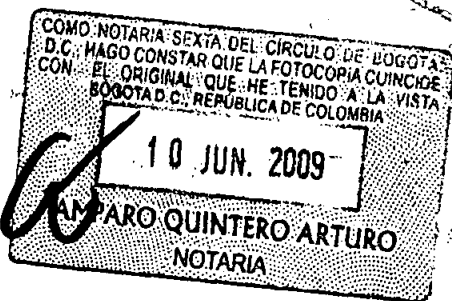
Fecha.....1999-07-01..... No:.....001329

Previa la confrontación correspondiente DA
FE de que la firma que aparece en este docu-
mento es similar a la REGISTRADA aquí por

Inger Högberg, Relaciones
Exteriores, Suecia

M. Smith

MARIA SMITH RUEDA
Encargada de las Funciones Consulares



PAGADO	
Impuesto de Timbre	<i>Siete</i> dólares US\$ <i>7</i>
Derechos Consulares	<i>Quince</i> dólares US\$ <i>15</i>



TRADUCCION No: 1709199
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

6

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 17.07/99 preparada por María Elvira Martelo, Traductora Oficial aprobada por el Ministerio de Justicia por Resolución 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

(A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento escrito en inglés y español, por el cual SCA HYGIENE PRODUCTS AB otorga poder a EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y GERMAN CAVELIER). Dado y firmado el 19 de febrero de 1999 en Gothenburg. (Firma ilegible) Bengt Forshult, Jefe del Departamento de Patentes.

Yo, el abajo firmante RICKARD STRÖM, Notario Público de Gothenburg, Suecia, por el presente certifico,

que Bengt Forshult

ha firmado personalmente el documento anterior y

que de acuerdo con el poder de fecha 1998-08-11, firmado por

GUNNAR ANDERSSON y SVEN-ERIK WINLÖF, quienes están debidamente autorizados para firmar conjuntamente por y a nombre de SCA

HYGIENE PRODUCTS AKTIEBOLAG - Org. No. 556007-2356, según

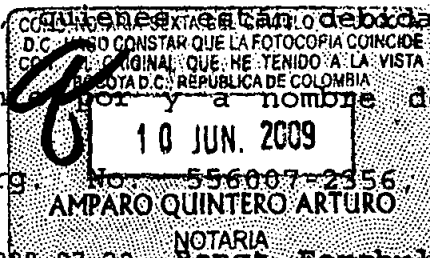
Certificado de Registro Sueco de fecha 1998-07-20, Bengt Forshult está debidamente autorizado para firmar dicho documento a nombre de la compañía.

Gothenburg, 25 de febrero de 1999.

Ex officio: (Firma ilegible), RICKARD STRÖM (Sello notarial).

Exp. No.: 79234

Derechos: SEK 350:--.



No. 3066

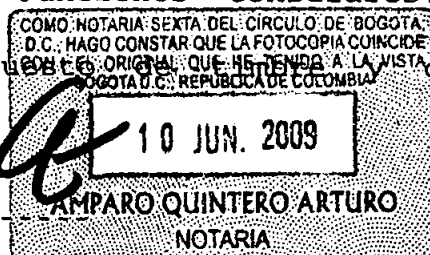
El Ministerio de Relaciones Exteriores en Estocolmo por el presente certifica que el Sr. Rickard Ström, Notario Público de Goteborg, ha expedido y firmado la declaración anterior en su capacidad oficial.

Derechos Estocolmo, 25 de marzo

Kr. 120 PAGADOS de 1999

(Firma ilegible) Inger Högberg. (Sello en tinta) Ministerio de Relaciones Exteriores.

(En español) Certificación de la capacidad legal de Bengt Forshult y de la existencia legal de SCA HYGIENE PRODUCTS AKTIEBOLAG expedida el 5 de marzo 1999 por el Consulado de Colombia en Estocolmo bajo el No. 022. (Firma) M. Smith. MARÍA SMITH RUEDA, Encargada de las Funciones Consulares. Sello consular en tinta. Pagados impuestos de timbre y derechos consulares.



(En español) Certificación de la firma de Inger Högberg, Ministerio de Relaciones Exteriores, Suecia, expedida el 01 de julio de 1999 por el Consulado de Colombia en Estocolmo bajo el No. 001329. (Firma) M. Smith. MARÍA SMITH RUEDA, Encargada de las Funciones Consulares. Sello consular en tinta. Pagados impuesto de timbre y derechos consulares.

(Al anverso) Legalización de la firma que antecede expedida por

el MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES bajo el No. 119916 del 14 de febrero del 2000, firmado por el Jefe de Legalizaciones.

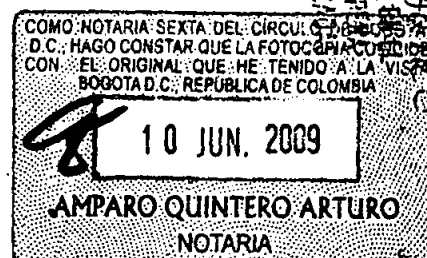
Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO 11256-801-014-7

Id. 108

Feb. 15/00

Maria Elvira Martelo
TRADUCCION No. 1107199
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia



220552
C/ JIRA MA
COPIA FIRMA ASESOR
DOCUMENTOS DE
LAS FUERZAS ARMADAS

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

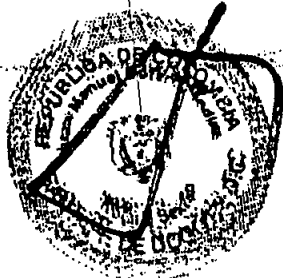
U SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2000 FEB 16/00
Jefe de Legalizaciones
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LAS FIRMAS DE

[Firmas manuscritas]

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA

SANTAFE DE BOGOTA, 16 FEB. 2009



COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

[Firma] 10 JUN. 2009

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

SE HAN VERIFICADO

225

2009

[Firma]

9

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suecia

El presente documento oficial

2. ha sido firmado por Anne-Marie Bonde

3. en su calidad de Notario Público

4. y lleva el timbre/sello de Notario Público
en Estocolmo

Lo cual se certifica

5. en Estocolmo

6. el 07.04.2009

7. por Björn Sandin

Notario Público

8. No 1503

9. Timbre/Sello:

10. Firma:

[Handwritten signature]



CAVELIER

374

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4a N° 72-35

BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

CESION

ASSIGNMENT

(nos) abajo firmado (s)

Ulrika HUSMARK

Ulla FORSGREN BRUSK

domiciliado(s) en

Skogsvägen 35, 435 38 Mölnlycke, Suecia

Plommonvägen 35, 435 43 Pixbo, Suecia

declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es)
de la invención:

TISSO PARA HIGIENE QUE COMPRENDE UNA COMPOSICION INHIBIDORA DE MICROBIOS

declaro(amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero(erimos), sin
limitación, a favor de la sociedad

SCA Hygiene Products AB

constituida y existente de conformidad con las leyes de

Suecia

domiciliada en

Göteborg, Suecia

todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada
Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de
invención correspondiente en la República de Colombia.

I, the undersigned

Ulrika HUSMARK

Ulla FORSGREN BRUSK

of

Skogsvägen 35, 435 38 Mölnlycke, Sweden

Plommonvägen 35, 435 43 Pixbo, Sweden

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:

HYGIENE TISSUE COMPRISING A MICROBE-INHIBITING
COMPOSITION

state as well, that assign, without reservations or limitations in favour
of

SCA Hygiene Products AB

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of

Sweden

domiciled in Göteborg, Sweden

all rights inherent to said invention and that the above mentioned
company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding
patent invention, in the Republic of Colombia

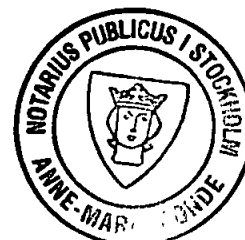
Dado y firmado hoy/Given and signed this

en/in

por/by

Ulrika Husmark
Ulrika Husmark

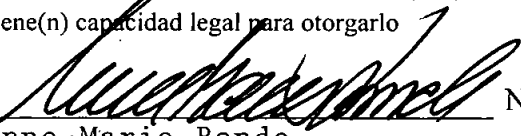
Ulla Forsgren-Brusk
Ulla Forsgren Brusk



CERTIFICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 7 días del mes de abril
de 200 9 Ante mí, Notario Público de Estocolmo,
Suecia,
compareció(eron) personalmente Ulrika Husmark y
Ulla Forsgren Brusk,

quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo


Anne-Marie Bonde

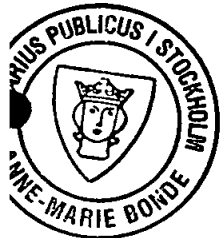
NOTARIO PÚBLICO-NOTARY PUBLIC

NOTARIAL CERTIFICATION (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____
200 ____ before me, a Notary Public of _____

personally appeared _____

to me known, and known to me to be the person(s) who executed
that foregoing document, and who has(have) legal capacity to
execute it.



APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country:
This public document
2. has been signed by
3. acting in the capacity of
4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at 6. the
7. by
8. No.
9. Seal/stamp 10. Signature

.....

12

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
22 May 2008 (22.05.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/060199 A1

- (51) International Patent Classification:
A61L 15/46 (2006.01) A61F 13/15 (2006.01)
A47K 10/16 (2006.01) A61L 15/36 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/SE2006/001312

(22) International Filing Date:
17 November 2006 (17.11.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(71) Applicant (for all designated States except US): SCA HYGIENE PRODUCTS AB [SE/SE]; S-405 03 Göteborg (SE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): HUSMARK, Ulrika [SE/SE]; Skogsvägen 6, S-435 38 Mölnlycke (SE). FORSGREN BRUSK, Ulla [SE/SE]; Plommonvägen 35, S-435 43 Pixbo (SE).
- (74) Agents: UNGE, Annika et al.; Valca AB, P.O. Box 7086, S-103 87 Stockholm (SE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report



WO 2008/060199 A1

- (54) Title: HYGIENE TISSUE COMPRISING A MICROBE-INHIBITING COMPOSITION
- (57) Abstract: The present invention concerns hygiene tissue (1), such as a wet wipe, dry wipe, washcloth, patch, towelette, napkin, and the like comprising a microbe-inhibiting composition (8), said microbe-inhibiting composition (8) comprising an extracellular product of at least one probiotic bacterium and at least one additive in the form of an organic acid, with at least one of its pKa value not exceeding 5.5, and/or a salt thereof.

HYGIENE TISSUE COMPRISING A MICROBE-INHIBITING COMPOSITION

TECHNICAL FIELD

- 5 The present invention relates to a hygiene tissue, such as a wet wipe, dry wipe, washcloth, patch, towelette, napkin, or the like, that comprises at least one extracellular product of at least one probiotic bacterium and at least one of the selected additives giving a synergistic inhibitory effect on *Candida albicans* or other unwanted microorganisms.

10 BACKGROUND OF THE INVENTION

- The urogenital area harbors a complex microbial ecosystem comprising more than 50 different bacterial species (Hill et al., Scand. J. Urol. Nephrol. 1984;86 (suppl.) 23-29). The dominating species for fertile women in this area are lactic acid producing bacteria belonging to the genus *Lactobacillus*. These lactic acid producing members are important for retaining a healthy microbial flora in these areas, and act as probiotic bacteria with an antagonistic effect against pathogenic microbial species. Lactic acid producing bacteria inhibit growth and colonization by other microorganisms by occupying suitable niches for colonization, by forming biofilms and competing for available nutrients, thereby excluding colonization by harmful microorganisms. Also, the production of hydrogen peroxide, specific inhibiting substances, such as bacteriocines, and organic acids (including lactic acid and acetic acid) that lower the pH, inhibit the growth and colonization by other microorganisms.

- The microbial ecosystem of a healthy individual can be disturbed by the use of antibiotics, during hormonal changes, such as during pregnancy or use of contraceptives with estrogen, during menstruation, after menopause, in people suffering from diabetes etc. Also, microorganisms may spread from the anus to the urogenital area, this results in a disturbance of the normal microbial flora and leaves the individual susceptible to microbial infections such as vaginitis, candida infections, urinary tract infections and skin infections. Microorganisms commonly associated with these kinds of infections belong to the genera *Escherichia*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Gardnerella* and *Candida*. Women are at particular risk due to their shorter distance between the anus and the urogenital tract; specially at risk are young women, who not yet have a well developed microflora in the urogenital area and older women, who in most cases no longer have a protective flora.

Similarly to the urogenital area, the skin is colonized by an array of organisms, which forms

its normal flora. The numbers and identity of the organisms vary between different skin sites. This, together with the skin's structural barrier, provides the host with an excellent defense against invading microbes. The number of bacteria on the skin varies from a few hundred per cm² on the arid surfaces of the forearm and back, to tens of thousands per cm² on the moist areas such as the axilla and groin. This normal flora plays an important role in preventing foreign organisms from colonizing the skin, but it needs to be kept in check, in order to avoid skin infections.

Staphylococcus aureus is the most common cause of minor skin infections, such as boils or abscesses, as well as more serious post-operative wound infection. Treatment involves drainage and this is usually sufficient for minor lesions, but antibiotics may be given in addition when the infection is severe and the patient has fever.

Toxic shock syndrome is a systemic infection caused by *S. aureus* strains which produce toxic shock syndrome toxin. The disease came to prominence through its association with tampon use by healthy women, but it is not confined to women and can occur as a result of *S. aureus* infection at non-genital sites.

Other common skin infections are caused by *Streptococcus pyogenes* (group A streptococci). The organisms are acquired through contact with other people with infected skin lesions and may first colonize and multiply on normal skin prior to invasion through minor breaks of the epithelium and the development of lesions.

Treatment with penicillin or erythromycin may be necessary to combat the infection.

Candida likes skin sites which are moist and warm and also rapidly colonizes damaged skin. Hence, the relative dryness of most areas of skin prevents the growth of *Candida*, which therefore are found in low numbers on healthy skin. *Candida* also colonizes the oral and vaginal mucosa and over-growth may result in disease in these sites. *C. albicans* is associated with diaper dermatitis. A study has shown that *C. albicans* induced lesions are remarkably influenced by pH, a lower skin pH giving less lesions (B. Runeman, Acta Derm Venereol 2000 ; 80: 421-424).

One way to reduce the problems with the kind of infections described above is to have a good personal hygiene. However, excessive use of cleaning agents not only decreases the amount of harmful microbes, but can harm the beneficial microbial flora, again render it susceptible for pathogenic species to colonize and cause infections. Alternatively,

administration of lactic acid producing bacteria to the urogenital area and the skin, in order to out-compete pathogenic species and facilitate reestablishment and maintenance of a beneficial microbial flora in these areas, has been found to be a successful means to treat and prevent microbial infections

5

It has been suggested that lactic acid producing bacteria can be delivered via absorbent products, such as diapers, sanitary napkin, incontinence guards, panty liners and tampons, as described in, for example, WO 92/13577, WO 97/02846, WO 99/17813, WO 99/45099 and WO 00/35502. However, absorbent articles may not always be an optimal administration route, since carrying of an absorbent article often is apprehended as uncomfortable, indiscrete and warm. This administration route can also be inconvenient as repeated administration of lactic acid producing bacteria is often necessary to retain the efficacy of the treatment or the preventative effect. Also, these products cannot be used for delivery of the bacteria to other regions of the body than the urogenital area. Therefore, for some applications it can be more convenient to administer lactic acid producing bacteria by other means than absorbent products. A second problem with the administration of lactic acid producing bacteria via absorbent articles relates to the manufacturing of such products, since all possible variants and sizes of the product have to be supplied with the bacteria. Therefore the administration via a product that could be used without individual adjustments could provide a manufacturing advantage over the absorbent products .

20

It has also been suggested to delivering the lactic acid producing bacteria via hygiene tissue that allows both cleaning and caring of the skin and urogenital area and delivery of probiotic lactic acid producing bacteria, for example, WO 04/060416.

25

A major problem with providing products intended to be used for transfer of lactic acid producing bacteria, is that the bacteria have to retain viability during transport and storage of the products. Lactic acid producing bacteria rapidly lose viability under semi-moist conditions, and it is therefore important that the bacteria are not exposed to moisture during storage. One way to partly overcome this problem in absorbent products provided with lactic acid producing bacteria has been to supply the products with the bacteria, drying said products to remove most of the moisture in them and providing the product in moisture impervious packages (W099/17813).

30

WO 00/61201 discloses a sanitary product containing an effective amount of a viable, non-pathogenic, probiotic bacteria, such as *Bacillus coagulans*, or an extracellular product thereof.

35

EP 1140226 describes the combination of a pH regulating substance in the form of a partially neutralized superabsorbent material with lactic acid-producing bacteria.

- 5 In view of the prior art there is still a need for hygiene tissues with an improved prebiotic and/or probiotic effect, which hygiene tissues are easy to store and transport.

SUMMARY OF THE INVENTION

- 10 In view of this prior art it is an object of the present invention to provide a hygiene tissue comprising a microbe-inhibiting composition with an enhanced effect. It is also an object of the present invention that said hygiene tissue comprising a microbe-inhibiting composition easily transported and stored without the microbe-inhibiting composition losing its micro-flora balancing and health promoting function

- 15 The above defined problems are solved by the present invention by a hygiene tissue such as a wet wipe, dry wipe, washcloth, patch, towlette, napkin, and the like comprising a microbe-inhibiting composition comprising an extracellular product of at least one probiotic bacterium and at least one additive in the form of an organic acid, having a pKa value not exceeding 5.5, and/or a salt thereof, giving a synergistic prebiotic effect.

- 20 In one aspect said pKa value do not exceed 5.

- According to the present invention said microbe-inhibiting extracellular product is a supernatant obtained by filtration or centrifugation of a culture of a probiotic bacterium.

- 25 In one embodiment said microbe-inhibiting composition is substantially free from probiotic bacteria, the probiotic bacteria are preferably not present in an amount higher than 100 CFU/ml and more preferably not higher than 10 CFU/ml.

- 30 In one embodiment of the invention said microbe-inhibiting composition comprises at least one probiotic bacterium, an extracellular product of at least one probiotic bacterium and at least one of said additives.

- In one aspect of the invention the probiotic bacterium is a lactic acid producing bacterium.

- 35 In a further aspect of the invention the lactic acid producing bacterium is *Lactobacillus plantarium* LB 931. In one other aspect of the invention the lactic acid producing bacterium is

Lactobacillus fermentum Ess-1. In a further aspect of the invention the lactic acid producing bacterium is a combination of *Lactobacillus plantarum* LB 931 and *Lactobacillus fermentum* Ess-1.

- 5 In one aspect of the invention said additive is chosen from acetic acid, propionic acid, lactic acid, ascorbic acid, phenylalanine, citric acid, butyric acid, valeric acid, capronic acid, succinic acid and/or a salt thereof. Preferably said additive is chosen from acetic acid, propionic acid, lactic acid, phenylalanine, citric acid or succinic acid, ascorbic acid, and/or a salt thereof. Most preferably said additive is chosen from ascorbic acid, acetic acid, propionic acid, succinic acid and/or a salt thereof.
- 10

In another aspect of the invention said salt is a sodium salt; preferably sodium propionate or sodium acetate.

- 15 Since the microbe inhibiting composition of the invention combining an extracellular of a probiotic bacterium and an additive gives an unexpected synergistic effect in inhibition of pathogenic microorganisms, a hygiene tissue according to the invention comprising this microbe inhibiting composition has an enhanced prebiotic effect. In addition a hygiene tissue of the present invention is easy to transport and store without the microbe inhibiting composition losing its beneficial properties.
- 20

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig 1. shows the growth of *C. albicans* in extracellular product of LB 931 with addition (50mM) of different acids/salts.

- 25 Fig. 2a. shows the growth of *E.coli* in extracellular product of LB 931 with addition (50mM) of different acids/salts.

Fig. 2b. shows the growth of *S. Saprophyticus* in extracellular product of LB 931 with addition (50mM) of different acids/salts.

- Fig. 3a. shows the growth of *Candida albicans* when extracellular product of the *Lactobacillus fermentum* Ess-1 was combined with the additive ascorbic acid.
- 30

Fig. 3b. shows the growth of *Candida albicans* when extracellular product of the *Lactobacillus fermentum* Ess-1 was combined with the additive propionic acid.

Fig. 4-6 show perspective views of hygiene tissues according to the present invention.

- 35 DEFINITIONS

Probiotics/probiotic in the present context relates to live microorganisms that confer a health benefit when administered in adequate amounts to a host.

By lactic acid producing bacteria is meant a bacterium producing lactic acid. Preferred lactic acid producing bacteria for the object of the present invention include bacteria from the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Pediococcus*. Preferably the selected bacterium used is from the species *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* or *Lactobacillus plantarum*. More preferably the bacterial strain is selected from *Lactobacillus plantarum* or *Lactobacillus fermentum*. Even more preferably the lactic acid producing bacterium is *Lactobacillus plantarum* 931 (deposition No. (DSMZ): DSM 11918) and *Lactobacillus fermentum* Ess-1 (deposition No. (DSMZ): DSM 17851).

10

Prebiotics/prebiotic in the present contexts relates to substances that promote a balanced micro flora when administered in adequate amounts to a host. Examples are nutrients for probiotic bacteria, substances that promote adhesion to the host for probiotic bacteria, pH-regulating substances and extracellular products from probiotic bacteria.

15

By microbe-inhibiting is meant the inhibition of growth, colonization and/or survival of other microorganisms.

By extracellular product is meant products secreted in cultures of probiotic bacteria which extracellular products have an antimicrobial effect. The extracellular product is obtained from the bacterial cell cultures by e.g. filtration, centrifugation, or both of these, and the resulting supernatant comprising the extracellular product possesses antimicrobial activity useful in a microbe-inhibiting composition.

By "hygiene tissue" is meant any device for wiping, cleaning and caring of the skin and the urogenital area which also can be used to deliver a microbe-inhibiting composition to these areas, for instance a wet wipe, dry wipe, washcloth, patch, towelette, napkin, and the like.

By lipid is in the present context meant substances that are insoluble in water but soluble in an organic solvent.

30

DETAILED DESCRIPTION

An object of the present invention is to provide hygiene tissues, suitable for wiping, cleaning and caring of the skin and the urogenital area and simultaneously release a microbe-inhibiting composition that is to be transferred to the skin

35

19

The present invention pertains to solve the problem of growth, colonization and/or survival of pathogenic microorganisms in the urogenital area and on the skin by using said hygiene tissue. This problem is in the present invention solved by applying a microbe-inhibiting composition comprising an extracellular product of at least one probiotic bacterium and at least one additive, in the form of an organic acid, having a pKa value not exceeding 5.5 and/or a salt thereof, to a hygiene tissue.

By combining said additive with said extracellular product a surprisingly large increase in the inhibition of *Candida albicans* and several other microorganism such as for example *E.coli* and *S. Saprophyticus* is obtained.

It should be noted that of course a combination of two or more probiotic bacterial strains may be used to produce the extracellular product of the invention. Also it is of course possible to use a combination of at least two bacterial strains in a microbe-inhibiting composition of the invention.

Figure 4 to 6 shows preferred embodiments of a hygiene tissue 1 containing the microbe-inhibiting composition 8. The hygiene tissue 1 provided can be composed of a matrix comprising any natural or synthetic fiber, such as rayon, cellulose, regenerated cellulose, polyester, polyolefine fibers, textile and the like, or foam, nonwoven, felt or batting, or combinations thereof.

It is understood that the hygiene tissue described above and shown in the drawings only represents non-limiting examples and that the present invention is not limited thereto, but can be used in any type of hygiene tissues as defined above.

In one embodiment of the present invention when the microbe-inhibiting composition comprises said extracellular product and said additive, said composition is substantially free from probiotic bacteria. It is noted that it is extremely difficult to manufacture a composition that is totally free from probiotic bacteria, therefore it is preferably not present in an amount higher than 100 CFU/ml and preferably not higher than 10 CFU/ml. This composition has the advantage of less stringent storage requirements since the extracellular product is more durable than the live microorganism.

In another embodiment of the invention said microbe-inhibiting composition comprises at least one probiotic bacterium, an extracellular product of at least one probiotic bacterium and at least one of said additives. In this embodiment when said microbe-inhibiting

composition also comprises at least one probiotic bacteria the effect is said to be prebiotic and probiotic.

5 The probiotic bacteria which are suitable for use in the present invention produce in most cases acid and are in all cases non-pathogenic. There are many suitable bacteria identified herein below, although the invention is not limited to currently known bacterial species and strains as long as the above function and the objectives of the probiotic bacteria are fulfilled.

10 An important characteristic of the probiotic lactic acid producing bacteria is their capability to produce lactic acid and in some cases also other acids, said acids increases the acidity of the skin mucosa which helps in preventing the growth, colonization and survival of undesired fungi and bacteria. Thus, by the mechanism of acid production, these probiotic bacteria inhibit the growth of competing and harmful bacteria and fungi. Further important characteristics of said bacteria is their ability to produce hydrogen peroxide and other
15 microbe inhibiting substances and also their ability to adhere to cell surfaces and thereby prevent adhesion of other harmful bacteria and fungi to these surfaces.

Typical lactic acid-producing bacteria useful in a microbe-inhibiting composition of this invention are all members of the *Lactobacillus*, *Lactococcus* or *Pediococcus*, which are
20 efficient acid producers, and also including non-pathogenic members of the *Bacillus* genus, all members of the *Bifidobacterium* genus, and *Pseudomonas limbergii*, although certain species are especially preferred as described below.

Preferred members of the *Lactobacillus* genus include *Lactobacillus acidophilus*,
25 *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cereale*, *Lactobacillus delbrukei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasei*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus thermophilus*, *Lactobacillus paracasei* sp. *paracasei*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, and the like.

30 Particularly preferred is the novel bacterium *Lactobacillus fermentum* Ess-1 and *Lactobacillus plantarum* LB 931. LB 931 has previously been found valuable for preventing and/or treating urogenital infections as it inhibits growth of a large number of pathogenic microorganisms, in e.g. EP1060240. *Lactobacillus fermentum* Ess-1 (deposition No. (DSMZ):
35 DSM 17851) was deposited according to the Budapest Treaty at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) (depositor Essum AB, Box 3160, SE 90304 Umeå, Sweden, deposited on January 6, 2006).

It should be noted that although in the examples below where only two Lactobacilli strains have been used, these bacterial strains should only be seen as a model for probiotic bacteria useful in the practice of the present invention. Therefore the below examples should not be
5 seen as limiting for the present invention. It is intended that any lactic acid producing species of probiotic bacteria may be used in the composition.

The extracellular product of the present invention is obtained from a bacterial culture. Bacteria suitable for the present invention secrete products having antimicrobial activity
10 which is useful for the objectives of the present invention. In order to obtain the extracellular products, cell cultures are harvested as described below and the supernatant is obtained by centrifugation or filtration or both. The thus obtained supernatant has a microbe inhibiting activity due to extracellular products comprised therein. An example of how the extracellular product may be prepared is described under Example 3.

15 The extracellular product may be in the form as when obtained directly from a bacterial culture but it is also possible to concentrate and/or purify the supernatant further. By purification is meant that some of the microbe-inhibiting substances are isolated by for example chromatography, crystallisation or distillation and used separately or in combination
20 with other isolated substances.

The additive which is added to the probiotic bacteria and/or to the extracellular product in the present invention is in the form of an organic acid or a salt thereof. When choosing said additive this should of course be made from a product safety point of view. The organic acids
25 or the corresponding salts should be of such nature that when applying them onto a sanitary article they should not cause any skin irritation to the user of the hygiene tissue, therefore the pKa of the organic acid, when the measurement are performed in water at 25 C°, should preferably not be lower than 2. If the pKa values instead are too high, the organic acids or the salts thereof will mainly be in their acid forms. This means that the additive will not be
30 sufficiently dissociated into a hydrogen ion and its deprotonated, anionic form, which is believed to be a prerequisite in order to obtain said synergistic microbe-inhibiting effect with the probiotic bacterium and/or the extracellular product thereof. Therefore the pKa value for the organic acid suitable for the present invention should be lower than 5.5, preferably lower than 5. If the organic acid suitable for the present invention have more than one pKa value,
35 at least one of these values should be lower than 5.5, preferably lower than 5.

When the extracellular product is in the form of a supernatant, the solubility of these organic acids or the corresponding salts should be sufficiently high so that said additive can be dissolved in the supernatant.

- 5 In a preferred embodiment of the present invention the additive is chosen from acetic acid, propionic acid, lactic acid, ascorbic acid, phenylalanine, citric acid, butyric acid, valeric acid, capronic acid, succinic acid and/or a salt thereof. Preferably said additive is chosen from acetic acid, propionic acid, lactic acid, ascorbic acid, phenylalanine, citric acid or succinic acid, and/or a salt thereof. Most preferably said additive is chosen from ascorbic acid, acetic acid, propionic acid, succinic acid and/or a salt thereof.
- 10

In one embodiment of the invention the salt is a sodium salt. Especially preferred salts are sodium propionate and sodium acetate.

- 15 The product typically comprise about 0,5-100 ml and preferably contains 1-10 ml of the extracellular product.
- Said additive is typically added with a final concentration of 5 -100 mM to the the extracellular product.
- If the hygiene tissue further comprises probiotic bacteria, these are typically provided in amounts of about 10^6 - 10^{11} CFU of viable probiotic bacteria per hygiene tissue. Typically the bacteria are in the form of cells or spores which are provided in a suspension.
- 20 These amounts can however vary depending on the specific application, product formulation and intended use.
- 25 The microbe-inhibiting composition may be directly applied to the hygiene according to the invention or provided in a pharmaceutically acceptable carrier which may enhance the transfer of the microbe-inhibiting composition, examples of such includes lipids. Examples of lipids suitable for the present invention include petroleum derived lipids, such as paraffinum liquidum (mineral oils, paraffin oils, and vaseline oils), petrolatum (vaseline and petroleum jelly), cera microcrystallina, ozokerite, ceresine and parafins. Alternatively, synthetic lipids, such as dimethicone, cyclomethicone and silicone esters, such as dimethylmethicone can be used. A third alternative is to use animal-or plant-derived lipids, which usually are triglycerides.
- 30
- 35 In one preferred embodiment the microbe inhibiting composition is in the form of a suspension, said suspension may be applied directly to the sanitary article by impregnation,

spraying, printing or the like, whereafter the hygiene tissue may be dried, by for e.g. heat drying.

In another preferred embodiment the microbe-inhibiting composition is in the form of a powder. The powder may be mixed into said pharmaceutically acceptable carrier or be directly applied to the hygiene tissue as a powder. In the case where the powder is mixed into a pharmaceutically acceptable carrier, this mixture may be applied to the hygiene tissue by impregnation, spraying, printing or the like, whereafter the hygiene tissue may be dried. A delivery device, meaning a separate pocket attached to the hygiene tissue is also a possible way of deliver said microbe-inhibiting composition.

The powder according to the above may be obtained by evaporating the above discussed suspension such as by heat drying, convective drying, spray drying, freeze drying, or the like. It may be necessary to further mould the dried microbe-inhibiting composition in order to obtain a fine powder. The probiotic bacteria are preferably freeze dried.

In one preferred embodiment the hygiene tissue may be a dry hygiene tissue, meaning that the hygiene tissue either comprises the microbe-inhibiting composition as a powder or that the hygiene tissue has been dried after the application of the suspension containing the microbe-inhibiting composition. In this case the hygiene tissue is intended to be wetted before use and the solubility of the additive should therefore be of such nature that the additive rapidly comes into solution when contacted by for e.g. water.

In a further preferred embodiment the hygiene tissue may be a wet hygiene tissue, meaning for e.g. that the hygiene tissue is impregnated with either the above suspension or the pharmaceutically acceptable carrier comprising the microbe-inhibiting composition.

When the hygiene tissue comprises live probiotic bacteria the bacteria must be protected from moisture. The sanitary article may therefore be hermetically enclosed in a moisture-impervious package. WO 00/76878 gives an example of such a moisture impervious package. Another example of how the bacteria can be protected is by the use of a delivery system as exemplified in for example WO 02/28446.

The present invention also aims to decrease the problems with retaining the effect during storage. Since all the effect in some embodiments and at least parts of the effect in other embodiments comes from a composition containing substantially no living organisms, the problem of keeping the micro-organism viable and thus functional is eliminated.

21

The prior art discloses absorbent articles only comprising probiotic bacteria or extracellular products thereof. However the microbial inhibiting effect, especially against *Candida* and the transfer of the probiotic bacteria from the sanitary article to the wearer, is not always

5 completely satisfying, there are also many problems to overcome when producing and storing sanitary products containing viable microorganism

One advantageous way of providing the hygiene tissue according to the present invention is therefore as a kit together with an absorbent article. Regular use of absorbent article has an

10 impact on the uro-genital microclimate, which may lead to an imbalance in the urogenital microflora. The addition of a microbe-inhibiting composition may improve this balance. Since regular users of absorbent articles may be at extra risk and since changing of the absorbent article occurs at regular times this could be an effective way of reaching a target group and establishing a routine for administrating the microbe-inhibiting composition.

15 Another possibility is to deliver said microbe-inhibiting composition separately in a form which is convenient to apply directly to a hygiene tissue by the user, for example in its liquid form, as a powder, dispersed in a lotion, dispersed in oil. The supply means for said microbe-inhibiting composition could be a spray, a roll-on device, a tube, a bottle, an ampoule, a strip

20 or a stick.

In a still further aspect of the invention the microbe-inhibiting composition is used in combination with the hygiene tissue according to the invention.

25 Another aspect of the invention is to preparing a hygiene tissue comprising applying said microbe-inhibiting composition to said hygiene tissue.

EXPERIMENTAL SECTION

Test 1

30 The purpose of this test was to determine whether selected additives affect the growth of *Candida albicans* and if an improved growth inhibition can be achieved when they are added to the extracellular products of *Lactobacillus plantarum*, LB 931. The additives used in this test were ascorbic acid, citric acid, phenylalanine, acetic acid, propionic acid and sodium propionate.

35

Method

Yeast strain

A clinical isolate of *Candida albicans* (designated *C. albicans* 702) was used as test strain. It was isolated from the vagina of a woman with vaginal candidiasis.

5

Control

As control pure dMRSs broth (MRS broth without addition of sodium acetate) was used. A specified volume was transferred to wells of a micro titre plate and was let to air dry (45°C minimum of 20 hrs).

10

Extracellular product (ECP)

Cultures of LB 931 grown in dMRSs broth were centrifuged to pellet the cells and sterile filtered using a 0,22µm filter (Millipore filter, Bedford, USA) in order to obtain the LB 931 supernatant comprising the LB 931 extracellular product. A specified volume of sterile filtered supernatant was transferred to wells of a micro titre plate and was let to air dry (45°C minimum of 20 hrs) and thereafter resuspended in sterile distilled water to a concentration three times higher and 200µl were transferred to 96-wells micro titre plates.

15

Extracellular product with additive

The additives were added to a final concentration of 50mM to tubes containing the sterile filtered supernatant of LB 931. A specified volume was transferred to wells of a micro titre plate and was let to air dry (45°C minimum of 20 hrs) and thereafter resuspended in sterile distilled water to a concentration three times higher (i.e. the volume of the sterile distilled water is about one third of the specified volume before air drying) and 200µl were transferred to 96-wells micro titre plates.

25

Broth with additive

The additives were added to a final concentration of 50mM in dMRSs broth. pH was adjusted to the same pH-value as in the extracellular product with additive for the respective additive. A specified volume was transferred to wells of a micro titre plate and was let to air dry (45°C minimum of 20 hrs) and thereafter resuspended in sterile distilled water to a concentration three times higher and 200µl was transferred to 96-wells micro titre plates.

30

Candida was added to a final concentration of $\sim 10^4$ cells per well and the micro titre plate was incubated at 37°C for 24 hrs.

35

pH for the different additives varied between $3,4 \pm 0,2$. The pH for broth with additive and extracellular product with additive was always the same.

The test was blinded so that there could be no preconceived opinions colouring the results.

- 5 The inhibition of *Candida* was evaluated and graduated, by two persons using a template, on a scale from five to zero based on visual observations of turbidity with a calculated mean value being presented. Wells containing strong growth of *Candida* in pure dMRSs-broth was graduated as five, while wells with no visual growth were graduated as zero.

10 Results

- As can be seen in Fig. 1 very few additives themselves proved to have an effect on the growth of *Candida* although the pH was very low. The extracellular product of LB 931 was effective in the inhibition of *Candida*. This effect was surprisingly enhanced by the addition of the additives to the extracellular products of LB 931. For all additives in combination with the
15 extracellular product of LB931, a very good growth inhibiting effect was achieved. The best effect was achieved when propionic acid was added to the extracellular product of LB931 (no growth at all).

Test 2

- 20 The purpose of these tests was to determine whether selected additives affect the growth of bacteria and if an improved growth inhibition can be achieved when they are added to the extracellular products of *Lactobacillus plantarum*, LB 931. The additives used in this test were sodium acetate, succinic acid, sodium propionate, acetic acid.

25 Method

Bacterial strains

Clinical isolates of *E. coli* (designated *E. coli* 1) and *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus* 1) were used as test strains. They were isolated from the genital tract in women with urinary tract infections.

30

Control

As a control pure dM17s broth (M17 broth modified by addition of MnSO_4 (final conc. 0,04 g/l), MgSO_4 (final conc. 0,2 g/l) and glucose (final conc. 20 g/l) was used. 200 μl was added to 96-wells micro titre plates.

35

Extracellular product (ECP)

Cultures of LB 931 grown in dM17s broth were centrifuged to pellet the cells and sterile filtered using a 0,22µm filter (Millipore filter, Bedford, USA) in order to obtain the LB 931 supernatant comprising the LB 931 extracellular product. 200µl were transferred to 96-wells micro titre plates.

Extracellular product with additive

The additives were added to a final concentration of 50mM to tubes containing the sterile filtered suspension of LB 931. 200µl was transferred to 96-wells micro titre plates.

Broth with additive

The additives were added to a final concentration of 50mM in dM17s broth. 200µl were added to 96-wells micro titre plates.

10µl of an over-night culture of *E.coli* resp. *S. saprophyticus*, both diluted 100x, were added to the wells in the micro titre plate which was incubated in 37° C over night.

pH was adjusted to 6,9 in all trials.

The test was blinded so that there could be no preconceived opinions colouring the results. The inhibition of *E. coli* resp. *S. saprophyticus* was evaluated and graduated, by two persons using a template, on a scale from five to zero based on visual observations of turbidity with a calculated mean value being presented. Wells containing strong growth of *E. coli* resp. *S. saprophyticus* in pure dM17s-broth was graduated as five, while wells with no visual growth were graduated as zero.

Results

As can be seen in Fig. 2A none of the tested additives alone proved to have an effect on the growth of *E. coli*. The extracellular product of LB 931 was effective in the inhibition of *E. coli*. This effect was surprisingly enhanced by the addition of the additives to the extracellular products of LB 931. For all additives in combination with the extracellular product of LB931, a very good growth inhibiting effect was achieved.

As can be seen in Fig. 2B none of the tested additives alone proved to have an effect on the growth of *Staphylococcus saprophyticus*. The extracellular product of LB 931 was effective in the inhibition of *Staphylococcus saprophyticus*. This effect was surprisingly enhanced by the addition of the additives to the extracellular products of LB 931. For all additives in

combination with the extracellular product of LB 931, a very good growth inhibiting effect was achieved.

Test 3

- 5 The purpose of this test was to evaluate the enhanced inhibition of *Candida albicans* when extracellular product of the *Lactobacillus fermentum* Ess-1 was combined with the additives ascorbic acid or propionic acid.

Method

- 10 Ess-1 was grown to stationary phase in dMRSs broth (MRS broth without addition of sodium acetate). The bacterial culture was centrifuged to pellet the cells and sterile filtered using a 0,22µm filter (Millipore filter, Bedford, USA) whereupon the supernatant comprising the extracellular product was obtained. Propionic acid and ascorbic acid were added to a final concentration of 50mM to tubes containing the extracellular product. The filtrate was pH
15 adjusted to the pKa-value for respective acid (4,2 for ascorbic acid and 4,87 for propionic acid) and 200µl were transferred to wells of a 96-wells micro titre plate. *C. albicans* was added to a final concentration of $\sim 5 \times 10^4$ CFU ml⁻¹ to each wells. The plates were incubated for 20 hours at 37° C and the growth was evaluated and graduated, by two persons using a template, on a scale from five to zero based on visual observations of turbidity with a
20 calculated mean value being presented. Wells containing strong growth of *Candida* in pure dMRSs-broth was graduated as five, while wells with no visual growth were graduated as zero.

Results

- An unexpected increased inhibition was obtained when the supernatant from Ess-1 was
25 combined with either ascorbic acid or propionic acid as can be seen in Fig. 3A and 3B respectively.

Test 4

- The purpose of this test was to evaluate the enhanced *Candida* inhibition from Na-acetate in
30 combination with growing cells of *Lactobacillus plantarum* LB 931.

Method

- Two plates were made with M17 agar and two with MRS agar. MRS medium (developed by De Man, Rogosa and Sharpe), is a growth medium commonly used for *Lactobacillus*. MRS
35 agar from Merck contains 5 g sodium acetate per litre agar. M17 (Oxoid) is a similar

29

commercial substrate for *Lactobacillus* but without the addition of sodium acetate. The agars were prepared as described on the packages.

Lactobacillus plantarum LB931 was cultivated in MRS broth in 37°C with 5 % CO₂ for 24 hours. *Candida albicans* 702 was cultivated in M17 broth at 37°C for 24 hours.

Holes (Ø 10 mm) were punched in the plates and filled with 250µl plugs of agar mixtures containing ~10⁷ LB 931 in MRS agar). The plates were left for 30 minutes and then incubated 24 hours at 37°C with 5 % CO₂. Overnight culture of *C. albicans* in M17 broth was diluted 10 times and 100µl was spread on the surface of each plate. The plates were then incubated for 24 hours at 37°C. As controls, holes (Ø 10mm) were filled with only MRS agar.

The plates were evaluated in respect to *Candida* growth inhibition. Zones around the plugs with no growth of *Candida* were measured (Ø mm).

Results

The sizes of the zones can be seen in Table 1

Table 1:

Agar in the Petri dish	Plug with only agar (Ø mm)	Plug with LB931 (Ø mm)
MRS agar	0	18.8
M17 agar	0	0
MRS agar	0	18.1
M17 agar	0	0

LB 931 grew well in all plugs where LB 931 had been inoculated. There were no zones without growth of *Candida* on the plates with M17 agar. On the MRS agar plates there were clear zones around the LB 931 plugs but no zones around the plugs with only agar.

LB 931 was applied in quite low amounts to the plates, which may explain why substantially no inhibition of *Candida* was seen on the M17 agar plates. This however indicates the efficient inhibition of *Candida* due to the synergistic effect of LB 931 and the additive, in this case sodium acetate comprised in the MRS medium.

EXAMPLES

The following examples related to this invention are illustrative and should not, of course, be construed as specifically limiting the invention.

5

Example 1: Isolation and typing of Ess-1

The initial purpose of this study is to isolate and type a *Lactobacillus* strain that inhibit the growth of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to a large extent compared to other *Lactobacillus* strains.

10

*Method***Yeast strains**

Clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata* were used as test strains. These were isolated from the vagina of women with vaginal candidiasis and from healthy females.

15

Screening I.

About 140 *Lactobacillus* strains, originating from human skin, throat, teeth, baby faeces, vegetables and seeds were cultured in MRS broth and stamped onto MRS agar plates. The agar plates were incubated under anaerobic conditions at 37°C. Additionally, SAB (Sabouraud) agar (LAB M, Bury, UK) was poured onto the MRS agar and was allowed to congeal. *C. albicans* culture was seeded onto the agar and the plates were incubated aerobically at 37°C. A visual evaluation of the inhibition was done. Strains inhibiting *C. albicans* equally or to a greater extent than the reference strain *Lactobacillus plantarum* LB931 were selected for further screening (screening II).

25

Screening II.

Suspensions of lactobacilli grown in dMRSs broth (MRS broth without addition of sodium acetate) were centrifuged and sterile filtered. The filtrate is henceforth called *Lactobacillus* Cell-free Filtrate, LCF. A specified volume was transferred to wells of a micro titre plate and was let to air dry and thereafter resuspended in sterile distilled water to a concentration three times higher and transferred to 96-wells micro titre plates. *Candida* was added to all vials (three isolates of *C. albicans* and *C. glabrata*, respectively, were used). The inhibition was evaluated by visual observation of turbidity and graduated by two persons using a template on a scale from five to zero. The wells containing strong growth of *Candida* sp. in pure dMRSs-broth was graduated as five, while wells with no visual growth were graduated as zero.

35

API typing and genetic typing

Identification to the species level was done using the API 50 CHL system (bioMérieux, France), following the manufacturer's instructions. Data from the fermentation tests were analysed using API Lab Plus software. Genetic typing was done by DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) by partial sequence analysis of the 16S rRNA.

Results

All strains were evaluated according to the growth inhibition capacity against *C. albicans* in screening I. 23 *Lactobacillus* strains with results comparable or exceeding the one for LB931 were selected for screening II. Out of those 23 *Lactobacillus* strains, three were reference strains and a majority of the strains had been isolated from the oral tract.

Ess-1 proved to have a comprehensive capacity to inhibit growth of *Candida*. No one of the tested *Lactobacillus* strains was similar to the activity of Ess-1 regarding the effect on both *C. albicans* and *C. glabrata*. The carbohydrate fermentation pattern and the genetic typing for Ess-1 showed that it belongs to the *Lactobacillus fermentum* species.

Characterization of Ess-1

16S rDNA from strain Ess-1 (DSM 17851) was analysed by DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) by direct sequencing of about 450 nucleotides of PCR-amplified 16S rDNA. Genomic DNA extraction, PCR mediated amplification of the 16S rDNA and purification of the PCR product was carried out as previously described (Rainey, F.A. *et al.* Int. J. Sys. Bacteriol. 1996(46):1088-1092). Purified PCR products were sequenced using the CEQTMDTCS-Quickstart Kit (Beckman Coulter) following the manufacturers instructions. Sequence reaction products were electrophoresed using the CEQTM8000 Genetic Analysis System.

The resulting sequence data was put into the alignment editor ae2 (Maidak, B.L. *et al.* Nucl. Acids Res. 1999(27):171-173), aligned manually and compared with representative 16S rRNA gene sequences of organism belonging to the *Firmicutes* (Maidak, B.L. *et al.*). For comparison 16S rRNA sequences were obtained from the EMBL data base or RDP (Maidak, B.L. *et al.*).

As a result of this analysis the following table 2 lists those organisms, whose 16S rRNA gene sequences show the highest similarity values compared to the 16S rDNA sequence of Ess-1.

32

Table 2

Strain	% 16S rRNA gene sequence similarity to Ess-1
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	99.3
<i>Lactobacillus fermentum</i> KRM	99.0
<i>Lactobacillus malefermentans</i> DSM 5705	85.5
<i>Lactobacillus rossiae</i> ATCC BAA-822	88.9
<i>Lactobacillus suebicus</i> DSM 5007	86.9
<i>Lactobacillus vaccinosfercus</i> DSM 20634	87.2

5 The partial 16S rDNA gene sequence of strain Ess-1 shows highest similarity to *Lactobacillus fermentum*. Consequently strain Ess-1 may represent a strain of *Lactobacillus fermentum*, but may as well represent a new species within the genus *Lactobacillus*.

10 **Example 2: Production of Probiotic Lactobacillus.**

In laboratory scale: a sterile vessel with ex. MRS broth is inoculated with a pure inoculate of the desired lactobacillus strain. Broth with bacteria is incubated over night in 37 C° and preferably with an atmosphere of 5% CO₂. Cells may then be washed using centrifugation and sterile saline. Protective sugar, starch or proteins may be added and the cell-mass
15 freeze-dried and milled.

In production scale, the working seed lot is fermented in different steps up to production scale. The production is controlled and optimised for the specific strain to be produced. After fermentation the culture is washed and/or only concentrated using cross-flow microfiltration
20 or centrifugation. Protective substances according to the above are added and the cells can be freeze-dried and milled or spray-dried.

Example 3: Production of extracellular product from e.g. Lactobacillus

In laboratory scale the overnight culture of the probiotic strain is produced as in Example 2.
25 After filtration or centrifugation the supernatant is collected. The supernatant may be concentrated by evaporation or completely dried for ex. convective drying in dry air, freeze, drying or spray-drying.

In production scale the bacterial culture is fermented in accordance with Example 2. The extracellular product is obtained as a filtrate using cross-flow micro filtration or a supernatant using centrifugation. Also in this case it may be further concentrated using evaporation or completely dry using for eg. spray-drying.

5

Example 3: Formulations

Hygiene tissue for improved genital hygiene

Overnight cultures of LB931 and Ess-1 cells with extracellular products in the form of supernatants from both Ess-1 and LB931 were mixed with acetic acid to a final concentration of 50mM. pH was adjusted to 4,9. The mixture was freeze dried with trehalose and grounded until a powder of fine grains was formed. 10 grams of the powder was added to 120 ml olive oil (Filippo BERIO extra virgin olive oil) and shaken until a homogenous solution was formed. An additional aliquot of 80 ml of olive oil was added and the resulting 200ml solution was vortexed for ca 2 min. The bacterial suspension was kept at room temperature for 3 hours, with mixing twice an hour. Tissue sheets (Spun Lace Dupont) were cut to 6x8 cm squares and placed in sterile stainless steel trays. On each tissue sheet, 4 ml of bacterial suspension was dropped over the tissue to cover it. The tissue sheet was folded in the middle, then from the long side to the middle again and packed in foil bags, which edges were welded.

It should be noted that even if all three examples on formulations only comprise *Lactobacillus plantarum* LB 931 and/or *Lactobacillus fermentum* Ess-1 as probiotic bacteria, all probiotic bacteria suitable for the present invention as previously described may as well be used.

WO 2008/060199
Applicant's or agent's
file reference PD53842PC00

international application no.

PCT/SE2006/001312

34

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 8, line 34-37	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depositary institution Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Address of depositary institution (including postal code and country) Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig Germany	
Date of deposit 2006-01-06	Accession Number DSM 17851
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
Receipt in the case of an original deposit (copy enclosed with Request form) Viability statement (copy enclosed with Request form)	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit") Statement that the depositor has authorized the Applicant to refer to the deposited biological material in the application and has given his unreserved and irrevocable consent to the deposited material being made available to the public in accordance with Rule 28(1)(d) of the European Patent Convention (EPC).	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
☒ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer  Riitta Vartiainen	Authorized officer

35

CLAIMS

- 5 1. A hygiene tissue (1) such as a wet wipe, dry wipe, washcloth, patch, towlette, napkin, and the like comprising a microbe-inhibiting composition (8), said microbe-inhibiting composition (8) comprising an extracellular product of at least one probiotic bacterium and at least one additive in the form of an organic acid, having a pKa value not exceeding 5.5, and/or a salt thereof.
- 10 2. A hygiene tissue according to claim 1, wherein said pKa value does not exceed 5.
3. The hygiene tissue according to any of claims 1 or 2, wherein said extracellular product is in the form of a supernatant, obtained by filtration or centrifugation of a culture of a probiotic bacterium.
- 15 4. The hygiene tissue according to any of claims 1 - 3, wherein said microbe-inhibiting composition (8) is substantially free from lactic acid producing bacteria, preferably not present in an amount higher than 100 CFU/ml and more preferably not higher than 10 CFU/ml.
- 20 5. The hygiene tissue according to any of claims 1-4, wherein said microbe-inhibiting composition (8) further comprises a probiotic bacterium.
- 25 6. The hygiene tissue according to any of claims 1-5, wherein said probiotic bacterium is a lactic acid producing bacterium.
7. The hygiene tissue according to claims 6, wherein the lactic acid producing bacteria is *Lactobacillus plantarum* LB 931 or *Lactobacillus fermentum* Ess-1 or a combination thereof.
- 30 8. The hygiene tissue of claims 1 to 7, wherein said additive is chosen from acetic acid, propionic acid, lactic acid, ascorbic acid, phenylalanine, citric acid, butyric acid, valeric acid, capronic acid, succinic acid and/or a salt thereof, preferably said additive is chosen from acetic acid, propionic acid, lactic acid, ascorbic acid, phenylalanine, citric acid or succinic acid, and/or a salt thereof, most preferably said additive is
- 35 chosen from ascorbic acid, acetic acid, propionic acid, succinic acid and/or a salt thereof.

36

9. The hygiene tissue according to claim 8, wherein said salt is a sodium salt; preferably sodium propionate or sodium acetate.
- 5 10. A kit comprising the microbe-inhibiting composition (8) as defined in any of the preceding claims and said hygiene tissue (1), said microbe-inhibiting composition (8) being provided in an ampoule, a bottle, a tube, a roll-on device, as a stick or a spray.
- 10 11. A kit comprising the hygiene tissue according as defined in the preceding claims and an absorbent article, such as a sanitary napkin, a panty liner, an incontinence protector, a diaper, an incontinence pad, a feminine insert, a tampon, or the like.
- 15 12. Use of the microbe-inhibiting composition according to any of claims 1-9 in combination with a hygiene tissue (1).
13. Method of preparing a hygiene tissue according to any of claims 1-9, comprising applying said microbe-inhibiting composition (8) to said hygiene tissue (1).

37

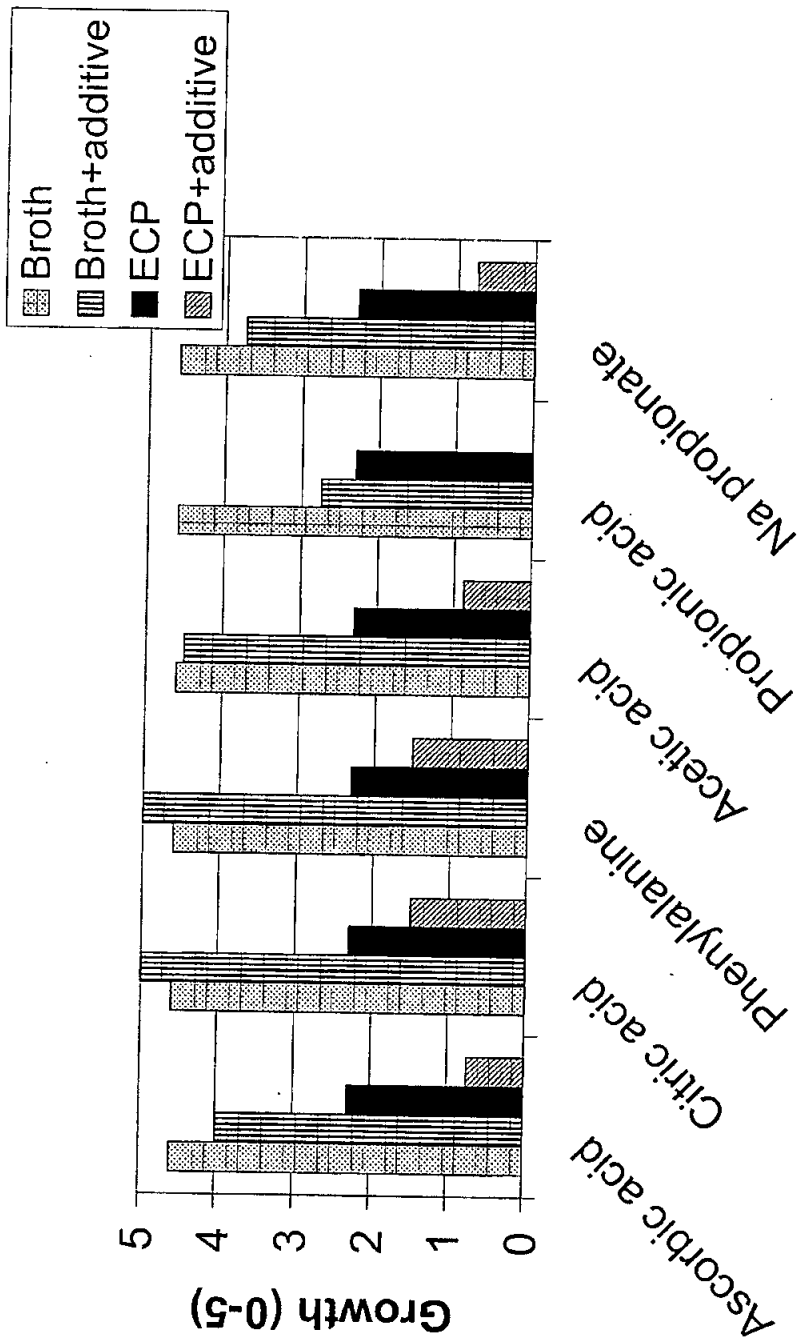


Fig.1

36

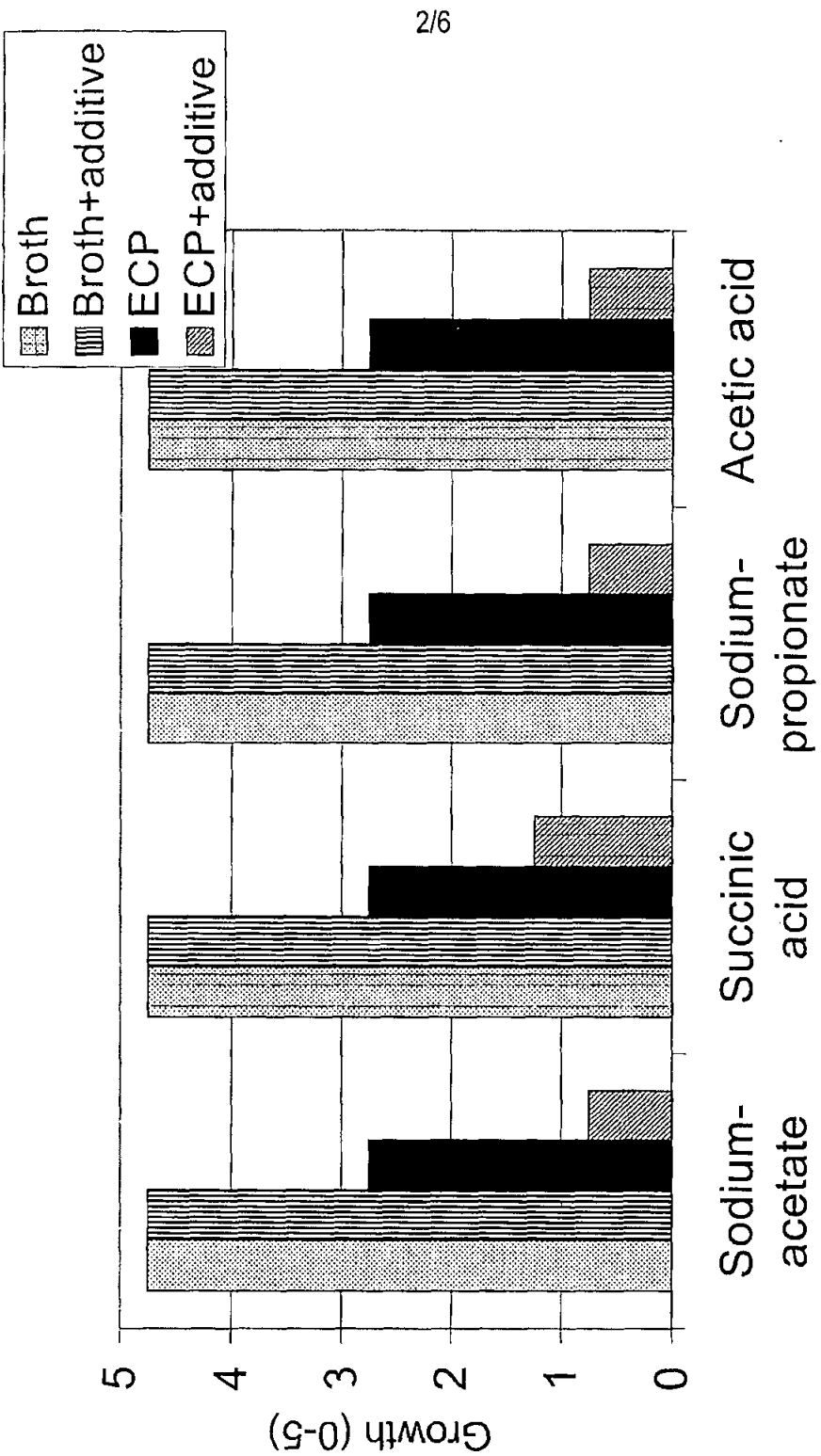


Fig.2A

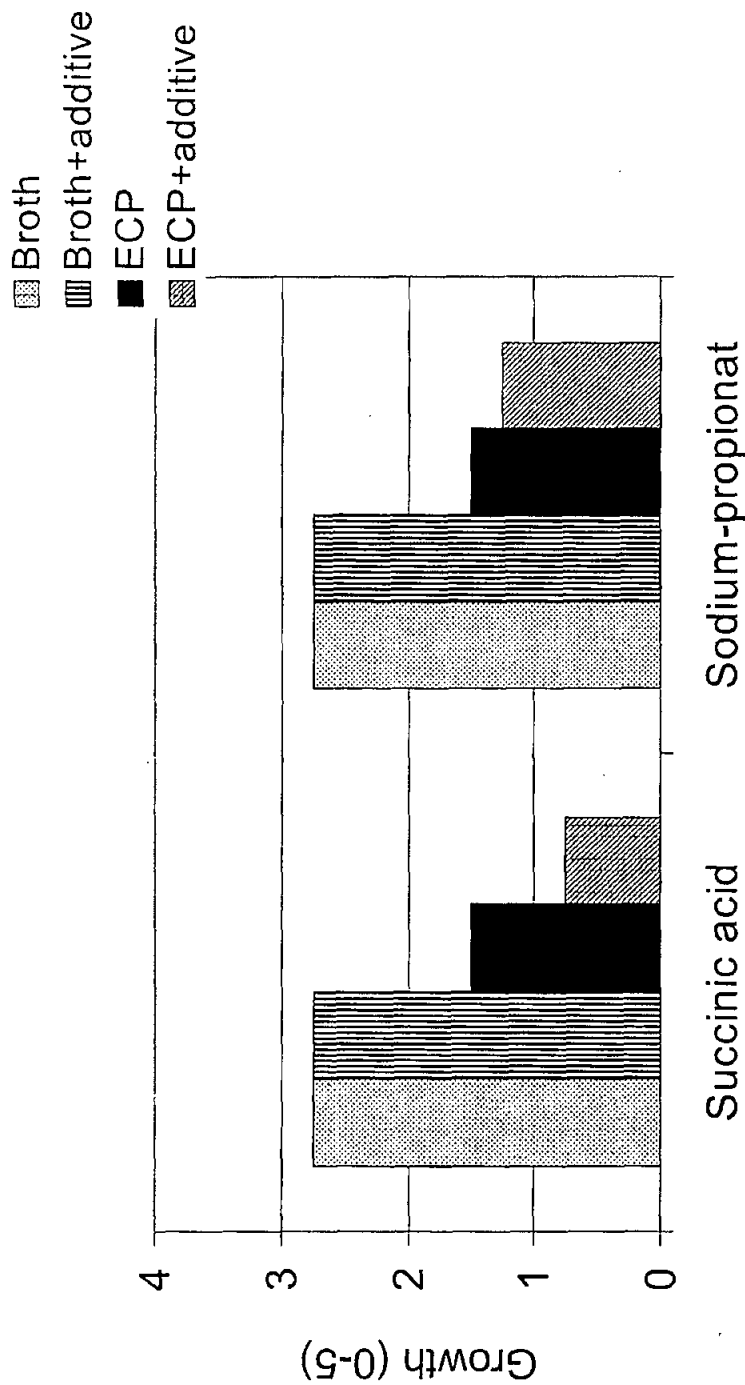


Fig.2B

40

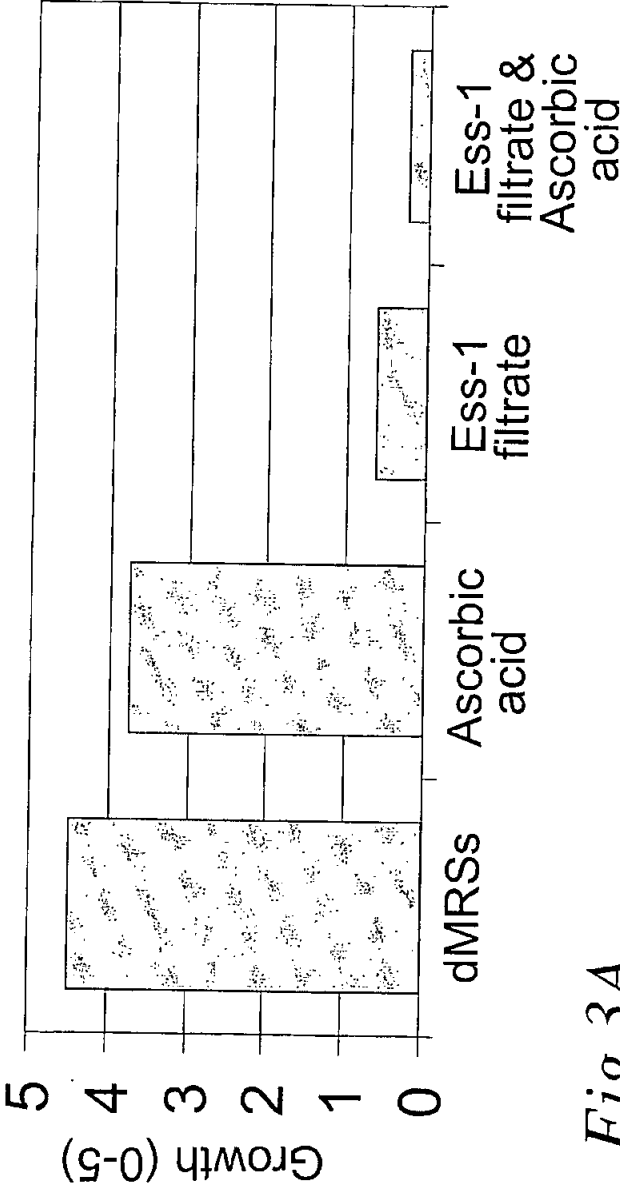


Fig. 3A

Δ1

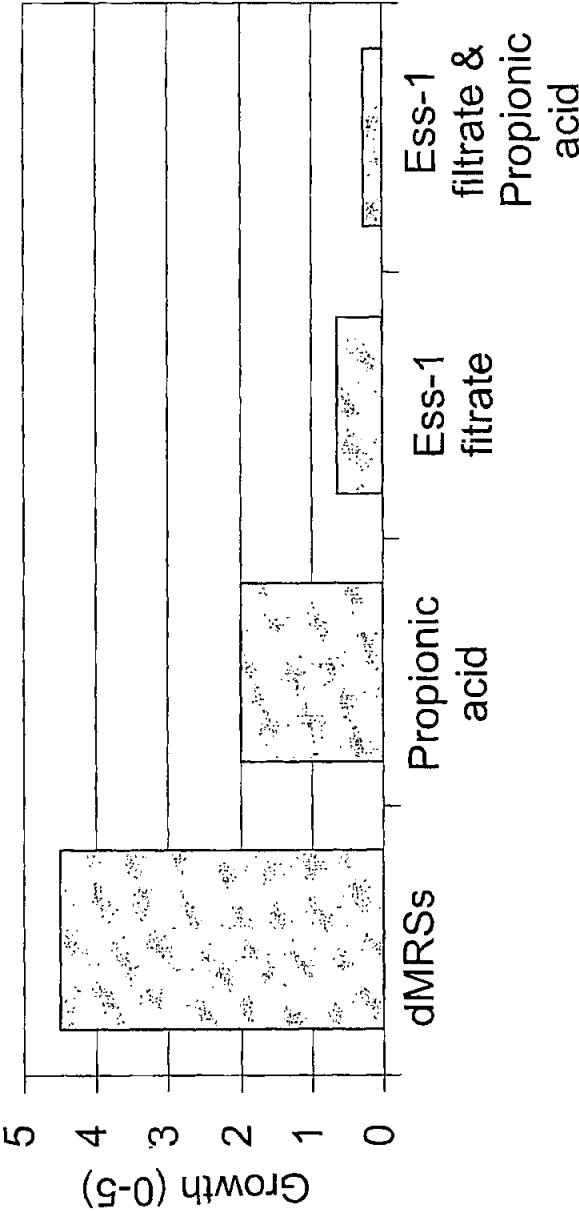


Fig.3B

42

6/6

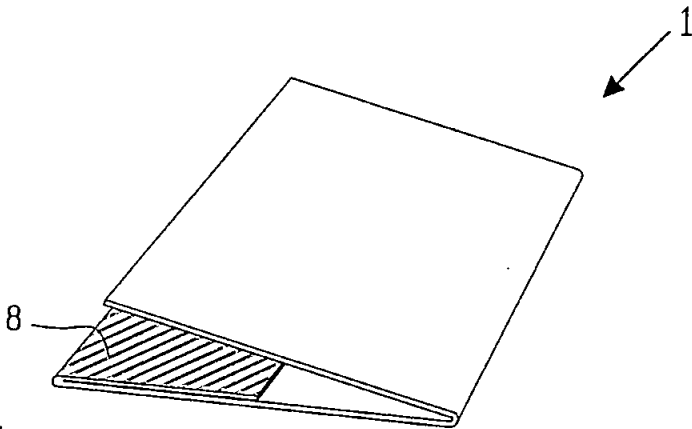


Fig. 4

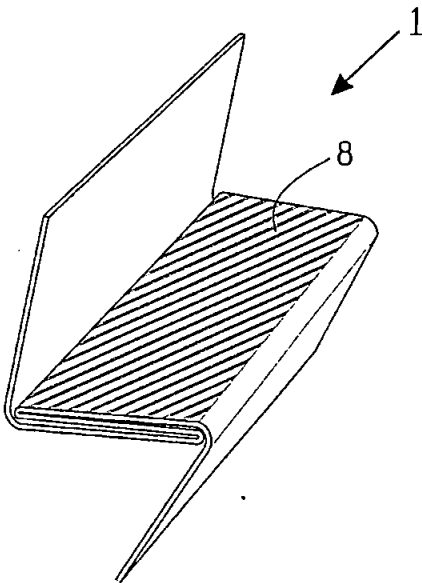


Fig. 5

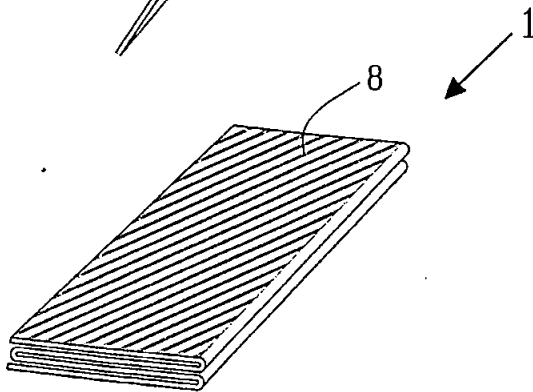


Fig. 6

40

TISÚ PARA HIGIENE QUE COMPRENDE UNA COMPOSICIÓN INHIBIDORA
DE MICROBIOS

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con un tisú para higiene, tal como un trapo húmedo, un trapo seco, un paño para lavar, un parche, una toallita, una servilleta o similares, que comprenden por lo menos un producto extracelular de por lo menos una bacteria prebiótica y por lo menos uno de los aditivos seleccionados dando un
10 efecto inhibitorio sinérgico sobre el *Candida albicans* u otros microorganismos no deseados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El área urogenital cosecha un ecosistema microbiano complejo que comprende más de 50 especies bacterianas diferentes (Hill et al., Scand. J. Urol. Nephrol. 1984;86 (suppl.) 23-29). Las especies dominantes para las mujeres fértiles en esta área son el ácido láctico producido por bacterias que pertenecen al género *Lactobacillus*. Estos miembros productores de ácido láctico son importantes para
20 retener una flora microbiana saludable en estas áreas, y actuar como bacterias prebióticas con un efecto antagonístico contra especies microbianas patógenas. Las bacterias productoras de ácido láctico inhiben el crecimiento y la colonización de otros microorganismos mediante ocupar nichos adecuados para colonización, mediante formar biopelículas y competir por los nutrientes disponibles, excluyendo
25 así la colonización por microorganismos dañinos. También, la producción de peroxide de hidrógeno, que inhibe específicamente sustancias, tales como bacteriocinas, y ácidos orgánicos (incluyendo el ácido láctico y el ácido acético)

24

que baja el pH, inhibe el crecimiento y la colonización por otros organismos.

El ecosistema microbiano de un individuo sano puede ser dañado por el uso de antibióticos, durante cambios hormonales, tal como durante la preñes o el uso de
5 contraceptivos con estrógeno, durante la menstruación, después de la menopausia, en gente que sufre de diabetes etc. también, los microorganismos se pueden esparcirse desde el ano hasta el área urogenital, lo que resulta en un daño en la flora microbiana normal y deja al individuo susceptible a infecciones microbiana tal como vaginitis, infecciones por *Candida*, infecciones del tracto
10 urinario e infecciones de la piel. Los microorganismos comúnmente asociados con estas clases de infecciones pertenecen al género *Escherichia*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Gardnerella* y *Candida*. Las mujeres están en un riesgo particular debido a su distancia más corta entre el ano y el tracto urogenital; especialmente en riesgo están las mujeres
15 jóvenes, quienes todavía no han desarrollado bien la microflora en el área urogenital y las mujeres de más edad quienes en la mayoría de los casos ya no tienen una flora protectora.

Similarmente al área urogenital, la piel es colonizada por un arreglo de
20 organismos, que forman su flora normal. Los números e identidades de los organismos varían entre diferentes sitios de la piel. Esto, junto con la barrera estructural de la piel, suministra al huésped con una excelente defensa contra microbios invasores. El número de bacterias sobre la piel varía desde unos pocos cientos por cm² en las superficies áridas del antebrazo y la espalda, a decenas de
25 miles por cm² en las áreas húmedas tales como las axilas y las ingles. Esta flora normal juega un papel importante para prevenir organismos contra la colonización por organismos extraños en la piel, pero necesita mantenerse verificada, para

poder evitar infecciones de la piel.

El *Staphylococcus aureus* es la causa más común de infecciones de la piel menores, tales como forúnculos o abscesos, lo mismo que infecciones de las
5 heridas post-operativas más serias. El tratamiento involucra el drenaje y esto es usualmente suficiente para tener lecciones menores, pero los antibióticos se pueden administrar en adición cuando la infección es severa y el paciente tiene fiebre.

10 El síndrome de choque *Tóxico* es una infección sistémica causada por cepas *S. aureus* que produce toxinas del síndrome de choque *tóxico*. La enfermedad vino a ser prominente mediante su asociación con el uso de tampones por mujeres saludables, pero no está confinado a mujeres y puede ocurrir como resultado de la infección con *S. aureus* en sitios no genitales.

15

Otras infecciones comunes de la piel son causadas por el *Streptococcus pyogenes* (grupo A de estreptococcus). Los organismos son adquiridos mediante el contacto con otra gente que tiene lecciones de la piel infectadas y puede colonizarse primero y multiplicarse sobre piel normal antes de invadir mediante rupturas
20 menores del epitelio y el desarrollo de lecciones.

El tratamiento con penicilina o eritromicina puede ser necesario para combatir la infección.

25 *Candida* le gusta sitios de la piel que son húmedos y calientes y también coloniza rápidamente piel dañada. Así, la sequedad relativa en la mayor parte de las áreas de la piel impide el crecimiento de *Candida*, lo que por lo tanto se encuentra en

números bajos en piel sana. *Candida* también coloniza la mucosa oral o vaginal y el sobre crecimiento puede resultar en enfermedad en estos sitios. *C.albicans* se asocia con la dermatitis de pañal. Un estudios ha mostrado que las lecciones inducidas por *C. albicans* son influenciadas notablemente por el pH, una piel con
5 pH menor o más bajo da menos lecciones (B. Runeman.Acta Derm Venereol 2000 ; 80: 421-424) .

Una manera para reducir los problemas con la clase de infecciones descritas anteriormente es tener una Buena higiene personal. Sin embargo, el uso excesivo
10 de agentes de limpieza no solamente disminuye la cantidad de microbios dañinos, sino que puede dañar la flora microbiana benéfica, convirtiéndola nuevamente en susceptible a especies patogénicas que colonizan y causan las infecciones. Alternativamente, la administración de bacterias que producen ácido láctico al área urogenital y la piel, para poder competir con las especies patogénicas y facilitar el
15 restablecimiento y el mantenimiento de una flora microbiana benéfica en estas áreas, se ha encontrado que es un medio exitoso para tratar y prevenir infecciones microbianas.

Se ha sugerido que las bacterias productoras de ácido láctico pueden ser
20 suministradas por vía de productos absorbentes, tales como pañales, toallas sanitarias, guardas de incontinencia, repuestos de pantaloncitos y tampones, como se describe por ejemplo en WO 92/13577, WO 97/02846, WO 99/17813, WO 99/45099 y WO 00/35502. Sin embargo, los artículos absorbentes pueden no siempre ser una vía de administración óptima, ya que portar un artículo
25 absorbente frecuentemente se ha entendido como no cómodo o incomodo, indiscreto y caliente. Esta vía de administración también puede ser inconveniente para la administración repetida de bacterias que producen ácido láctico

287

frecuentemente necesario para retener la eficacia del tratamiento o el efecto de prevención. También, estos productos no pueden ser usados para suministrar las bacterias a otras regiones del cuerpo diferentes al área urogenital. Por lo tanto, para algunas aplicaciones puede ser más conveniente administrar bacterias productoras de ácido láctico mediante otros medios distintos a los productos absorbentes. Un segundo problema con la administración de bacterias productoras de ácido láctico por vía de artículos adsorbente se relaciona con la fabricación de tales productos, ya que todas las variantes y tamaños posibles del producto tienen que ser suministrada con la bacteria. Por lo tanto la administración mediante un producto que pudiera ser usado sin ajustes individuales podría suministrar una ventaja de fabricación sobre los productos absorbentes.

También se ha sugerido el suministrar bacterias productoras de ácido láctico mediante tisú para higiene que permite tanto la limpieza y el cuidado de la piel y el área urogenital y suministrar bacterias productoras de ácido láctico prebiótico, por ejemplo en la WO 04/060416.

Un problema principal con suministrar productos propuestos para ser usados mediante transferir las bacterias productoras de ácido láctico, es que las bacterias tienden a retener la viabilidad durante el transporte y el almacenamiento de los productos. Las bacterias productoras de ácido láctico pierden rápidamente su viabilidad bajo condiciones semihúmedas y por lo tanto es importante que las bacterias no estén expuestas a humedad durante el almacenamiento. Una manera de solucionar parcialmente este problema en productos adsorbentes provistos con bacterias productoras de ácido láctico ha sido suministrar los productos con las bacterias, secar dichos productos para remover la mayor cantidad de humedad en ellos y suministrar el producto en empaque impermeables a la humedad

(W099/17813).

La WO 00/61201 describe un producto sanitario que contienen una cantidad efectiva de una bacteria viable, no patogénica, prebiótica, tal como *Bacillus* coagulans, o un producto extracelular del mismo.

La EP 1140226 describe la combinación de una sustancia reguladora del pH en la forma de un material superabsorbente parcialmente neutralizado con bacterias productoras de ácido láctico.

En vista de la técnica anterior existen todavía una necesidad de tener tisúes higiénicos con un efecto prebiótico y/o probiótico mejorado, dichos tisúes higiénicos son fáciles de almacenar y de transportar.

15 RESUMEN DE LA INVENCION

En vista del arte previo es un objeto de la presente invención suministrar un tisú higiénico que comprende una composición inhibitoria de microbios con un efecto mejorado. También es un objeto de la presente invención que dicho tisú higiénico comprenda una composición inhibidora de microbios fácilmente transportada y almacenada sin que la composición inhibitoria de microbios pierda su balance micro-flora y su función promotora de la salud.

Los problemas anteriormente definidos son resueltos por la presente invención mediante un tisú higiénico tal como un trapo húmedo, un trapo seco, un paño para lavar, un parche, una toallita, una servilleta, y similares que comprende una composición inhibitoria de microbios que comprende un producto extracelular de

por lo menos una bacteria probiótica y por lo menos un aditivo en la forma de un ácido orgánico, que tiene un valor pKa que no excede 5.5, y/o una sal de este, que da un efecto prebiótico sinérgico.

- 5 En un aspecto dicho valor pKa no excede de 5.

De acuerdo con la presente invención dicho producto extracelular inhibidor de microbios es un sobrenadante obtenido por la filtración o centrifugación de un cultivo o una bacteria probiótica.

10

En una modalidad dicha composición inhibidora de microbios es sustancialmente libre de bacterias probióticas, las bacterias probióticas preferiblemente no están presentes en una cantidad mayor a 100 CFU/ml y más preferiblemente no mayor a 10 CFU/ml.

15

En una modalidad de la invención dicha composición inhibidora de microbios comprende por lo menos una bacteria probiótica, un producto extracelular de por lo menos una bacteria probiótica y por lo menos uno de dichos aditivos.

- 20 En un aspecto de la invención la bacteria probiótica es una bacteria productora de ácido láctico.

En un aspecto adicional de la invención la bacteria productora de ácido láctico es *Lactobacillus plantarium* LB 931. En otro aspecto de la invención la bacteria productora de ácido láctico es *Lactobacillus fermentum* Ess-1. En un aspecto adicional de la invención la bacteria productora de ácido láctico es una combinación de *Lactobacillus plantarum* LB 931 y *Lactobacillus fermentum* Ess-1.

25

30

En un aspecto de la invención dicho aditivo se escoge entre ácido acético; ácido, propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, ácido fenilalanina, ácido cítrico, ácido, butírico, ácido valérico, ácido caprónico, ácido succínico, y/o una sal de estos.

- 5 Preferiblemente dicho aditivo se escoge de ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, fenilalanina, ácido cítrico o ácido succínico, ácido ascórbico, y/o una sal de estos. Más preferiblemente dicho aditivo se escoge entre ácido ascórbico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico y/o una sal de estos.

- 10 En otro aspecto de la invención dicha sale es una sal de sodio; preferiblemente propionato de sodio o acetato de sodio.

- Ya que la composición inhibidora de microbios de la invención que combina un extracelular de una bacteria probiótica y un aditivo da un efecto sinérgico no
15 esperado en la inhibición de microorganismos patogénicos, un tisú higiénico de acuerdo con la invención que comprende esta composición inhibidora de microbios tiene un efecto prebiótico mejorado. Adicionalmente un tisú higiénico de la presente invención es fácil de transportar y almacenar sin que la composición inhibidora de microbios pierda sus propiedades benéficas.

20

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1. muestra el crecimiento de *C. albicans* en productos extracelular de LB 931 con la adición (50mM) de diferentes ácidos/sales.

25

La Fig. 2a. muestra el crecimiento de *E.coli* en un producto extracelular de LB 931 con la adición (50mM) de diferentes ácidos/sales.

La Fig. 2b. muestra el crecimiento de *S. Saprophyticus* en el producto extracelular de LB 931 con la adición (50mM) de diferentes ácidos/sales.

- 5 La Fig. 3a. muestra el crecimiento de *Candida albicans* cuando el producto extracelular del *Lactobacillus fermentum* Ess-1 fue combinado con el aditivo de ácido ascórbico.

- 10 La Fig. 3b. muestra el crecimiento de *Candida albicans* cuando el producto extracelular del *Lactobacillus fermentum* Ess-1 fue combinado con el aditivo de ácido propiónico.

Las Figs. 4-6 muestran vistas en perspectiva de tisú higiénicos de acuerdo con la presente invención.

15

DEFINICIÓN

- Probióticos/probiótico en el presente contexto se relaciona con microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud cuando son administrados en
20 cantidades adecuadas a un anfitrión.

- Por bacteria productora de ácido láctico se quiere decir una bacteria que produce al ácido láctico. La bacteria que produce ácido láctico preferido para el objeto de la presente invención incluye bacterias del género *Lactobacillus*, *Lactococcus* y
25 *Pediococcus*. Preferiblemente la bacteria seleccionada usada es de las especies *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* o *Lactobacillus plantarum*. Más preferiblemente la cepa

bacteriana es seleccionada del *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus fermentum*.
E ven. Un más preferiblemente la bacteria productora de ácido láctico es
Lactobacillus plantarum 931 (No. de deposito (DSMZ): DSM 11918) y
Lactobacillus fermentum Ess-1 (No. de deposito (DSMZ): DSM 17851).

5

Prebióticos/prebiótico en el presente contexto se relaciona con sustancias que
promueven un microflora balanceada cuando se administra en cantidades
adecuadas a un anfitrión. Ejemplos son los nutrientes para las bacterias
probióticas, sustancias que promueven la adición al anfitrión para la bacteria
10 probiótica, sustancias que regulan el pH y productos extracelulares de las
bacterias probióticas.

Por inhibidor de microbio se quiere decir la inhibición del crecimiento, colonización
y/o supervivencia de otros microorganismos.

15

Por producto extracelular se quiere decir productos secretado en cultivos de
bacterias probióticas dichos productos extracelulares tienen un efecto
antimicrobiano. El producto extracelular es obtenido de cultivos de células
bacterianas por, por ejemplo filtradas, centrifugación, o ambos de estos, y el
20 sobrenadante resultante que comprende el producto extracelular posee actividad
antimicrobiana útil en una composición inhibidora de microbios.

Por "tisú higiénicos" se quiere decir cualquier dispositivo para limpiar, restregar y
cuidar la piel y el área urogenital que también puede ser usado para suministrar
25 una composición inhibidora de microbios a estas áreas, por ejemplo un trapo
húmedo, un trapo seco, un paño para lavar, un parche, una toallita, una servilleta,
y similares.

53

Por lípido el presente contexto se quiere decir sustancias que son insolubles en agua pero solubles en un disolvente orgánico.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Un objeto de la presente invención es suministrar tisúes higiénicos, adecuados para restregar, limpiar, y cuidar la piel y el área urogenital y simultáneamente liberar una composición inhibidora de microbios que es transferida a la piel.

10

La presente invención resuelve el problema del crecimiento, colonización y/o supervivencia de microorganismos patogénicos en el área urogenital y sobre la piel mediante usar dicho tisú higiénico. Este problema esta en la presente invención resuelto mediante aplicar una composición inhibidora de microbios que comprende un producto extracelular de por lo menos una bacteria probiótica y por lo menos un aditivo, en la forma de una ácido orgánico, que tiene un valor de pKa que no excede 5.5 y/o una sal de estos, a un tisú higiénicos.

15

Mediante combinar dicho aditivo con dicho producto extracelular un incremento sorprendentemente grande en la inhibición del *Candida albicans* y diversos otros microorganismos tales como por ejemplo *E.coli* y *S. Saprophyticus* se ha obtenido.

20

Debería notarse que por supuesto una combinación de dos o más cepas bacterianas probióticas puede ser usada para producir el producto extracelular de la invención. También es por supuesto posible usar una combinación de por lo menos dos cepas bacterianas en una composición inhibidora de microbios de la invención.

25

54

Las Figuras 4 a 6 muestran modalidades preferidas de un tisú higiénico 1 que contiene la composición inhibidora de microbios 8. El tisú higiénico 1 provisto puede estar compuesto de una matriz que comprende cualquier fibra natural o
5 sintética, tal como rayón, celulosa, celulosa regenerada, celulosa poliéster, fibras poliolefina, textil y similares, o espuma, no tejidos, fieltro o guata, o combinaciones de estos.

Se entiende que el tisú higiénico descrito anteriormente y mostrado en los dibujos
10 solamente representa ejemplos no limitativos y que la presente invención no está limitada a estos, sino que puede ser usada en cualquier tipo de tisú higiénicos como se definió anteriormente.

En una modalidad de la presente invención cuando la composición inhibidora de
15 microbio comprende dicho producto extracelular y dicho aditivo, dicha composición está sustancialmente libre de bacterias prebióticas. Debe notarse que es extremadamente difícil fabricar una composición que este totalmente libre de bacterias prebióticas, por lo tanto preferiblemente no están presente en una cantidad mayor a 100 CFU/ml y preferiblemente no mayor a 10 CFU/ml. Esta
20 composición tiene la ventaja de menos requerimientos rigurosos de almacenamiento ya que el producto extracelular es más durable que el microorganismo vivo.

En otra modalidad de la invención dicha composición inhibidora de microbios
25 comprende por lo menos una bacteria probiótica, un producto extracelular de por lo menos una bacteria probiótica y por lo menos uno de dichos aditivos. En esta modalidad cuando dicha composición inhibidora de microbio también comprende

por lo menos una bacteria probiótica el efecto es que es prebiótica y probiótica.

Las bacterias probióticas que son adecuadas para uso en la presente invención producen en la mayoría de los casos ácidos y son en todos los casos no
5 patogénicos. Hay muchas bacterias adecuadas identificadas aquí adelante, aunque la invención no está limitada a las especies bacterianas usualmente conocidas y cepas conocidas siempre que la función anterior y los objetivos de las bacterias prebióticas se cumplan.

10 Una característica importante de las bacterias productoras de ácido láctico es su capacidad para producir ácido láctico y en algunos casos otros ácidos, dichos ácidos incrementan la acidez de la mucosa de la piel lo que ayuda a prevenir el crecimiento, colonización y supervivencia de hongos y bacterias no deseados. Así, mediante el mecanismo de producción de ácido, estas bacterias probióticas
15 inhiben el crecimiento de competencia y daño de las bacterias y hongos. Características adicionales importantes de dichas bacterias es su habilidad para producir peroxide de hidrógeno y otras sustancias inhibidoras de microbios y también su habilidad para adherirse a las superficies celulares y así prevenir la adhesión de otras bacterias dañinas y hongos dañinos a estas superficies.

20

Las bacterias productoras de ácido láctico típicas útiles en una composición inhibidora de microbio de esta invención son todos los miembros de *Lactobacillus*, *Lactococcus* o *Pediococcus*, que son productores eficientes de ácidos, y también incluyen miembros no patogénicos del género *Bacillus*, todos los miembros del
25 género *Bifidobacterium*, y *Pseudomonas limbergii*, aunque ciertas especies son especialmente preferidas como se describen más adelante.

56

Los miembros preferidos del género *Lactobacillus* incluyen *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cereale*, *Lactobacillus delbrukeii*, *Lactobacillus ferment urn*, *Lactobacillus gaserii*, *Lactobacillus Jensen ii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*,
5 *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus th ermophilus*, *Lactobacillus paracasai sp.* *paracasai*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, y similares.

Particularmente se prefiere la bacteria novedosa *Lactobacillus fermentum* Ess-1 y
10 *Lactobacillus plantarum* LB 931. En la EP1060240 se encuentre previamente que la LB 931 era valiosa para prevenir y/o tratar infecciones urogenitales ya que está inhibe el crecimiento de un gran número de microorganismos patogénicos. La *Lactobacillus fermentum* Ess-1 (No. de deposito (DSMZ): DSM 17851) fue depositado de acuerdo con el tratado de Budapest en Deutsche Sammlung von
15 Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1 b, D-38124 B raunschweig) (depositor Essum AB, Box 3160, SE 90304 Umea, Suecia, depositado en Enero 6, 2006).

Debería notarse que aunque en los ejemplos que siguen en donde solamente dos
20 cepas de *Lactobacillus* han sido usadas, estas cepas bacterianas deberían solamente versen como modelos para bacterias prebióticas útiles en la práctica de la presente invención. Por lo tanto los ejemplos que siguen no deben verse como limitativos de la presente invención. Es el propósito de que cualquier especie productora de ácido láctico de bacterias probióticas ser usado en la composición.

25

El producto extracelular de la presente invención es obtenido de un cultivo bacteriano. Las bacterias adecuadas para la presente invención secretan

productos que tienen actividad antimicrobiana que es útil para los objetivos de la presente invención. Para poder obtener los productos extracelulares, los cultivos de células son cosechados como se describe adelante y el sobrenadante es obtenido mediante centrifugación o filtración o ambos. El sobrenadante así
5 obtenido tiene una actividad inhibidora de microbios debido a los productos extracelulares comprendidos allí. Un ejemplo de cómo el producto extracelular puede ser preparado se describe en el ejemplo 3.

El producto extracelular puede estar en la forma como cuando es obtenido
10 directamente de un cultivo bacteriano pero también es posible concentrar y/o purificar el sobrenadante adicionalmente. Mediante purificación se quiere decir que alguna de las sustancias inhibidoras de microbios son aisladas mediante por ejemplo cromatografía cristalización o destilación y usadas separadamente o en combinación con otras sustancias aisladas.

15

El aditivo que es agregado a las bacterias probióticas y/o al producto extracelular en la presente invención está en la forma de un ácido orgánico o de una sal de este. Cuando se escoge dicho aditivo debería por supuesto hacerse de un producto desde un punto de vista seguro. Los ácidos orgánicos o las sales
20 correspondientes deberían ser de tal naturaleza que cuando se aplican en artículos sanitarios no causen ninguna irritación a la piel del usuario del tisú higiénico, por lo tanto el pKa del ácido orgánico, cuando se mide en agua a 25 C⁰, debería preferiblemente no ser inferior a 2. Si los valores pKa en su valor son demasiados altos, los ácidos orgánicos o las sales de estos principalmente
25 estarán en su forma ácidas. Esto significa que el aditivo no será disociado suficientemente en ión-hidrógeno y su forma aniónica de desprotonizada, que se cree que es un pre-requisito para poder obtener dicho efecto inhibidor de microbio

sinérgico con la bacteria prebiótica y/o el producto extracelular de esta. Por lo tanto el valor pKa para el ácido orgánico adecuado para la presente invención debería ser inferior a 5.5, preferiblemente inferior a 5. Si el ácido orgánico adecuado para la presente invención tiene más de un valor pKa, por lo menos uno

5 de estos valores debería ser inferior a 5.5, preferiblemente inferior a 5.

Cuando el producto extracelular está en la forma de un sobrenadante, la solubilidad de estos ácidos orgánicos o sus sales correspondientes deberían estar lo suficientemente alta de modo que dicho aditivo puede ser disuelto en el

10 sobrenadante.

En una modalidad preferida de la presente invención el aditivo se escoge ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caprónico, ácido succínico y/o sales de estos.

15 Preferiblemente dicho aditivo se escoge de ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico o ácido succínico y/o sales de estos. Más preferiblemente dicho aditivo se escoge de ácido ascórbico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico y/o sales de estos.

20 En una modalidad de la invención las al es una sal de sodio. Sales especialmente preferidas son el propionato de sodio y el acetato de sodio.

El producto típicamente comprende entre 0,5-100 ml y preferiblemente contiene entre 1-10 ml de producto extracelular.

25

Dicho aditivo es típicamente agregado con una concentración final de 5 -100 mM al producto extracelular.

Si el tisú higiénico comprende adicionalmente bacterias probióticas, estas típicamente están provistas en cantidades de alrededor de 10^6 - 10^{11} CFU de bacterias probióticas viables por tisú higiénico. Típicamente las bacterias están en la forma de células o esporas que están provistas en una suspensión.

Estas cantidades pueden sin embargo variar dependiendo de la aplicación específica, la formulación del producto y el uso propuesto.

La composición inhibidora de microbios puede ser aplicada directamente al producto higiénico de acuerdo con la invención o provista en un portador farmacéuticamente aceptable que puede mejorar la transferencia de la composición inhibidora de microbios, ejemplos de tales incluyen los lípidos. Ejemplos de lípidos adecuados para presente invención incluyen los lípidos derivados de petróleo, tales como paraffinum liquidum (aceites minerales, aceites de parafina, y aceites de vaselina) petrolatum (una gel de vaselina y petróleo), cera microcristalina, ozoquerita, ceresina y parafinas. Alternativamente, lípidos sintéticos, tales como dimeticona, ciclometicona y ésteres de silicona, tales como ascetearilo de meticona pueden ser usados. Una tercera alternativa es usar lípidos derivados de animales o plantas, que usualmente son triglicéridos.

En una modalidad preferida la composición inhibidora de microbios está en la forma de una suspensión, dicha suspensión puede ser aplicada directamente al artículo sanitario mediante impregnación, rociado, impresión o similar, y después el tisú higiénico puede se secado, como por ejemplo en secado por calor.

En otra modalidad preferida la composición inhibidora de microbios está en la

forma de un polvo. El polvo puede ser mezclado dentro de dicho vehículo farmacéuticamente aceptable o ser aplicado directamente al tisú higiénico como un polvo. En el caso en donde el polvo es mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable, esta mezcla puede ser aplicada al tisú higiénico mediante impregnación, rociado, impresión o similares, y luego el tisú higiénico puede ser secado. Un dispositivo de suministro, significando un bolsillo separado ligado al tisú higiénico también es una manera posible de suministrar dicha composición inhibidora de microbios.

10 El polvo de acuerdo con lo anterior puede ser obtenido mediante evaporar la suspensión anteriormente discutida tal como por medio de secado por calor, secado convectivo, secado por rociado, secado por congelamiento, o similares. Puede ser necesario moldear adicionalmente la composición inhibidora de microbios secada para poder obtener un polvo fino. Las bacterias probióticas
15 preferiblemente se secan por congelamiento.

En una modalidad preferida el tisú higiénico puede ser un tisú higiénico seco, lo que significa que el tisú higiénico comprende la composición inhibidora de microbios como polvo o que el tisú higiénico ha sido secado después de la aplicación de la suspensión que contiene la composición inhibidora de microbios.
20 En este caso el tisú higiénico se ha propuesto que sea humectado antes del uso y la solubilidad del aditivo debería por lo tanto ser de tal naturaleza que el aditivo rápidamente se vuelve solución cuando se pone en contacto con por ejemplo agua.

25

En una modalidad adicional preferida el tisú higiénico puede ser un tisú higiénico húmedo, significando por ejemplo que el tisú higiénico es impregnado con la

anterior suspensión o con el vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende la composición inhibidora de microbios.

5 Cuando el tisú higiénico comprende bacterias probióticas vivas las bacterias deben ser protegidas de la humedad. El artículo sanitario puede por lo tanto ser guardado herméticamente en un empaque impermeable a la humedad. La WO 00/76878 da un ejemplo de tal empaque impermeable a la humedad. Otro ejemplo de cómo las bacterias pueden ser protegidas es mediante el uso de un sistema de suministro como se ejemplifico en por ejemplo la WO 02/28446.

10

La presente invención también se propone disminuir los problemas con la retención del efecto durante el almacenamiento. Ya que todo el efecto en algunas modalidades y por lo menos partes del efecto en otras modalidades vienen de una composición que no contiene sustancialmente ningún organismo viviente, el problema de mantener el microorganismo viable y por lo tanto funcional se elimina.

15

El arte previo describe artículos absorbentes que comprenden solamente bacterias probióticas o productos extracelulares de ellas. Sin embargo el efecto inhibitorio microbiano, especialmente contra Candida y la transferencia de las bacterias probióticas desde el artículo sanitario hasta el usuario, no siempre se satisface completamente, ya que hay varios problemas que se deben solucionar cuando se producen y almacenan productos sanitarios que contienen microorganismos viables.

20

25 Una manera ventajosa de suministra el tisú higiénico de acuerdo con la presente invención es por lo tanto con un kit junto con un artículo absorbente. El uso regular del artículo absorbente tiene un impacto sobre el microclima urogenital, lo que

62

lleva a un desbalance en la microflora urogenital. La adición de una composición inhibidora de microbios puede mejorar este balance. Ya que los usuarios regulares de artículos absorbentes pueden estar en un riesgo extra y ya que cambiar el artículo absorbente ocurre a intervalos de tiempos regulares esto podría ser una
5 manera efectiva de alcanzar un grupo objetivo y establecer una rutina para administrar la composición inhibidora de microbios.

Otra posibilidad es suministrar dicha composición inhibidora de microbios de manera separa en una forma que es conveniente para aplicar directamente a un
10 tisú higiénico por el usuario, por ejemplo en su forma líquida, como un polvo, disperso en una loción o disperso en aceite. El medio de suministro para dicha composición inhibidora de microbios pudiera ser un rociador, un dispositivo de bola, un tubo, una botella, una ampolla, una tira o una barrilla.

15 Todavía en otro aspecto adicional de la invención la composición inhibidora de microbios es usada en combinación con el tisú higiénico de acuerdo con la invención.

Otro aspecto de la presente invención es preparar un tisú higiénico que
20 comprende aplicar dicha composición inhibidora de microbios a dicho tisú higiénico.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

25 Ensayo 1

El propósito de este ensayo fue determinar si los aditivos seleccionados afectan el

crecimiento del *Candida albicans* y si una inhibición del crecimiento mejorada puede lograrse cuando ellos son agregados a los productos extracelulares del *Lactobacillus plantarum*, LB 931. Los aditivos usados en este ensayo fueron ácido ascórbico, ácido cítrico, fenilalanina, ácido acético, ácido propiónico y propionato de sodio.

Método

Cepa de Levadura

Un aislado clínico de *Candida albicans* (designado *C. albicans* 702) fue usado como la cepa de ensayo. Este fue aislado de la vagina de una mujer con candidiasis vaginal.

Control

Como control se uso el caldo puro de dMRS (el caldo MRS sin adición de acetato de sodio) un volumen específico fue transferido a los pozos de una placa de microtítulo y se dejó secar al aire (45°C mínimo durante 20 hrs).

Producto extracelular (E CP)

Cultivos de LB 931 crecidos en el caldo dMRS fueron centrifugados hasta formar gránulos con las células y se filtró por estéril usando un filtro de 0,22µm (Millipore filter, Bedford, USA) para poder obtener el sobrenadante LB 931 que comprende el producto extracelular LB 931. Un volumen de sobrenadante filtrado estéril fue transferido a los pozos de una placa microtítulo y se dejó secar al aire

64

(45°C mínimo de 20 hrs) y de allí en adelante se resuspendió en agua estéril y destilada a una concentración tres veces mayor y 200µl fueron transferidos a placas microtítulo de 96 pozos.

5 El producto extracelular con aditivo

Los aditivos fueron agregados a una concentración final de 50mM a los tubos que contenían el sobrenadante estéril y filtrado de LB 931. Un volumen especificado fue transferido a los pozos de una placa microtítulo y se dejó secar al aire (45°C

10 mínimo de 20 hrs) y de allí en adelante se resuspendió en agua estéril destilada a una concentración tres veces mayor (es decir el volumen del agua estéril destilada es de alrededor de un tercio del volumen especificado antes del secado al aire) y 200µl fueron transferidos a placas microtítulos de 96 pozos.

15 Caldo con aditivo

Los aditivos fueron agregados a una concentración final de 50mM en caldo dMRS. El pH fue ajustado al mismo valor de pH que el producto extracelular con aditivo para el aditivo respectivo. Un problema especificado fue transferido a los pozos de

20 una placa microtítulo y se dejó secar al aire (45°C mínimo de 20 hrs) y de allí en adelante se resuspendió en agua estéril destilada a una concentración tres veces mayor y 200µl fueron transferidos a placas microtítulos de 96 pozos.

El Candida fue agregado a una concentración final de $\sim 10^4$ células por pozo y la

25 placa microtítulo fue incubada a 37° C durante 24 hrs.

El pH para los diferentes aditivos vario entre $3,4 \pm 0,2$. El pH para el caldo con

aditivo y el producto extracelular con aditivo fue siempre el mismo.

El ensayo fue sellado de modo que no había opiniones preconcebidas que marcaran los resultados. La inhibición de *Candida* fue evaluada y graduada, por
5 dos personas usando una plantilla, en una escala entre cinco a cero con base en la observaciones visuales de turbidez con un valor medio calculado presentado. Los pozos que contenían el caldo fuerte de *Candida* en el caldo dMRS fueron graduados con cinco, mientras que los pozos con ningún crecimiento visual fueron graduados como cero.

10

Resultados

Como puede verse en la Fig. 1 muy pocos aditivos mismos probaron tener un efecto sobre el crecimiento de *Candida* aunque el pH era muy bajo. El producto
15 extracelular de LB 931 fue efectivo en la inhibición de *Candida*. Este efecto fue mejorado sorprendentemente por la adición de los aditivos a los productos extracelulares de LB 931. Para todos los aditivos en combinación con el producto extracelular de LB 931, un muy buen efecto de inhibición de crecimiento se logro. El mejor efecto se logro cuando se agrego el ácido propiónico al producto
20 extracelular de LB 931 (no hubo ningún crecimiento).

Ensayo 2

El propósito de este ensayo fue determinar si los aditivos seleccionados afectan el
25 crecimiento de la bacteria y si una inhibición de crecimiento mejorada puede lograrse cuando ellos son agregados a los productos extracelulares de *Lactobacillus plantarum*, LB 931. Los aditivos usados en este ensayo fueron

66

acetato de sodio, ácido succínico, propionato de sodio, ácido acético.

Método

5 Cepas Bacterianas

Aislados clínicos de *E. coli* (designados *E. coli* 1) y *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus* 1) fueron usados como las cepas de ensayo. Estas. Estas fueron aisladas del tracto genital en mujeres con infecciones del tracto urinario.

10

Control

Como control se uso el caldo puro de dM17 (el caldo M17 modificado por la adición de MnSO_4 (concentración final 0,04 g/l), MgSO_4 (concentración final 0,2 g/l) y glucosa (concentración final 20 g/l). 200µl fueron agregados a placas microtítulo de 96 pozos.

15

Producto Extracelular (E CP)

Cultivos de LB 931 crecieron en caldo dM17s y fueron centrifugados hasta convertir las células en gránulos y luego se filtro en estéril usando un filtro 0,22µm (Millipore filter, Bedford, USA) para poder obtener el sobrenadante LB 931 que comprende el producto extracelular LB 931. 200µl fueron transferidos a placas microtítulo de 96 pozos.

25

Producto Extracelular con aditivo

Los aditivos fueron agregados a una concentración final de 50 mM a tubos que contenían la suspensión filtrada estéril de LB 931. 200µl fueron transferidos a placas microtítulo de 96 pozos.

5 Caldo con aditivo

Los aditivos fueron agregados a una concentración final de 50mM en el caldo dM17s. 200µl fueron agregados a placas microtítulos de 96 pozos.

10 10µl de un cultivo hecho durante la noche de *E.coli* con respecto a *S. saprophyticus*, fueron diluidos en 100x, y fueron agregados a pozos en la placa microtítulo que fue incubada a 37° C durante la noche.

pH fue ajustado a 6,9 en todos los ensayos.

15

El ensayo se hizo sellado de modo que no hubo opiniones preconcebidas que matizaron los resultados. La inhibición del *E. coli* respecto del *S. saprophyticus* fue evaluada y graduada, por dos personas usando una plantilla, en una escala entre cinco a cero con base en observaciones visuales de turbidez con un valor medio
20 calculado presentado. Los pozos que contenían el caldo fuerte de *E. coli* con respecto con *S. saprophyticus* en caldo puro de dM17s fueron graduados como cinco, mientras que los pozos con ningún crecimiento visual fueron graduados como cero.

25 Resultados

Como puede verse en la Fig. 2A ninguno de los aditivos ensayados solos probaron

tener un efecto sobre el crecimiento de *E. coli*. El Producto Extracelular de LB 931 fue efectivo en la inhibición de *E. coli*. Este efecto fue mejorado sorprendentemente por la adición de los aditivos a los productos extracelulares LB 931. Para todos los aditivos en combinación con el producto extracelular de LB931, un muy buen efecto de inhibición de crecimiento fue logrado.

Como puede verse en la Fig. 2B ninguno de los aditivos ensayados solo probaron tener un efecto sobre el crecimiento del *Staphylococcus saprophyticus*. El producto extracelular de LB 931 fue efectivo en la inhibición de *Staphylococcus saprophyticus*. Este efecto fue mejorado sorprendentemente por la adición de los aditivos a los productos extracelulares de LB 931. Para todos los aditivos en combinación con el producto extracelular LB 931, un muy buen efecto de inhibición del crecimiento fue logrado.

15 Ensayo 3

El propósito de este Ensayo fue evaluar la inhibición mejorada del *Candida albicans* cuando el producto extracelular del *Lactobacillus fermentum* Ess-1 fue combinado con los aditivos ácido ascórbico o ácido propiónico.

20

Método

El Ess-1 se hizo crecer en fase estacionaria en caldo dMRS (caldo MRS sin adición de acetato de sodio). El cultivo bacteriano fue centrifugado hasta formar gránulos con las células y se filtro en estéril usando un filtro 0,22µm (Millipore filter, Bedford, USA) luego de los cual el sobrenadante que comprendía el producto extracelular fue obtenido. El ácido propiónico y el ácido ascórbico fueron

agregados a una concentración final de 50mM en tubos que contenían el producto extracelular. El filtrado fue ajustado a un pH para un valor pKa para el ácido respectivo (4,2 para el ácido ascórbico y 4,87 para el ácido propiónico) y 200µl fueron transferido a los pozos de una placa microtítulo de 96 pozos. El *C. albicans* fue agregado a una con concentración final de $\sim 5 \times 10^4$ CFU ml⁻¹ a cada uno de los pozos. Las placas fueron incubadas durante 20 horas a 37° C y el crecimiento fue evaluado y graduado, por dos personas usando una plantilla, en una escala entre cinco a cero con base en observaciones visuales de turbidez con un valor medio calculado presentado. Los pozos que contenían el caldo fuerte de Candida en caldo de dMRS puro fueron graduados como cinco, mientras que los pozos con ningún crecimiento visual fueron graduados como cero.

Resultados

Una inhibición incrementada no esperada fue obtenida cuando el sobrenadante del Ess-1 fue combinado con ácido ascórbico o ácido propiónico como puede verse en la Fig. 3A y 3B respectivamente.

Ensayo 4

El propósito de este Ensayo fue evaluar la inhibición mejorada del Candida a partir de acetato de sodio en combinación con células que crecieron de *Lactobacillus plantarum* LB 931.

Método

Dos placas fueron hechas con agar M17 y dos con agar MRS. El medio MRS

(desarrollado por De Man, Rogosa y Sharpe), es un medio de caldo comúnmente utilizado para *Lactobacillus*. El agar MRS de Merck contiene 5 g de acetato de sodio por litro de agar. El M17 (Oxoid) es un sustrato comercial similar para el *Lactobacillus* pero sin la adición de acetato de sodio. Los agar fueron preparados
5 como se describió en los empaques.

El *Lactobacillus plantarum* LB931 fue cultivado en caldo MRS a 37°C con 5 % de CO₂ durante 24 horas. El *Candida albicans* 702 fue cultivado en caldo M 17 a 37°C durante 24 horas.

10

Se puncionaron agujeros (Ø 10 mm) en las placas y se lleno con 250µl de tapones de mezclas de agar que contienen ~10⁷ LB 931 en agar MRS). Las placas se dejaron durante 30 minutos y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5 % de CO₂. El cultivo durante la noche de *C. albicans* en el caldo M17 fue diluido 10
15 veces y 100µl fueron distribuidos sobre la superficie de cada placa. Las placas entonces fueron incubadas durante 24 horas a 37°C. Como controles, los agujeros (Ø 10mm) fueron llenados con solamente MRS agar.

Las placas fueron evaluadas con respecto a la inhibición del crecimiento de
20 *Candida* las zonas alrededor de los tapones con ningún crecimiento de *Candida* fueron medidas (Ø mm).

Resultados

25 Los tamaños de las zonas pueden verse en la Tabla 1.

71

Tabla 1:

Agar en el plato Petri	Tapón con solamente agar (Ø mm)	Tapón con LB931(Ømm)
MRS agar	0	18.8
M17 agar	0	0
MRS agar	0	18.1
M17 agar	0	0

El LB 931 creció en los pozos en todos los tapones en donde LB 931 había sido
5 inoculada. No hubo zonas sin crecimiento de Candida en las placas con M17 de
agar. En las placas con MRS agar hubo zonas claras alrededor de los tapones LB
931 pero ninguna zona alrededor de los tapones con solo agar.

El LB 931 fue aplicado en cantidades bastantes bajas a las placas, lo que puede
10 explicar por que sustancialmente no hubo inhibición de Candida visualizada en las
placas M17 agar. Esto sin embargo indica que en la inhibición eficiente de
Candida debido al efecto sinérgico de LB 931 y el aditivo, en este caso acetato de
sodio estaba comprendido en el medio MRS.

15 EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos relacionados con esta invención son ilustrativos y por
supuestos no deberían ser contruidos como específicamente limitantes de la
invención.

20

Ejemplo 1: Aislamiento y tipificación de Ess-1

fz

El propósito inicial de este estudio es aislar y tipificar una cepa *Lactobacillus* que inhibe el crecimiento de *Candida albicans* y *Candida glabrata* a un grado grande comparado con otras cepas de *Lactobacillus*.

5

Método

Cepas de Levadura

10 Aislados clínicos de *Candida albicans* y *Candida glabrata* fueron usados como cepas de ensayo. Estos fueron aislados de la vagina de mujeres con candidiasis vaginal y de mujeres saludables.

Tamizado I.

15

Alrededor de 140 cepas de *Lactobacillus*, originadas de piel humana, garganta, dientes, heces de bebe, vegetales y semillas fueron cultivados en caldo MRS y estampadas en placas agar MRS. Las placas agar fueron incubadas bajo condiciones anaeróbicas a 37°C. Adicionalmente, el agar SAB (Sabouraud) (LAB
20 M, Bury, UK) fue vertido en MRS agar y se le permitió congelarse. El cultivo de *C. albicans* fue sembrado en el agar y las placas fueron incubadas aeróbicamente a 37°C. Una evaluación visual de la inhibición fue efectuada. Las cepas que inhibieron el *C. albicans* aun grado igual o mayor que la cepa referencia *Lactobacillus plantarum* LB931 fueron seleccionadas para un tamizado adicional
25 (Tamizado II).

Tamizado II.

3

La suspensiones de *Lactobacillus* crecidas en caldo dMRS (MRS caldo sin adición de acetato de sodio) fueron centrifugados y filtrados estériles. El filtrado es de aquí en adelante llamado filtrado de libre de células *Lactobacillus*, LCF. Un volumen especificado fue transferido a pozos de una placa microtítulo y se dejó secar al aire y luego se resuspendió en agua estéril destilada a una concentración tres veces mayor y se transfirió a placas microtítulo de 96 pozos. El *Candida* fue agregados a todos los frascos (tres aislados de *C. albicans* y *C. glabrata*, respectivamente, fueron usadas). La inhibición fue evaluada por observación visual de turbidez y graduada por dos personas usando una plantilla en una escala entre cinco a cero. Los pozos que contenían caldo fuerte de *Candida* sp. En caldo dMRS puro fueron graduados como cinco, mientras que los pozos sin ningún crecimiento visual fueron graduados como cero.

15 Tipificación API y tipificación genética

La identificación del nivel de las especies fue hecho usando el sistema API 50 CHL (bioMérieux, Francia), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos de los ensayos de fermentación fueron analizados usando el software API Lab Plus.

20 La tipificación genética fue hecha por DSMZ (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH) por análisis de secuencia parcial del rARN16S.

Resultados

25

Todos las cepas fueron evaluadas de acuerdo con la capacidad de inhibición de crecimiento contra el *C. albicans* en el Tamizado I. 23 cepas de *Lactobacillus* con

34

resultados comparable o excedidos para el LB931 fueron seleccionados para el Tamizado II. Fuera de estas 23 cepas de *Lactobacillus*, tres cepas fueron referencia y una mayoría de las cepas habían sido aisladas del tracto oral.

- 5 EL Ess-1 probó tener una capacidad muy Buena para inhibir el crecimiento de la Candida. Ninguna de las cepas *Lactobacillus* ensayadas fue similar a la actividad del Ess-1 con respecto al efecto tanto sobre *C. albicans* como *C. glabrata*. El patrón de fermentación de carbohidratos y la tipificación genética para el Ess-1 mostró que este pertenece a las especies *Lactobacillus fermentum*.

10

Caracterización del Ess-1

- rADN 16S de la cepa Ess-1 (DSM 17851) fue analizado por DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) por secuenciamiento
15 directo de cerca de 450 nucleótidos de rADN 16S amplificado por PCR. La extracción de ADN genómico, la amplificación mediada por PCR del rADN 16S y la purificación del producto PCR se llevo a cabo como se describió previamente (Rainey, F.A. et al. Int. J. Sys. Bacteriol. 1996(46): 1088- 1092). Los productos PCR purificados fueron secuenciados usando el kit CEQ™DTCS-Quickstart
20 (Beckam Coulter) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Los productos de la reacción de la secuencia fueron electroforesados usando el sistema de análisis genético CEQ™8000.

- Los datos resultantes de la secuencia se pusieron en el editor de alineación ae2
25 (Maidak, B. L. et al. Nucl. Acids Res. 1999(27):171-173), se alineo manualmente y se comparo con secuencia de genes rARN 16S de organismos que pertenecen al Firmicutes (Maidak, B. L. et al). Para la comparación de las secuencias de rARN

16S se obtuvieron de la base de datos EMBL o RDP (Maidak, B.I. etal.).

Como resultado de este análisis la siguiente Tabla 2 da una lista de aquellos organismos, cuyas secuencias de gen rARN 16S mostraron los valores de
5 similaridad más altos comparados con la secuencia rADN 16S del Ess-1.

Tabla 2

Cepa	% de similaridad de secuencia de gen rADN 16S con respecto a Ess-1.
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	99.3
<i>Lactobacillus fermentum</i> KRM	99.3
<i>Lactobacillus malefermentans</i> DSM 5705	85.5
<i>Lactobacillus rossiae</i> ATCC BAA-822	88.9
<i>Lactobacillus suebicus</i> DSM 5007	86.9
<i>Lactobacillus vaccino</i> stercus DSM 20634	87.2

La secuencia parcial del gen rADN 16S de la cepa Ess-1 muestra la similaridad
10 más alta con respecto al *Lactobacillus fermentum*. Consecuentemente la cepa Ess-1 puede representar una cepa de *Lactobacillus fermentum*, pero puede también representar una nueva especie dentro del género *Lactobacillus*.

Ejemplo 2: Producción de *Lactobacillus* Probiótico.

15

A escala de laboratorio: una vasija estéril con caldo MRS del ejemplo es inoculado con un inoculado puro de la cepa *Lactobacillus* deseada. El caldo con la bacteria

es incubado durante la noche a 37 °C y preferiblemente con una atmósfera de 5% de CO₂. Las células fueron entonces lavadas usando centrifugación y salina estéril. Azúcar protector, almidón o proteínas fueron agregados y la masa celular fue secada por congelamiento y molida.

5

A escala de producción, el lote de sembrado de trabajo es fermentado en diferentes etapas hasta la escala de producción. La producción es controlada y optimizada para la cepa específica producida. Luego de la fermentación el cultivo es lavado y/o solamente concentrado usando microfiltración de flujo cruzado o centrifugación. Las sustancias protectoras de acuerdo con lo anterior son agregadas y las células pueden ser secadas por congelamiento y molidas o secadas por rociado.

10

Ejemplo 3: Producción de Producto Extracelular a partir del *Lactobacillus* de ejemplo

15

A escala de laboratorio el cultivo durante la noche de la cepa probiótica es producido como en el ejemplo 2. Después de filtrar o centrifugar se recolecta el sobrenadante. El sobrenadante puede está concentrado por evaporación o completamente secado convectivo en aire seco, congelamiento, secado o secado por rociado.

20

A escala de producción el cultivo bacteriano es fermentado de acuerdo con el Ejemplo 2. El producto extracelular es obtenido como un filtrado usando microfiltración de flujo cruzado o un sobrenadante usando centrifugación. También en este caso puede ser concentrado adicionalmente usando evaporación o secando completamente usando por ejemplo secado por rociado.

25

Ejemplo 3: Formulaciones

Tisú higiénico para higiene genital mejorada

5

Los cultivos durante la noche de LB931 y células Ess-1 con productos extracelulares en la forma de sobrenadantes tanto de Ess-1 y LB931 fueron mezclados con ácido acético a una concentración final de 50mM. El pH fue ajustado a 4,9. la mezcla fue secada por congelamiento con trehalosa y molida hasta que un polvo de grano fino fue formado. 10 gramos del polvo se agregaron a 120 ml de aceite de oliva (aceite de oliva extra virgen Filippo BERIO) y se agito hasta que una solución homogénea fue formada. Una alícuota adicional de 80 ml de aceite de oliva fue agregada y la solución resultante de 200 ml es hecha a girar durante cerca de 2 min. La suspensión bacteriana fue mantenida a temperatura ambiente durante 3 horas, con un mezclado dos veces cada hora. Las hojas de tisú (Spun Lace Dupont) fueron cortadas en cuadrados de 6x8 cm y colocadas en bandejas de acero inoxidable estériles. Sobre cada hoja tisú, 4 ml de suspensión bacteriana fue vertida sobre el tisú para cubrirlo. La hoja de tisú fue doblada en la mitad, y entonces por el lado largo a la mitad nuevamente y empacada en bolsas de aluminio, cuyos bordes fueron doblados.

20

Debería notarse que aun si todos los tres ejemplos sobre formulaciones solamente comprenden *Lactobacillus plantarum* LB 931 y/o *Lactobacillus fermentum* Ess-1 como bacterias probióicas, todas las bacterias probióticas adecuadas para la presente invención como se describió previamente pueden también ser usadas.

25

78

WO 2008/060199

PCT/SE2006/001312

Solicitantes o agentes Referencia del archive PD53842PC00	Solicitud Internacional No.
INDICACIONES RELACIONADAS A MICROORGANISMOS U OTROS MATERIAL BIOLÓGICO DEPOSITADO (Regla PCT 13 bis)	
A. Las indicaciones hechas adelante se relacionan con el microorganismo u otro material biológico depositado mencionado en la descripción en la página 8, línea 34-37	
B. IDENTIFICACIÓN DE DEPÓSITOS	Depósitos adicionales serán Identificados en una hoja adicional ☐
Nombre de la Institución Depositaria Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH	
Dirección de la institución Depositaria (incluyendo código postal y país) Mascheroder Weg 1 b D-38124 Braunschweig Alemania	
Fecha de Depósito 2006-01-06	Número de Acceso DSM 17851
C. INDICACIONES ADICIONALES (dejar en blanco si no es aplicable)	Esta información se continua en una hoja adicional ☐
Recibo en el caso de un depósito original (copia adjunta con la forma de la Solicitud) Afirmación de viabilidad (copia adjunta con la forma de Solicitud)	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS CUALES LAS INDICACIONES SE HACEN (si las indicaciones no son para todos los estados designados)	
E. SUMINISTRO SEPARADO DE INDICACIONES (dejar en blanco si no es aplicable)	
Las indicaciones dadas adelante serán entregadas a la Oficina Internacional después(especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejemplo; "Acceso del Número de Depósito") La afirmación de que el depositario ha autorizado al solicitante referirse al material biológico depositado en la solicitud y que ha dado su consentimiento sin reserva e irrevocable del material depositado para que esté disponible al público de acuerdo con la regla 28 (1) (d) de la Convención de Patentes Europea (EPC)	
Para uso solamente de la Oficina Receptora ☒ esta hoja fue recibida con la solicitud Internacional	Para uso solamente de la Oficina Internacional ☐ esta hoja fue recibida por la Oficina Internacional el:
Oficial Autorizado (Aparece Firma) Riitta Vartiainen	oficial autorizado

REIVINDICACIONES

1. Un tisú higiénico (1) tal como un trapo húmedo, un trapo seco, un paño para lavar, un parche, una toallita, una servilleta y similares que comprende una
5 composición inhibidora de microbios (8), dicha composición inhibidora de microbios (8) comprende un producto extracelular de por lo menos una bacteria probiótica y por lo menos un aditivo en la forma de un ácido orgánico, que tiene un valor pKa que no excede 5.5, y/o una sal de estos.
- 10 2. Un tisú higiénico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho valor pKa no excede de 5.
3. El tisú higiénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho producto extracelular está en la forma de un sobrenadante,
15 obtenido por filtración o centrifugación de un cultivo de una bacteria probiótica.
4. El tisú higiénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en donde dicha composición inhibidora de microbios (8) está sustancialmente
20 libre de bacterias productoras de ácido láctico, preferiblemente no presentes en una cantidad mayor a 100 C FU/ml y más preferiblemente no mayor a 10 CFU/ml.
5. El tisú higiénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en
25 donde dicha composición inhibidora de microbios (8) comprende adicionalmente una bacteria probiótica.



6. El tisú higiénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicha bacteria prebiótica es una bacteria productora de ácido láctico.
7. El tisú higiénico de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la bacteria productora de ácido láctico es *Lactobacillus plantarum* LB 931 o *Lactobacillus fermentum* Ess-1 o una combinación de estos.
8. El tisú higiénico de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho aditivo se escoge entre ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caprónico, ácido succínico y/o una sal de estos, preferiblemente dicho aditivo se escoge entre ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico o ácido succínico, y/o una sal de estos, más preferiblemente dicho aditivo se escoge de ácido ascórbico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico y/o una sal de estos.
9. El tisú higiénico de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha sal es una sal de sodio; preferiblemente propionato de sodio o acetato de sodio.
10. Un kit que comprende la composición inhibidora de microbios (8) según se definió en cualquiera de las reivindicaciones precedentes y dicho tisú de higiénico (1), dicha composición inhibidora de microbios (8) está provista en una ampolla, una botella, un tubo, un dispositivo enrollable, o una varilla o un rociador.
11. Un kit que comprende El tisú higiénico de acuerdo como se definió en las reivindicaciones precedentes y un artículo absorbente, tal como una toalla

sanitaria, un refuerzo de pantaloncito, un protector de incontinencia, un pañal, una almohadilla de incontinencia, un inserto femenino, un tampón, o similares.

5 12. El uso de la composición inhibidora de microbios de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en combinación con un tisú higiénico (1).

13. Un método para preparar un tisú higiénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende aplicar dicha composición inhibidora de microbios (8) a dicho tisú higiénico (1).

TISÚ PARA HIGIENE QUE COMPRENDE UNA COMPOSICIÓN INHIBIDORA
DE MICROBIOS

RESUMEN

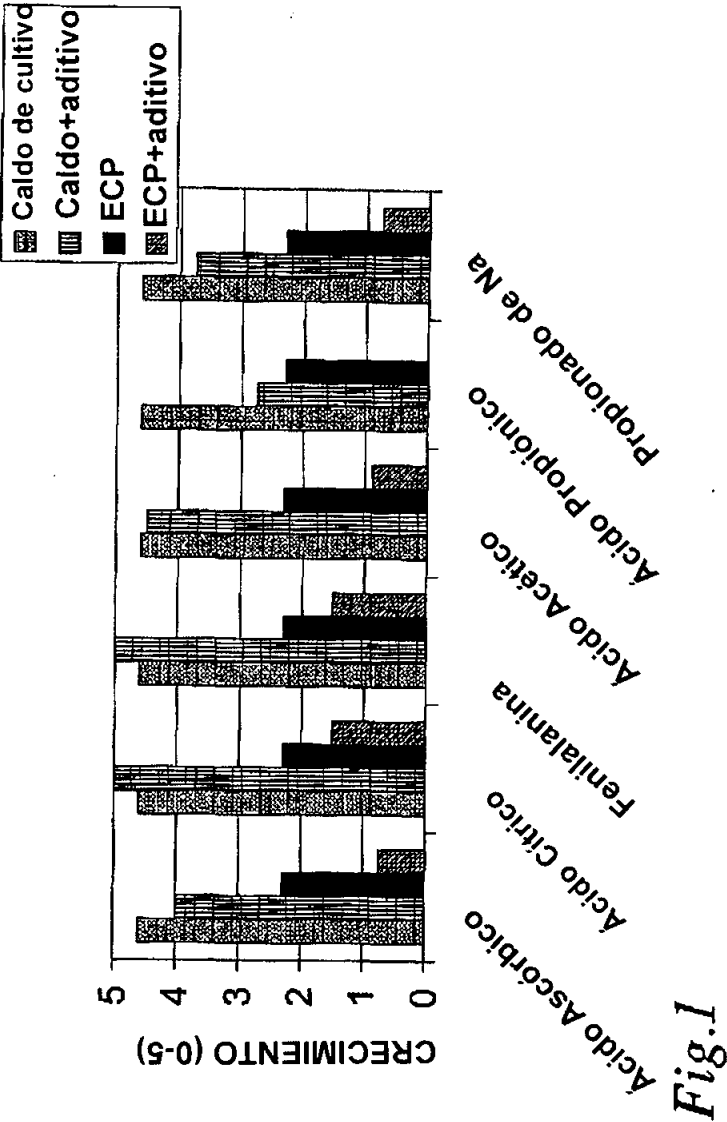
5

La presente invención se refiere a Tisú para higiene (1) tal como un trapo húmedo, trapo seco, paño para lavar, parche, toallita, servilleta, y similares que comprenden una composición inhibidora de microbios (8), dicha composición inhibidora de microbios (8) comprende un producto extra celular de por lo menos una bacteria prebiótica y por lo menos un aditivo en la forma de un ácido orgánico, con por lo menos uno de entre su valor pKa que no exceda 5.5, y/o una sal de éste.

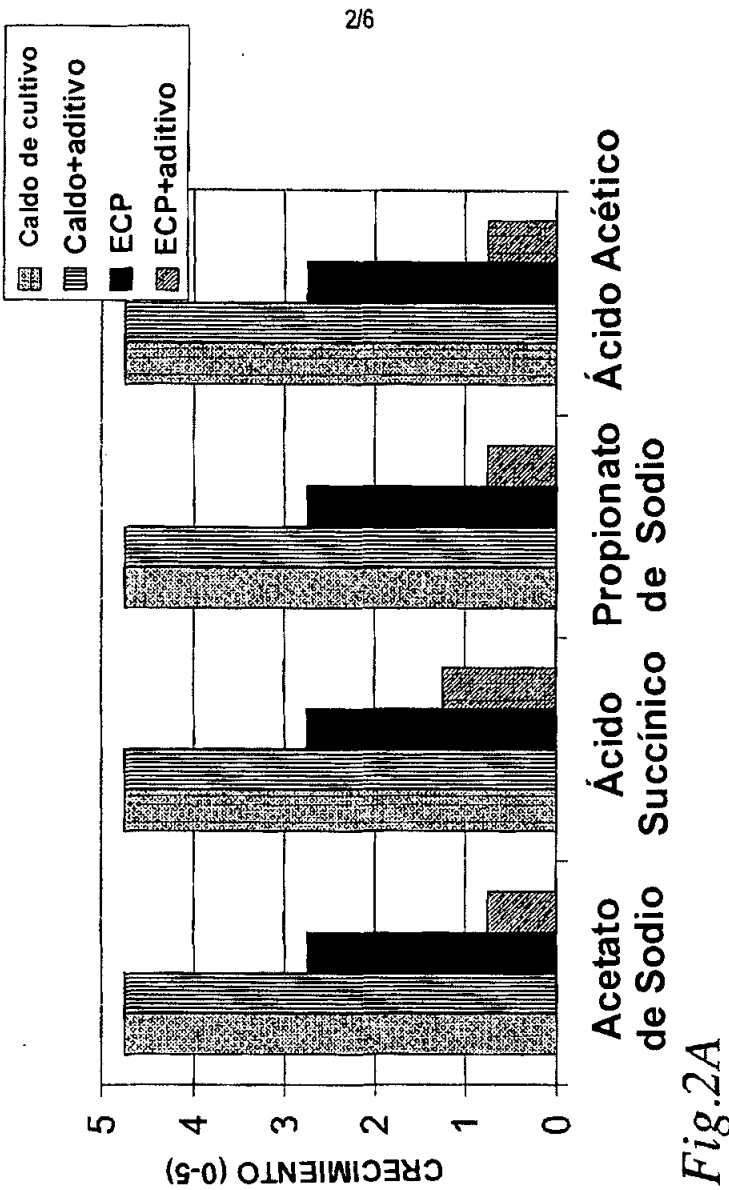
10

83

1/6



89



85

3/6

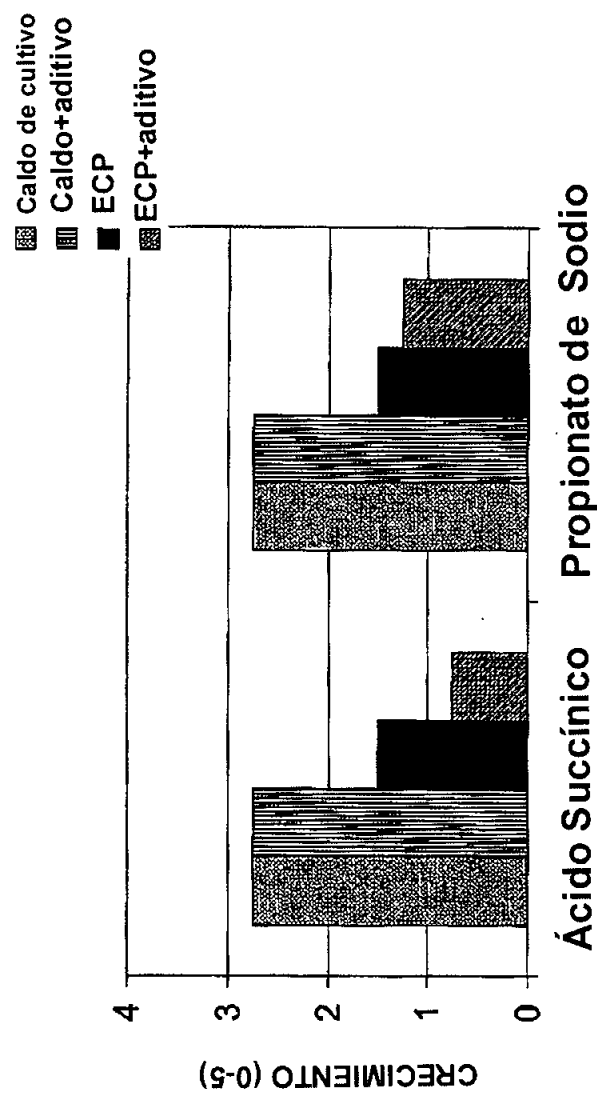


Fig.2B

4/6

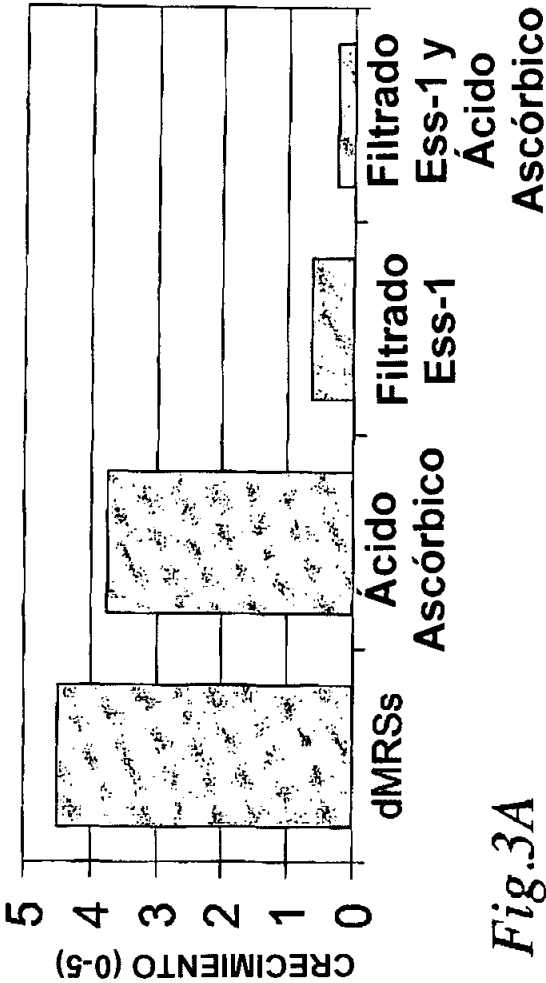


Fig.3A

87

5/6

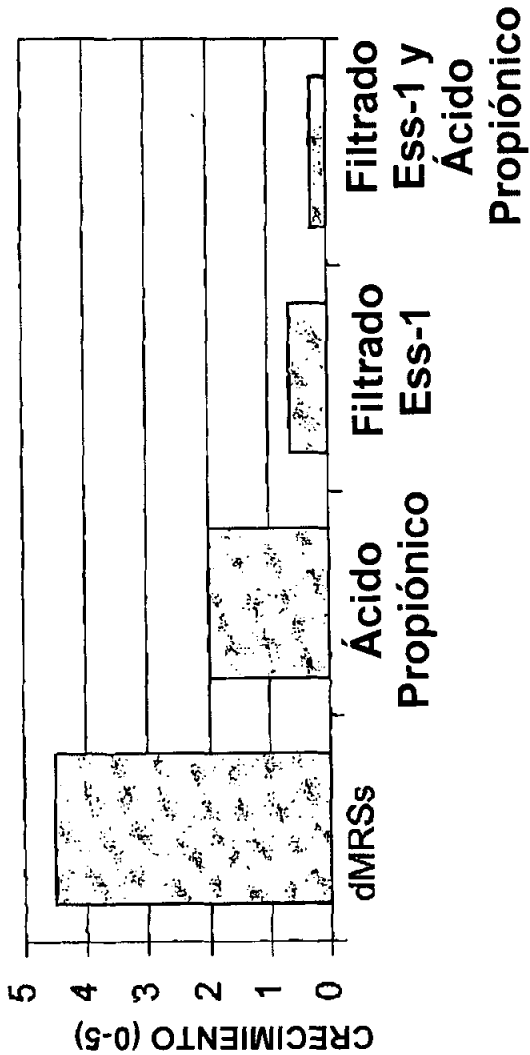


Fig.3B

8A

6/6

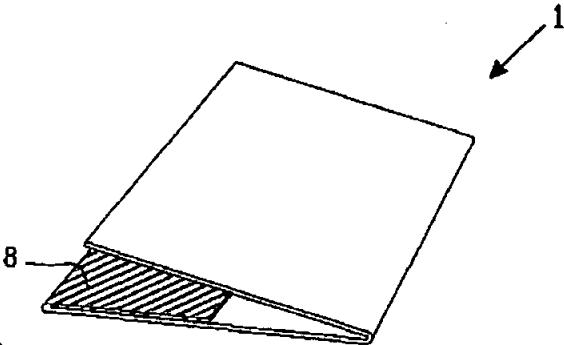


Fig. 4

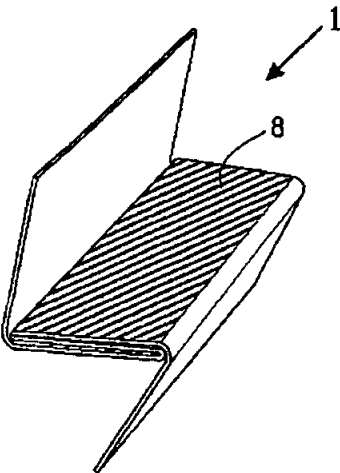


Fig. 5

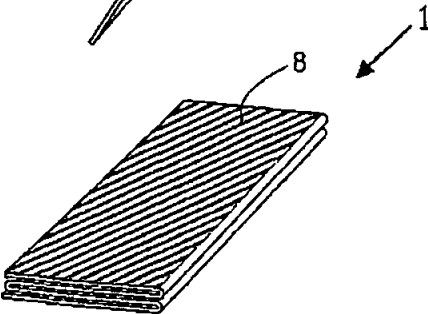


Fig. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE2006/001312

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC: 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)

IPC: A61F, A61L, A61K, A47K

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

SE,DK,FI,NO classes as above

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

EPO-INTERNAL, WPI DATA, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 0061201 A1 (GANEDEN BIOTECH, INC.), 19 October 2000 (19.10.2000), page 20, line 27 - line 31, claims 5,15 --	1-13
Y	US 20020090365 A1 (CHRISOPE, GERALD L.), 11 July 2002 (11.07.2002), see paragraphs (0016), (001)9, (0103), claims 32-33 --	1-13
A	US 20060177429 A1 (S. FARMER ET AL), 10 August 2006 (10.08.2006), claims 1,10,22, abstract, paragraphs (0031) - (0053) --	1-13

☒ 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 application or patent 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 such 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

28 June 2007

Date of mailing of the international search report

05 -07- 2007

Name and mailing address of the ISA/
Swedish Patent Office
Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM
Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Barbro Nilsson / Eö
Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE2006/001312

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004060416 A1 (SCA HYGIENE PRODUCTS AB), 22 July 2004 (22.07.2004), claims 1-3 --	1-13
A	US 20010033838 A1 (S. FARMER), 25 October 2001 (25.10.2001), claims 1,25,48,52 --	1-13
A	US 20040241151 A1 (U. HUSMARK ET AL), 2 December 2004 (02.12.2004), claim 20, abstract -----	10,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

91
International application No.
PCT/SE2006/001312

International patent classification (IPC)

A61L 15/46 (2006.01)
A47K 10/16 (2006.01)
A61F 13/15 (2006.01)
A61L 15/36 (2006.01)

Download your patent documents at www.prv.se

The cited patent documents can be downloaded at www.prv.se by following the links:

- In English/Searches and advisory services/Cited documents (service in English) or
- e-tjänster/anförda dokument (service in Swedish).

Use the application number as username.

The password is **YZNTVDUCTE**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

28/05/2007

International application No.

PCT/SE2006/001312

WO	0061201	A1	19/10/2000	AU	780367	B	17/03/2005
				AU	4353300	A	14/11/2000
				CA	2368509	A	19/10/2000
				EP	1173233	A	23/01/2002
				JP	2002540900	T	03/12/2002
				US	6716435	B	06/04/2004
				US	7025974	B	11/04/2006
				US	20040191232	A	30/09/2004
				US	20060177429	A	10/08/2006

US	20020090365	A1	11/07/2002	US	6468526	B	22/10/2002
				US	6372209	B	16/04/2002
				AU	732630	B	26/04/2001
				AU	7359098	A	11/11/1998
				BR	9808520	A	15/01/2002
				CA	2285947	A	22/10/1998
				CN	1194758	C	30/03/2005
				CN	1259874	A,T	12/07/2000
				EP	1011721	A	28/06/2000
				JP	2001523231	T	20/11/2001
				NZ	500788	A	29/04/2003
				NZ	513835	A	28/09/2001
				US	6093394	A	25/07/2000
				WO	9846261	A	22/10/1998

US	20060177429	A1	10/08/2006	AT	308987	T	15/11/2005
				AU	749001	B	13/06/2002
				AU	7110298	A	13/11/1998
				CA	2287451	A	29/10/1998
				DE	69832267	D,T	10/08/2006
				EP	0975227	A,B	02/02/2000
				EP	1629846	A	01/03/2006
				ES	2255730	T	01/07/2006
				JP	2002512615	T	23/04/2002
				US	6645506	B	11/11/2003
				US	6716435	B	06/04/2004
				US	6723326	B	20/04/2004
				US	6905692	B	14/06/2005
				US	7025974	B	11/04/2006
				US	20030003107	A	02/01/2003
				US	20040191232	A	30/09/2004
				WO	9847374	A	29/10/1998
				AU	780367	B	17/03/2005
				AU	4353300	A	14/11/2000
				CA	2368509	A	19/10/2000
				EP	1173233	A	23/01/2002
				JP	2002540900	T	03/12/2002
				WO	0061201	A	19/10/2000

43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

28/05/2007

International application No.

PCT/SE2006/001312

WO	2004060416	A1	22/07/2004	AU	2003201934	A	00/00/0000
				AU	2003288879	A	00/00/0000
				DE	60304991	D,T	04/01/2007
				DE	60311320	D	00/00/0000
				EP	1461226	A,B	29/09/2004
				EP	1594554	A,B	16/11/2005
				SE	1594554	T3	
				JP	2005514254	T	19/05/2005
				JP	2006512134	T	13/04/2006
				MX	PA05006199	A	19/08/2005
				SE	525647	C	29/03/2005
				SE	0300002	A	04/07/2004
				US	20060012233	A	19/01/2006
US	20010033838	A1	25/10/2001	AT	270558	T	15/07/2004
				AU	783905	B	22/12/2005
				AU	7573200	A	19/03/2001
				AU	2006201179	A	27/04/2006
				CA	2382670	A	01/03/2001
				DE	60012026	D,T	30/12/2004
				EP	1212093	A,B	12/06/2002
				ES	2221624	T	01/01/2005
				JP	2003507437	T	25/02/2003
				US	6531126	B	11/03/2003
				US	6733751	B	11/05/2004
				US	7048950	B	23/05/2006
				US	20030170334	A	11/09/2003
				US	20040208860	A	21/10/2004
				US	20060147544	A	06/07/2006
				WO	0113956	A	01/03/2001

US	20040241151	A1	02/12/2004	NONE
----	-------------	----	------------	------

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PD53842PC00	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/SE2006/001312	International filing date (day/month/year) 17.11.2006	Priority date (day/month/year)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61L15/46			
Applicant SCA HYGIENE PRODUCT AB			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of <u>2</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 2008-05-15		Date of completion of this report 10.03.2009	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Kaufmann, Doris Telephone No. +49 89 2399-4737	



45

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/SE2006/001312

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-21 as published

Claims, Numbers

1-10 received on 03.03.2009 with letter of 03.03.2009

Drawings, Sheets

1/6-6/6 as published

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing
3. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:
 - ☐ the description, pages
 - ☒ the claims, Nos. 11-13
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
 4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
 5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).

96

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/SE2006/001312

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-10</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-10</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-10</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/SE2006/001312

Re Item I

Basis of the report

The amendments filed with the letter dated 03.03.2009 meets the requirements of Article 34(2)(b) PCT. A basis for new claim 1 can be found former claims 1 and 3.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

- D4: WO2004060416 A1, cited in ISR
- D7: WO9945099 A1 cited in the application
- D8: US2005276836 A1, newly introduced into the procedure
- D9: WO9423585 A1, newly introduced into the procedure

1. Novelty (Art. 33(1)PCT):

The present application meets the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of the present application is new in the sense of Article 33(2) PCT.

1.1 D4 discloses **hygiene tissues** suitable for cleaning of and transfer of lactic acid producing bacteria to the skin or the urogenital area characterized comprising a composition consisting of A) a preparation of one or more **lactic acid producing bacterial strains** like *Lactobacillus plantarum* 931; and B) a lipid phase comprising at least one lipid. Said hygiene tissue is further comprising pH buffering agents such as **lactic acid, ascorbic acid, citric acid** or boric acid (D4: claims 1, 4 and 7; p. 8, last section).

The difference between the present application and D4 is the extracellular product which is in the form of a supernatant, obtained by filtration or centrifugation of a culture of at least one probiotic bacterium.

Therefore the present application is new over the disclosure over D4.

1.2 D7 discloses absorbent products such as a **feminine hygiene product diaper, sanitary napkin**, panty guard or an incontinence guard comprising *Lactobacillus*

48

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/SE2006/001312

plantarum strain LB931 and antioxidants such as ascorbic acid (D7: claim 7; p. 6, line 1).

The difference between the present application and D7 is the extracellular product which is in the form of a supernatant, obtained by filtration or centrifugation of a culture of at least one probiotic bacterium and the that D7 discloses an absorbent product and no hygiene tissue.

Therefore the present application is new over the disclosure over D7.

2. Inventive Step:

As claim 1 now refers to an hygiene tissue comprising an extracellular product of at least one probiotic bacterium in the from of a supernatant, obtained by filtration or centrifugation of a culture of said at least probiotic bacterium, D1 is now chosen as closest prior art for the present application.

D1 discloses absorbent products (e.g. towelettes, washcloths) with an extracellular product of probiotic bacteria. The extracellular product may be isolated as a supernatant (D1: p. 10, l. 30 - p. 11, l. 6 and p. 22, l. 31-34).

The difference between the present invention and D1 is the additive in the form of an organic acid and/or a salt thereof. The technical effect of this difference is a synergistic effect of the extracellular product and the additive in inhibition of *Candida albicans* or other unwanted microorganisms, thereby resulting in an increased probiotic/prebiotic effect (see examples of the present application).

The objective technical problem is therefore to provide a hygiene tissue with a microbe-inhibiting composition with an increased probiotic/prebiotic effect. Said problem is solved in the present invention by including an additive in the form of an organic acid/or a salt thereof in the composition.

D1 gives no hints to include an additive in the form of an organic acid and/or salt in the composition, the person skilled in the art would arrive at the claimed invention.

Therefore the present invention involves an inventive step over the disclosure of D1, according to Article 33(3) PCT.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

49

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/SE2006/001312

The present set of claims is clear and meets the requirements of Art. 6 PCT, as former claims 10 and 11 have been deleted.

100

CLAIMS

1. A hygiene tissue (1) such as a wet wipe, dry wipe, washcloth, patch, towelette, napkin,
and the like comprising a microbe-inhibiting composition (8), said microbe-inhibiting
composition (8) comprising an extracellular product of at least one probiotic bacterium
and at least one additive in the form of an organic acid, having a pKa value not
exceeding 5.5, and/or a salt thereof, whereby said extracellular product is in the form
of a supernatant, obtained by filtration or centrifugation of a culture of said at least
one probiotic bacterium.
2. A hygiene tissue according to claim 1, wherein said pKa value does not exceed 5.
3. The hygiene tissue according to claim 1 or 2, wherein said microbe-inhibiting
composition (8) is substantially free from lactic acid producing bacteria, preferably not
present in an amount higher than 100 CFU/ml and more preferably not higher than 10
CFU/ml.
4. The hygiene tissue according to claim 1 or 2, wherein said microbe-inhibiting
composition (8) further comprises a probiotic bacterium.
5. The hygiene tissue according to any of claims 1-2 and 4, wherein said probiotic
bacterium is a lactic acid producing bacterium.
6. The hygiene tissue according to claims 5, wherein the lactic acid producing bacteria
is *Lactobacillus plantarum* LB 931 or *Lactobacillus fermentum* Ess-1 or a combination
thereof.
7. The hygiene tissue of claims 1 to 6, wherein said additive is chosen from acetic acid,
propionic acid, lactic acid, ascorbic acid, phenylalanine, citric acid, butyric acid,
valeric acid, capronic acid, succinic acid and/or a salt thereof, preferably said additive
is chosen from acetic acid, propionic acid, lactic acid, ascorbic acid, phenylalanine,
citric acid or succinic acid, and/or a salt thereof, most preferably said additive is
chosen from ascorbic acid, acetic acid, propionic acid, succinic acid and/or a salt
thereof.

24

8. The hygiene tissue according to claim 7, wherein said salt is a sodiumsalt; preferably sodium propionate or sodium acetate.

5 9. Use of the microbe-inhibiting composition according to any of claims 1-8 in combination with a hygiene tissue (1).

10. Method of preparing a hygiene tissue according to any of claims 1-8, comprising applying said microbe-inhibiting composition (8) to said hygiene tissue (1).

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

- PARA REALIZAR EL EXAMEN DE
PATENTABILIDAD

REIVINDICACIONES

1. Un tisú higiénico (1) tal como un trapo húmedo, un trapo seco, un paño para lavado, un parche, una toallita, una servilleta y similares que comprende una composición inhibidora de microbios (8), dicha composición inhibidora de microbios (8) comprende un producto extracelular de por lo menos una bacteria probiótica y por lo menos un aditivo en la forma de un ácido orgánico, que tiene un pKa que no excede 5.5, y/o una sal de estos, en donde dicho producto extracelular está en la forma de un sobrenadante, obtenido por filtración o centrifugación de un cultivo de dicho por lo menos una bacteria prebiótica.
2. Un tisú higiénico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho valor pKa no excede de 5.
3. El tisú higiénico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha composición inhibidora de microbios (8) está sustancialmente libre de bacterias productoras de ácido láctico, preferiblemente no presentes en una cantidad mayor a 100 C FU/ml and y más preferiblemente no mayor a 10 CFU/ml.
4. El tisú higiénico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha composición inhibidora de microbios (8) comprende adicionalmente una bacteria probiótica.

5. El tisú higiénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 4, en donde dicha bacteria prebiótica es una bacteria productora de ácido láctico.
6. El tisú higiénico de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la bacteria productora de ácido láctico es *Lactobacillus plantarum* LB 931 o *Lactobacillus fermentum* Ess-1 o una combinación de estos.
7. El tisú higiénico de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho aditivo se escoge entre ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caprónico, ácido succínico y/o una sal de estos, preferiblemente dicho aditivo se escoge entre ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico o ácido succínico, y/o una sal de estos, más preferiblemente dicho aditivo se escoge entre ácido ascórbico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico y/o una sal de estos.
8. El tisú higiénico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicha sal es sal de sodio; preferiblemente propionato de sodio o acetato de sodio.
9. El uso de la composición inhibidora de microbios de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en combinación con un tisú higiénico (1).
10. Un método para preparar un tisú higiénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende aplicar dicha composición inhibidora de microbios (8) a dicho tisú higiénico (1).

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País		(51) Int Cl: A61L 015/046 (71) Solicitante(s) SCA HYGIENE PRODUCTS AB (72) Inventor(es) ULRIKA HUSMARK ULLA FORSGREN BRUSK (74) Apoderado: EMILIO FERRERO	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 17/06/2009 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 17/11/2006 No. de solicitud PCT/SE2006/001312		(87) Publicación internacional Fecha: 22/05/2008 N° publicación: WO 2008/060199 A1	
(54) Titulo: TISÚ PARA HIGIENE QUE COMPRENDE UNA COMPOSICIÓN INHIBIDORA DE MICROBIOS			

Reivindicación(es):

- Un tisú higiénico (1) tal como un trapo húmedo, un trapo seco, un paño para lavar, un parche, una toallita, una servilleta y similares que comprende una composición inhibidora de microbios (8), dicha composición inhibidora de microbios (8) comprende un producto extracelular de por lo menos una bacteria probiótica y por lo menos un aditivo en la forma de un ácido orgánico, que tiene un valor pKa que no excede 5.5, y/o una sal de estos.
- Un tisú higiénico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho valor pKa no excede de 5.
- El tisú higiénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho producto extracelular está en la forma de un sobrenadante, obtenido por filtración o centrifugación de un cultivo de una bacteria probiótica.
- El tisú higiénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en donde dicha composición inhibidora de microbios (8) está sustancialmente libre de bacterias productoras de ácido láctico, preferiblemente no presentes en una cantidad mayor a 100 C FU/ml y más preferiblemente no mayor a 10 CFU/ml.
- El tisú higiénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha composición inhibidora de microbios (8) comprende adicionalmente una bacteria probiótica.
- El tisú higiénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicha bacteria prebiótica es una bacteria productora de ácido láctico.
- El tisú higiénico de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la bacteria productora de ácido láctico es *Lactobacillus plantarum* LB 931 o *Lactobacillus fermentum* Ess-1 o una combinación de estos.
- El tisú higiénico de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho aditivo se escoge entre ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caprónico, ácido succínico y/o una sal de estos, preferiblemente dicho aditivo

- se escoge entre ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico o ácido succínico, y/o una sal de estos, más preferiblemente dicho aditivo se escoge de ácido ascórbico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico y/o una sal de estos.
- El tisú higiénico de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha sal es una sal de sodio; preferiblemente propionato de sodio o acetato de sodio.
 - Un kit que comprende la composición inhibidora de microbios (8) según se definió en cualquiera de las reivindicaciones precedentes y dicho tisú de higiénico (1), dicha composición inhibidora de microbios (8) está provista en una ampolla, una botella, un tubo, un dispositivo enrollable, o una varilla o un rociador.
 - Un kit que comprende El tisú higiénico de acuerdo como se definió en las reivindicaciones precedentes y un artículo absorbente, tal como una toalla sanitaria, un refuerzo de pantaloncito, un protector de incontinencia, un pañal, una almohadilla de incontinencia, un inserto femenino, un tampón, o similares.
 - El uso de la composición inhibidora de microbios de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en combinación con un tisú higiénico (1).
 - Un método para preparar un tisú higiénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende aplicar dicha composición inhibidora de microbios (8) a dicho tisú higiénico (1).

706

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-062890- -00000-0000

Fecha: 2009-06-17 17:36:14 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 106

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 39,960
FECHA : JUNIO 1 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	111857745	01/06/2009	45,405,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	5 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo: 11256-841-225-1



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Descripción de la invención []
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

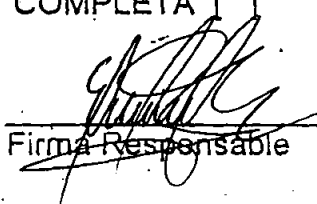
INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fec:

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-062890- -00000-0000

Fecha: 2009-06-17 17:36:14
Tra: 11 PATENTE IYII
Act: 411 PRESENTACION
Dep: 2020 NUECREACIONE
Eve: 379 FASENACIONALII
Folios: 106

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Conmutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 108

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
SCA HYGIENE PRODUCTS A B.

REFERENCIA	Radicación No.	9 62890
	Solicitud internacional	PCT/SE2006/001312
	Fecha inicio fase nacional	17/06/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	8420
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

02 JUL 2009

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

jfernand