



Organización y
Digitalización CSA Ltda

Handwritten signature

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones



PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-62894

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

ARTICULO SANITARIO QUE COMPRENDE UNA COMPOSICION
QUE INHIBE 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.,



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-062894- -00000-0000

Fecha: 2009-06-17 17:40:28 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 114

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

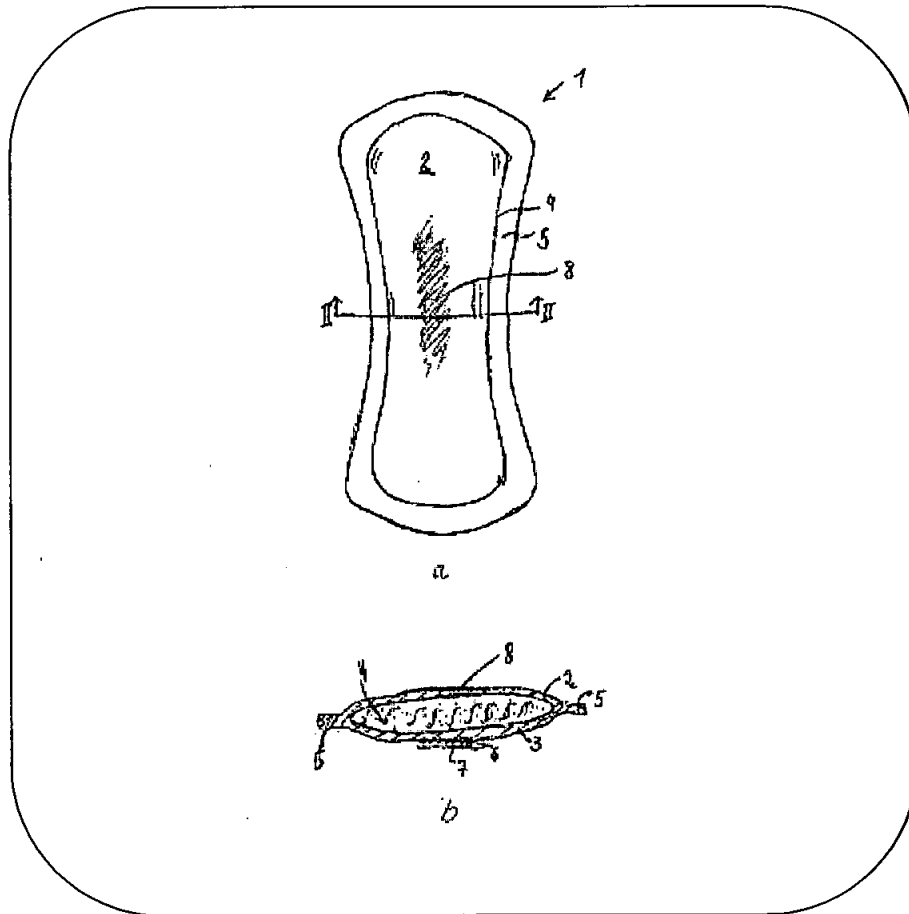
SOLICITUD DE:			
1	☒ Patente de Invención. ☐ Capítulo I.	☐ Patente de Modelo de Utilidad. ☒ Capítulo II.	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: SCA HYGIENE PRODUCTS AB sociedad constituida y existente bajo las leyes de Suecia. Dirección: 405 03 Göteborg, Suecia Domicilio: Göteborg, Suecia		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ 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, 735 43 Pixbo, Suecia		
5	PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/SE2006/001313 Fecha: 17 de noviembre de 2006 Publicación Internacional No. WO 2008/060200 A1 Fecha: 22 de mayo de 2008		
6	Título (54) ARTÍCULO SANITARIO QUE COMPRENDE UNA COMPOSICIÓN QUE INHIBE MICROBIOS		
7	Clasificación Internacional (51) A61L 015/036		
8	Prioridad SI ☐ NO ☒	(33) País de Origen _____	(32) Fecha _____
9	Comprobante de pago No.: 09-39,961		Fecha: 1° de junio de 2009

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.00.
- ☐ 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 FERREROFIRMA: *Emilio Ferrero*

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/060200 A1

Descripción:

Páginas 23 en el idioma original

Páginas 38 en español

Reivindicaciones: Número (s) 15

Figuras: Número (s) 5

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

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

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

REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY

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

of / domiciliado (s) en: S-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, ejerzando 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, enseñas, 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 oficiosos.

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 or 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 contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, 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 and judicial nullity, interim measures, protective measures, concession of licenses, infringement of 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, renunciate 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.: 170
MARIA ELVIRA MARTELO
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 cert. 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.: 1707/99
MARIA ELVIRA MARQUELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

RESPONSE TO REQUEST FOR TEXT
05:11 A 11:50
2009 FEB 11
DE LEGALIZACIONES
FEB 11 2009

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.

Gothenburg, this 25th day of February 1999

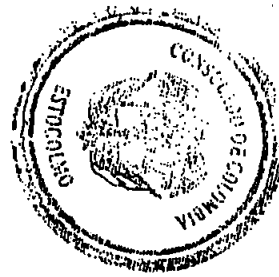
Ex. No.:

RICKARD STRÖM

Exp.No.: 79234

Fee: SEK 350:-

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



NO. 3066

The Ministry for Foreign Affairs in Stockholm, hereby certifies that

Mr Rickard Ström, Notary Public in Gothenburg, Sweden, has issued and signed the foregoing Power of Attorney in his official capacity.

Fee Stockholm this 25th day of March 1999

Kr 120/- PAID 1977

AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA

Ingvar Höglberg

MARIA SMITH RUEDA
Encargada de las Funciones Consulares

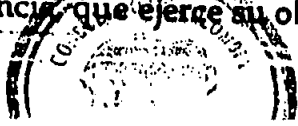
Fecha

1999-03-05

No. 022

que el señor Bengt Forshult
quien firma el documento que antecede
ejercía para la SCA Hygiene Products
de la Sociedad SCA Hygiene Products
que existe en virtud de las leyes de
según se me acredite en los documentos que
tuve a la vista.

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

Meo 2828133
Smith Rueda
Cuya firma aparece en el
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

99 JUL 20 1999

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

079530

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

TRADUCCION No. 1707/99
MARIA OLIVIA MAESTRO
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

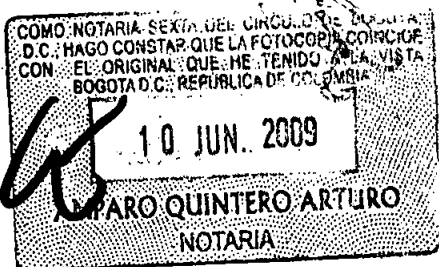
Fecha.....1999-07-01..... No:.....001329

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

*Ing. Högberg, Min. Relaciones
Exteriores, Suecia*

M. Smith

MARIA SMITH RUEDA
Encargada de las Funciones Consulares



PAGADO

Impuesto de Timbre

Siete dólares US\$ 7

Derechos Consulares

Quince dólares US\$ 15



TRADUCCION No: 170969
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

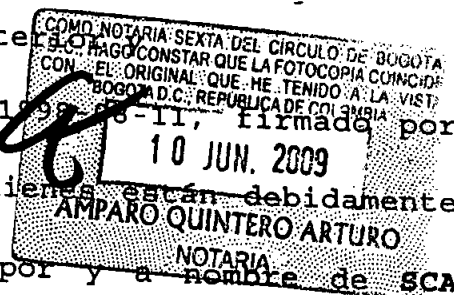
6

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 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

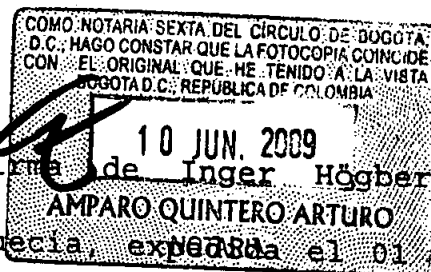
El Ministerio de Relaciones Exteriores en Estocolmo por el presente certifica que el Sr. Rickard Ström, Notario Público de Goteborg, ha expedido y firmado la declaración anterior en su capacidad oficial.

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 impuesto 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

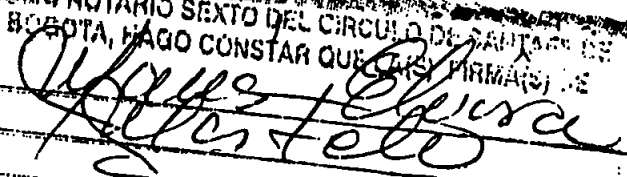
Feb. 15/00

Maria Elvira Martelo
TRADUCCION No. 1170799
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
FEBREROS
220552
CIVILIA MARTELO
CIVIL FIRMADA AFERRE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUERZAS INDICADAS

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

BU SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2000 FEB 15/00 12/02
Jefe de LEGALIZACIONES
CANTAF DE BOGOTIA

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
 BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LAS FIRMA(S) DE

 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
 10 JUN. 2009
 AMPARO QUINTERO ARTURO
 NOTARIA

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 1502

9. Timbre/Sello:

10. Firma:

[Handwritten signature]



CAVELIER

374

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
ARRERA 4a N° 72-35
ATA, 8 - COLOMBIA



CESION

ASSIGNMENT

(s) abajo firmado (s)
Ulrika HUSMARK
Ulla FORSGREN BRUSK

I, the undersigned
Ulrika HUSMARK
Ulla FORSGREN BRUSK

domiciliado(s) en
Skogsvägen 6, 435 38 Mölnlycke, Suecia
Plommonvägen 35, 435 43 Pixbo, Suecia

of
Skogsvägen 6, 435 38 Mölnlycke, Sweden
Plommonvägen 35, 435 43 Pixbo, Sweden

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

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

ARTICULO SANITARIO QUE COMPRENDE UNA COM-
POSICION QUE INHIBE MICROBIOS

SANITARY ARTICLE COMPRISING A MICROBE-INHIBITING
COMPOSITION

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

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

SCA Hygiene Products AB

SCA Hygiene Products AB

constituida y existente de conformidad con las leyes de
Suecia

a corporation constituted and existing in conformity with the laws
Sweden

domiciliada en Göteborg, Suecia

domiciled in Göteborg, Sweden

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.

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

Dado y firmado hoy/Given and signed this
en/in

por/by
Ulrika Husmark
Ulla Forsgren Bruska
Ulla Forsgren Bruska

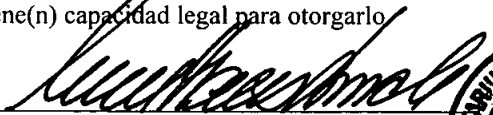


CERTIFICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO)

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

a 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



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.

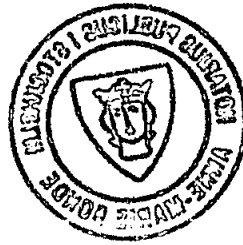
APOSTILLE

(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 2008/060200 A1

(51) International Patent Classification:
A61L 15/36 (2006.01) A61L 15/46 (2006.01)
A61F 13/15 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/SE2006/001313

(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-735 43 Pixbo (SE).

(74) Agent: UNGE, Annika; Valea AB, P O box 7086, S-103 87 stockholm (SE).

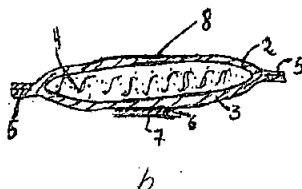
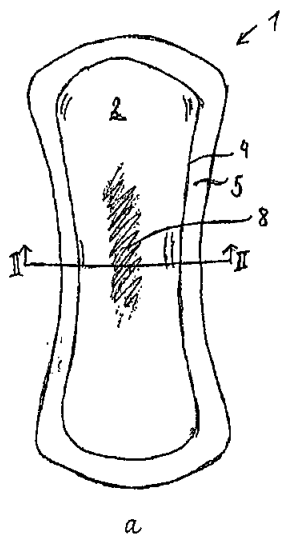
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, 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

(54) Title: SANITARY ARTICLE COMPRISING A MICROBE-INHIBITING COMPOSITION

(57) Abstract: A sanitary article (1) such as a sanitary napkin, a panty liner, an incontinence protector, a diaper, an incontinence pad, a feminine insert, a tampon, or the like comprising a top sheet (2), said sanitary article (1) comprising a microbe-inhibiting composition (8), said microbe-inhibiting composition (8) comprising at least one extracellular product of at least one probiotic bacterium and/or 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.



WO 2008/060200 A1

SANITARY ARTICLE COMPRISING A MICROBE-INHIBITING COMPOSITION

TECHNICAL FIELD

5 The present invention relates to a sanitary article, such as sanitary napkins, panty liners, incontinence protectors, diapers, tampons, or the like, that comprises an extracellular product of at least one probiotic bacterium and/or at least one probiotic bacterium and at least one of the selected additive 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.

25 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 result 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 too needs to be kept in check, in order to avoid skin infections.

10 *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.

15 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.

20 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.

25 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).

35 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

15 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

10 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.

15 Other ways of delivering the lactic acid producing bacteria have also been suggested, such
as a 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.

20 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 (WO99/17813).

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

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

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

35

SUMMARY OF THE INVENTION

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

The above defined problems are solved by the present invention by a sanitary article such as sanitary napkins, panty liners, incontinence protectors, diapers, tampons or the like
10 comprising a microbe-inhibiting composition comprising an extracellular product of at least one probiotic bacterium and/or 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 probiotic and/or prebiotic effect.

15 In one aspect said pKa value does 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.

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

In another embodiment of the invention said microbe-inhibiting composition comprises at
25 least one probiotic bacterium and at least one of said additives.

In a further 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.

30

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

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

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.

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

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

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.

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.

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. 4a is a plan view of a sanitary article according to the present invention.

Fig. 4b is a cross sectional view through the sanitary article according to the line II-II in Fig. 4a.

Fig. 5a is a plan view of a sanitary article according to the present invention.

Fig. 5b is a cross sectional view through the sanitary article according to the line II-II in Fig. 5a.

DEFINITIONS

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

- 5 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
10 selected from *Lactobacillus plantarum* or *Lactobacillus fermentum*. Even more preferably the lactic acid producing bacterium is *Lactobacillus plantarum* LB 931 (deposition No. (DSMZ): DSM 11918) and *Lactobacillus fermentum* Ess-1, (deposition No. (DSMZ): DSM 17851).

- 15 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.

- 20 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
25 supernatant comprising the extracellular product possesses antimicrobial activity useful in a microbe-inhibiting composition.

- The term "sanitary article" refers to products that are placed against the skin of the wearer to absorb and contain body exudates, like urine, faeces and menstrual fluid, which articles also
30 can be used to deliver probiotic bacteria to these areas. The invention mainly refers to disposable sanitary articles, which means articles that are not intended to be laundered or otherwise restored or reused as a sanitary article after use. Examples of disposable sanitary articles include feminine hygiene products such as sanitary napkins, panty liners, sanitary panties, feminine inserts and tampons; diapers and pant diapers for infants and incontinent
35 adults; incontinence pads; diaper inserts and the like.

19

DETAILED DESCRIPTION

The present invention pertains to solve the problem of growth, colonization and/or survival of pathogenic microorganisms in the urogenital area and/or in a sanitary article during use thereof.

5

This problem is in the present invention solved by applying an extracellular product of at least one probiotic bacterium and/or at least one probiotic bacterium and at least one additive, in the form an organic acid having a pKa value not exceeding 5.5 and/or a salt thereof, together forming a microbe-inhibiting composition, to a sanitary article.

10

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 probiotic bacterial strains in a microbe-inhibiting composition according to the present invention.

15

The prior art discloses sanitary articles only comprising probiotic bacteria or extracellular products thereof. However the microbe-inhibiting effect is not always completely satisfying and there are many problems to overcome when producing and storing sanitary articles containing viable micro-organisms as previously discussed.

20

In the present invention it has been found that by adding an additive, in the form an organic acid having a pKa value not exceeding 5.5, preferable not exceeding 5, and/or a salt thereof, to a probiotic bacteria or extracellular products thereof, there is an surprisingly large increase in the inhibition of *Candida albicans* and several other micro-organisms such as for example

25

E.coli and *S. Saprophyticus*.

30

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

35

Fig. 4 and 5 show an exemplary embodiment of a sanitary napkin 1 which comprises a liquid permeable topsheet 2, a backsheet 3 and an absorbent structure 4 enclosed there between. The liquid permeable topsheet 2 can be composed of a nonwoven material, e.g. spunbonded, meltblown, carded, hydroentangled, wetlaid etc. Suitable nonwoven materials can be composed of natural fibers, such as woodpulp or cotton fibres, manmade fibres, such as

polyester, polyethylene, polypropylene, viscose etc. or from a mixture of natural and manmade fibres. The topsheet material may further be composed of tow fibres, which may be bonded to each other in a bonding pattern, as e.g. disclosed in EP-A-1 035 818. Further examples of topsheet materials are porous foams, apertured plastic films etc. The materials suited as topsheet materials should be soft and non-irritating to the skin and be readily penetrated by body fluid, such as urine or menstrual fluid.

The backsheet 3 may consist of a thin plastic film, e.g. a polyethylene or polypropylene film, a nonwoven material coated with a liquid impervious material, a hydrophobic nonwoven material, which resists liquid penetration. Laminates of plastic films and nonwoven materials may also be used. The backsheet material is preferably breathable so as to allow vapour to escape from the absorbent structure, while still preventing liquids from passing through the backsheet material.

The topsheet 2 and the backsheet 3 have a somewhat greater extension in the plane than the absorbent structure 4 and extend outside the edges thereof to form projecting portions 5. The layers 2 and 3 are connected to each other within the projecting portions 5, e.g. by gluing or welding by heat or ultrasonic. The topsheet and/or the backsheet may further be attached to the absorbent structure by any method known in the art, such as adhesive or welding by heat or ultrasonic. The absorbent structure may also be unattached to the topsheet and/or the backsheet.

Fastening means in the form of a region 6 of an adhesive is provided on the side of the backsheet facing away from the wearer during use. The adhesive may releasably attach to the undergarment of the wearer. A release paper 7 protects the adhesive region 6 before use. The adhesive region 6 may have any suitable configuration, such as elongate or transverse strips, dots, full-coated areas etc.

In other embodiments (not illustrated) of sanitary articles according to the invention other types of fasteners, like friction fasteners, tape tabs or mechanical fasteners like hook-and-loop fasteners etc may be used to fasten the articles to the underwear or around the waist of the wearer. Some sanitary articles are in the form of pants and therefore do not need special fastening means. In other cases the sanitary article is worn in special elastic pants without the need for additional fasteners.

The absorbent structure 4 can be of any conventional kind. Examples of commonly occurring absorbent materials are cellulosic fluff pulp, tissue layers, highly absorbent polymers (so

21

called superabsorbents), absorbent foam materials, absorbent nonwoven materials or the like. It is common to combine cellulosic fluff pulp with superabsorbents in an absorbent structure. It is also common to have absorbent structures comprising layers of different material with different properties with respect to liquid acquisition capacity, liquid distribution
5 capacity and storage capacity. This is well-known to the person skilled in the art and does therefore not have to be described in detail. The thin absorbent bodies, which are common in today's sanitary articles, often comprise a compressed mixed or layered structure of cellulosic fluff pulp and superabsorbent. The size and absorbent capacity of the absorbent
10 structure may be varied to be suited for different uses such as sanitary napkins, pantyliners, adult incontinence pads and diapers, baby diapers, pant diapers, etc. In some cases the sanitary articles are in the form of a feminine insert or an incontinence insert with substantially no absorbing function at all, the main function for these article is instead to carry and possibly deliver a for example health promoting substance. Examples on inserts are a nonwoven layer, a perforated plastic film or a foam layer, or laminates thereof, all preferably
15 with means for attachment to a garment. Said insert can optionally comprise a back sheet 3.

An object of the present invention is to provide sanitary articles, such as sanitary napkins, panty-liners, diapers, incontinence guards etc. suitable for absorbing bodily fluids and simultaneously release a microbe-inhibiting composition 8 that is to be transferred to the skin,
20 or alternatively, in order to inhibit the growth of unwanted microorganisms in the sanitary article itself during use of the article.

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

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
30 strains as long as the above function and the objectives of the probiotic bacteria are fulfilled.

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 lactic acid increases the acidity of the skin mucosa which helps in preventing the growth, colonization and survival of
35 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

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 probiotic bacteria useful in a microbe-inhibiting composition of this invention are all members of the *Lactobacillus*, *Lactococcus* or *Pediococcus*, which are efficient lactic 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*, *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.

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): 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 seen as limiting for the present invention. It is intended that any probiotic bacteria may be used in the composition.

In one embodiment of the present invention when the microbe-inhibiting composition comprises an extracellular product and at least one of said additives, 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 the probiotic bacteria is preferably not present in the microbe-inhibiting composition in an amount higher than 100 CFU/ml and more 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 micro-organism.

The extracellular product of the present invention is obtained from a bacterial culture.

- 5 Bacteria suitable for the present invention secrete products having antimicrobial activity 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 the extracellular products comprised therein. An example of how the
10 extracellular product may be prepared is described under Example 3.

- 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
15 example chromatography, crystallisation or distillation and used separately or in combination 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
20 additive this should of course be made from a product safety point of view. The organic acids 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 wearer of the sanitary article, 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
25 the salts thereof will mainly be in their acid forms. This means that the additive will not be 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 bacteria 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
30 5. If the organic acid suitable for the present invention have more than one pKa value, 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 and/or the corresponding salts should be sufficiently high so that said additive can be
35 dissolved in the supernatant. Alternatively, when the additive is in a dry/dried form on the sanitary article the solubility of the additive should be of such nature that the additive rapidly comes into solution when contacted by the bodily fluids during use of the sanitary article.

24

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
5 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.

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

When a sanitary article of the present invention comprises probiotic bacteria these are typically provided in amounts of about 10^6 - 10^{11} CFU of viable probiotic bacteria per article. Typically the bacteria are in the form of cells or spores which are provided in a suspension
15 which is applied to the sanitary article which is thereafter dried. Preferably, the sanitary article will comprise about 10^8 - 10^{10} CFU per sanitary article, although these amounts may vary depending on the specific application, product formulation and intended use.

If the sanitary article instead of probiotic bacteria comprises the extracellular product, the
20 sanitary article typically comprises about 0,5 - 100 ml and preferably comprises 1 - 10 ml of the extracellular product.

In combination with the extracellular product said additive is typically added with a concentration of 5 - 100 mM. When combined only with the probiotic bacteria said additive is
25 typically added in amounts of 0.15mg - 2.6g and preferably 0.3mg - 0.3g to the sanitary article, although these amounts may vary depending on the specific application, product formulation and intended use.

The microbe-inhibiting composition may be directly applied to the sanitary article according to
30 the invention or provided in a pharmaceutically acceptable carrier which enhances the transfer of the microbe-inhibiting composition, examples of such includes sticky agents such as petrolatum, an oil or a wax.

In one preferred embodiment the microbe inhibiting composition is in the form of a
35 suspension, said suspension may be applied directly to the sanitary article by impregnation, spraying, printing or the like, whereafter the sanitary product is dried, by for e.g. heat drying.

- 25
- In another preferred embodiment the microbe-inhibiting composition is in the form of a powder. The powder may be mixed into a pharmaceutically acceptable carrier as described above or be directly applied to the sanitary article as a powder, in this latter case preferably to the absorbent structure or between the absorbent structure and the top sheet, as
- 5 illustrated in Fig. 5. In the case where the powder is mixed with a pharmaceutically acceptable carrier, this mixture may be applied to the sanitary article by impregnation, spraying, printing or the like, whereafter the sanitary article may be dried. A delivery device, meaning a separate pocket, possibly moisture impervious, attached to the top sheet of the sanitary article is also an advantageous way of deliver said microbe-inhibiting composition.
- 10 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.
- 15 The microbe inhibiting composition may be placed anywhere on the sanitary article as long as it comes in contact with the user of the sanitary article when in use. The microbe inhibiting composition 8 is preferably located on the top sheet of the sanitary article as shown in Fig. 4.
- In an alternative preferred embodiment, shown in Fig. 5, the microbe inhibiting composition 8 is located between the top sheet 2 and the absorbent structure 4.
- 20 When the sanitary article 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.
- 25 A further possibility is to deliver said microbe-inhibiting composition separately in a form which is convenient to apply directly to an absorbent article by the user, for example in its liquid form, as a powder, dispersed in a lotion, dispersed in oil. The means for applying said microbe-inhibiting composition could be a spray, a roll-on device, a tube, a bottle, an ampull,
- 30 a strip or a stick.
- In a still further aspect of the invention the microbe-inhibiting composition is used in combination with the sanitary article according to the invention.

Another aspect of the invention is to preparing a sanitary article comprising applying said microbe-inhibiting composition to said sanitary article.

EXPERIMENTAL SECTION

5 Test 1

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
10 propionate.

Method

Yeast strain

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

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
20 minimum of 20 hrs).

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
25 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.

30 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
35 water is about one third of the specified volume before air drying) and 200µl were transferred to 96-wells micro titre plates.

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.

- 5 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.

- 10 *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.

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.

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

20

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
- 25 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. The best effect was achieved when propionic acid was added to the extracellular product of LB931 (no growth at all).

30

Test 2

- 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
- 35 were sodium acetate, succinic acid, sodium propionate, acetic acid.

28

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
5 women with urinary tract infections.

Control

As a control pure dM17s broth (M17 broth modified by addition of MnSO₄ (final conc. 0,04 g/l), MgSO₄ (final conc. 0,2 g/l) and glucose (final conc. 20 g/l) was used. 200µl was added to
10 96-wells micro titre plates.

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
15 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
20 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.
25

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.
30

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.
35

29

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

- 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

- Ess-1 was grown to stationary phase in dMRSSs 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 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 calculated mean value being presented. Wells containing strong growth of *Candida* in pure dMRSSs-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 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 combination with growing cells of *Lactobacillus plantarum* LB 931.

5

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
10 agar from Merck contains 5 g sodium acetate per litre agar. M17 (Oxoid) is a similar 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
15 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
20 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).

25 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.

- 5 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.

10 EXAMPLES

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

Example 1: Isolation and typing of Ess-1

- 15 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.

Method

20 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.

25

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

- 30 (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).

32

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.

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 CEQ™DTCS-Quickstart Kit (Beckam Coulter) following the manufacturers instructions. Sequence reaction products were electrophoresed using the CEQ™8000 Genetic Analysis System.

5

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.*).

10

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.

15 **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 vaccinofermentum</i> DSM 20634	87.2

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*.

20

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 freeze-dried and milled.

25

34

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 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. 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.

Example 4: Formulations

20 Anti Candida panty liner

The product is based on a standard marketed panty liner, such as Libresse® extra liners (sold by SCA Hygiene Products AB), to which the extracellular product of Ess-1 in combination with an additive, is added according to the following: 10ml of the extracellular product of Ess-1 is evaporated to 1ml to which 3.7mg of propionic acid is added. The extracellular product with propionic acid is printed on the surface of the panty liner which is dried before packaging.

Light incontinence pad with reduced bacterial growth and odour control

The product is based on a standard marketed light incontinence pad, such as Tena® Lady Normal (sold by SCA Hygiene Products AB), to which the extracellular products of LB931 is added according to the following: 100ml of the extracellular product of LB931 are mixed with 1g of citric acid. The mixture is evaporated and dried and thereafter the powder is homogenously mixed in the absorbent core of the pad.

35 Light liner for improved genital hygiene

The product is based on a standard marketed panty liner, such as Libresse® light liners (sold by SCA Hygiene products AB), to which the extracellular products of both Ess-1 and LB931

35

are added according to the following: 5ml of the extracellular product of Ess-1 and 5 ml of the extracellular product of LB931 are mixed and evaporated to 1ml, to which 4.1mg of sodium acetate are added. The mixture is evaporated and dried and the powder is mixed with 0.1g of silicone wax and finally printed in the centre of the top sheet of the liner.

5

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.

10

Applicant's or agent's file reference PD53841PC00	International application No. PCT/SE 2006 / 0 0 1 3 1 3
--	---

**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 10 , line 20-23	
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 Milka Kamppinen	Authorized officer

35

CLAIMS

1. A sanitary article (1) such as a sanitary napkin, a panty liner, an incontinence protector, a diaper, an incontinence pad, a feminine insert, a tampon, or the like comprising a top sheet (2), said sanitary article (1) comprising a microbe-inhibiting composition (8), said microbe-inhibiting composition comprising an extracellular product of at least one probiotic bacterium and/or 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.
2. The sanitary article according to claim 1, wherein said pKa value does not exceed 5.
3. The sanitary article according to any of claims 1 or 2, wherein said extracellular product is in the form of a supernatant, obtained by centrifugation or filtration of a culture of a probiotic bacterium.
4. The sanitary article according to any of claims 1 or 2, wherein said microbe-inhibiting composition (8) comprises at least one probiotic bacterium and at least one of said additives.
5. The sanitary article according to any of claims 1 - 3, wherein said microbe-inhibiting composition (8) comprises at least one probiotic bacterium, an extracellular product of at least one probiotic bacterium and at least one of said additives.
6. The sanitary article according to any of claims 1 - 3, wherein said microbe-inhibiting composition (8) is substantially free from probiotic bacteria, preferably not present in an amount higher than 100 CFU/ml and more preferably not higher than 10 CFU/ml.
7. The sanitary article according to any of the preceding claims, wherein said probiotic bacterium is a lactic acid producing bacterium.
8. The sanitary article according to claim 7, wherein said lactic acid producing bacterium is *Lactobacillus plantarum* LB 931 or *Lactobacillus fermentum* Ess-1 or a combination thereof.

38

9. The sanitary article according to any of the preceding claims, 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.
10. The sanitary article according to claim 9, wherein said salt is a sodium salt; preferably sodium propionate and/or sodium acetate.
11. The sanitary article comprising a microbe-inhibiting composition (8) according to any of the preceding claims, wherein the microbe-inhibiting composition (8) is located on the top sheet (2).
12. A kit comprising said microbe-inhibiting composition (8) as defined in claims 1-10 and said sanitary article (1).
13. The kit according to claim 12, wherein said microbe-inhibiting composition (8) is provided in an ampoule, a bottle, a tube, a roll-on device, as a stick or a spray.
14. Use of the microbe-inhibiting (8) composition according to any of claims 1-10 in combination with said sanitary article (1).
15. Method of preparing a sanitary article (1) according to any of claims 1-11 comprising applying said microbe-inhibiting composition (8) to said sanitary article (1).

1/7

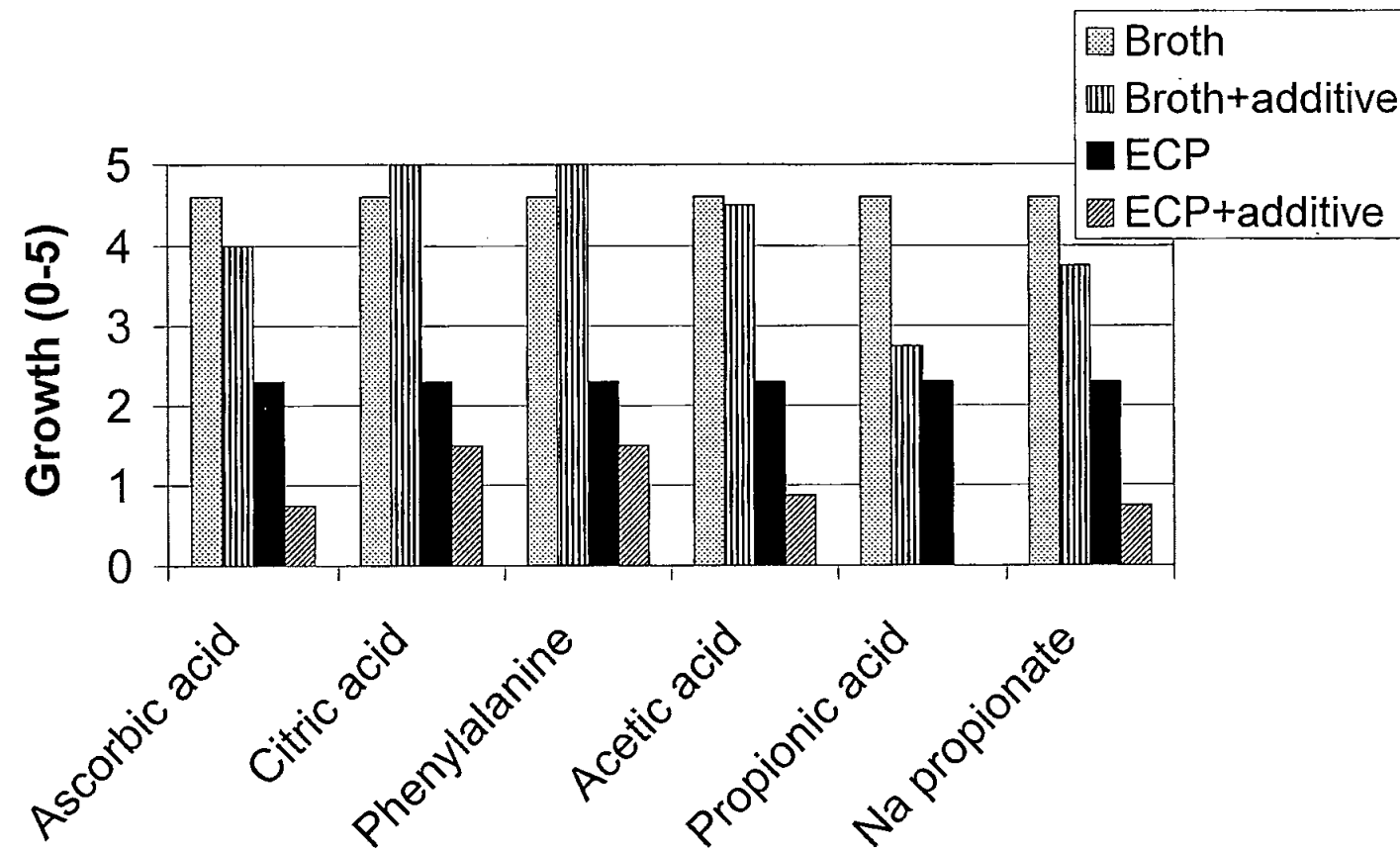


Fig. 1

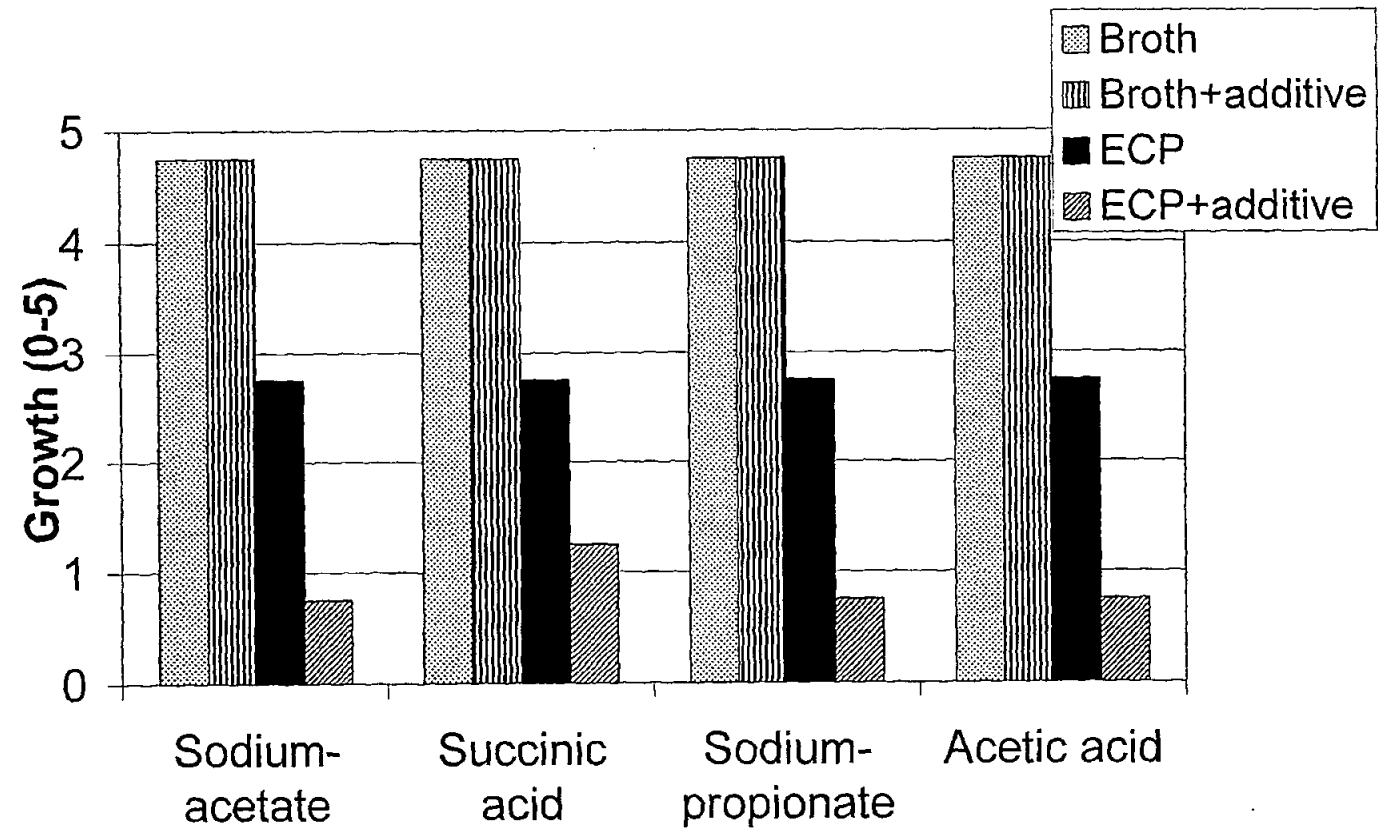


Fig. 2A

3/7

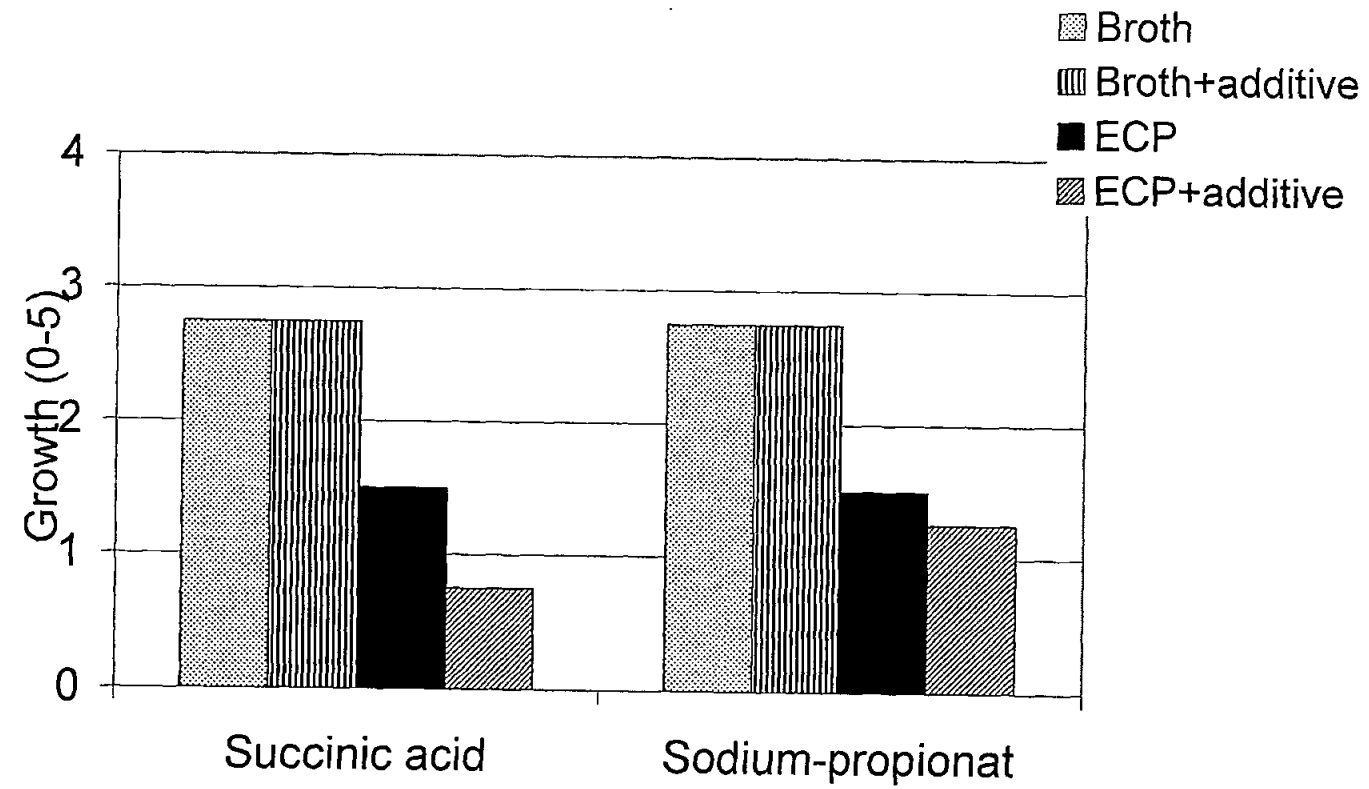


Fig. 2B

f

4/7

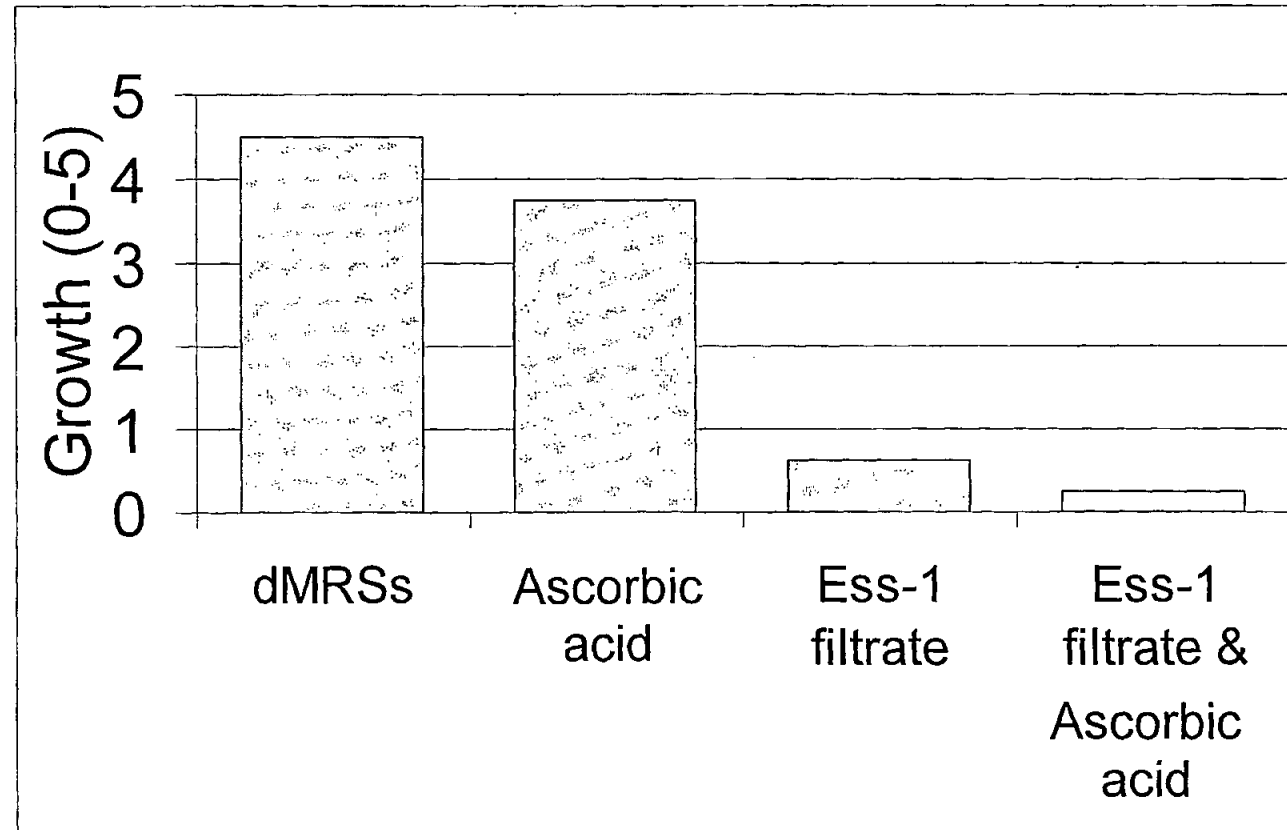


Fig. 3A

27

5/7

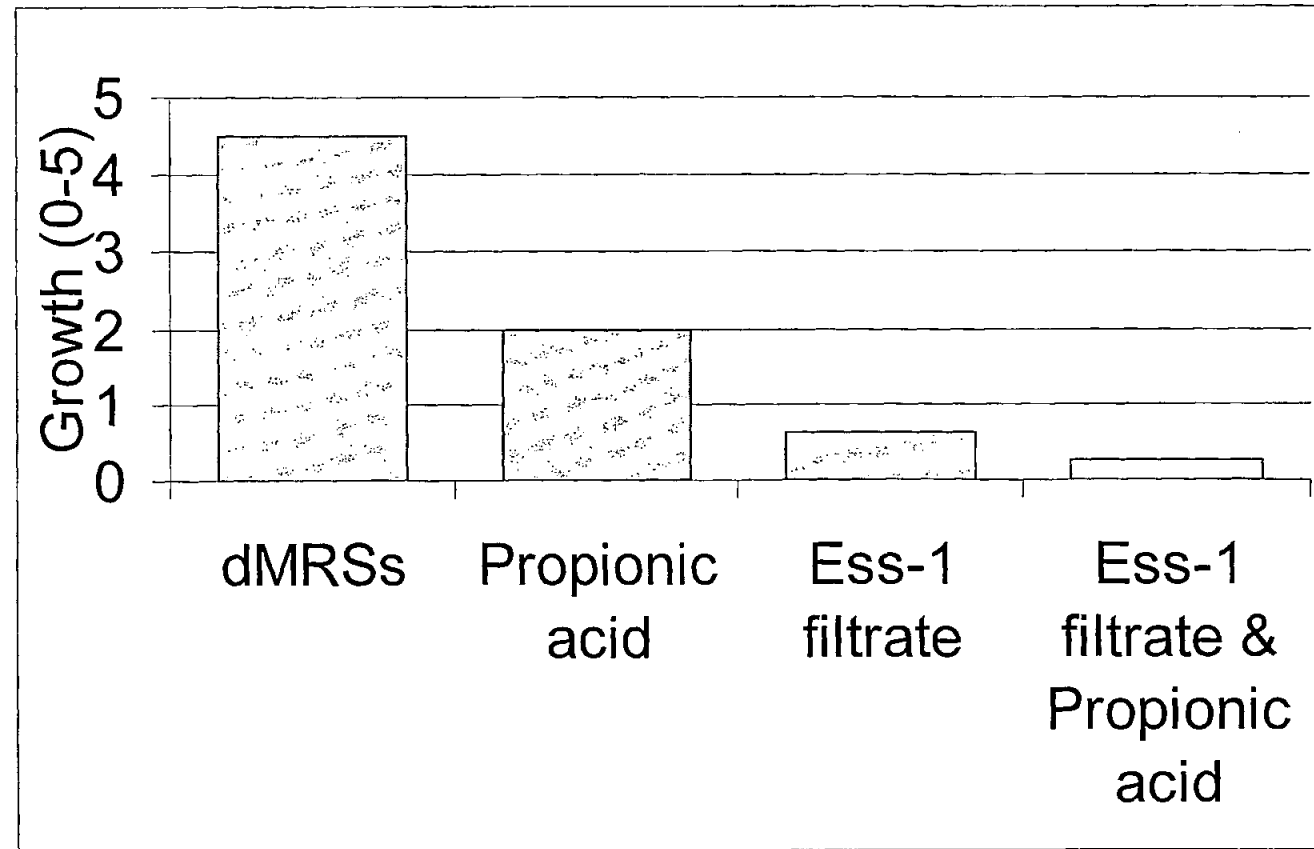


Fig. 3B

AB

48

6/7

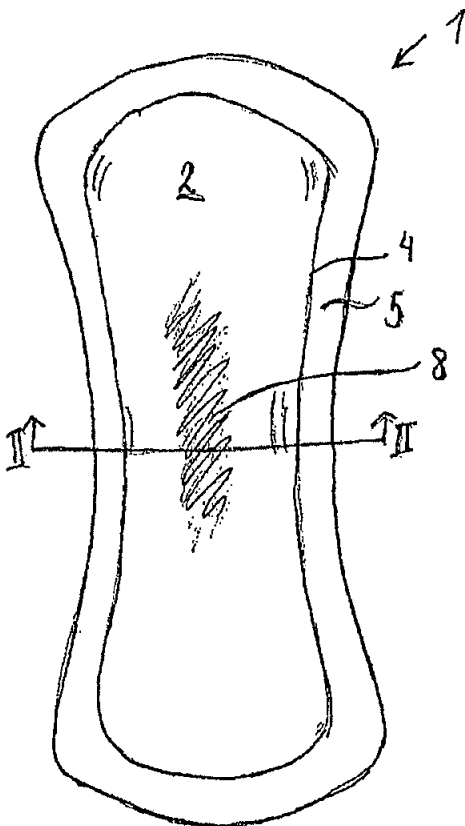


Fig. 4a

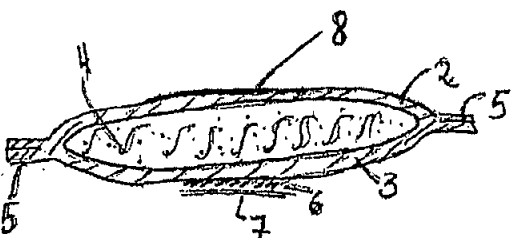


Fig. 4b

45

717

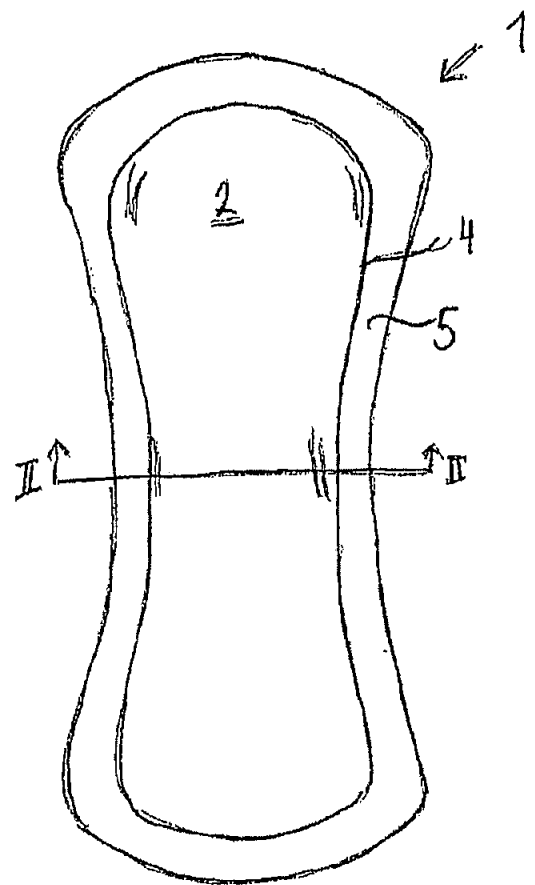


Fig. 5a

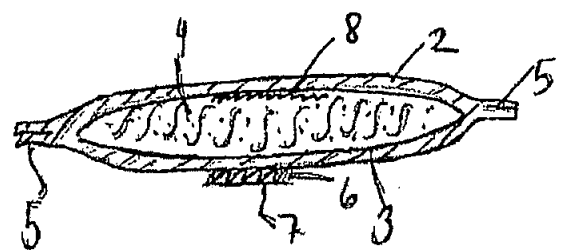


Fig. 5b

ARTÍCULO SANITARIO QUE COMPRENDE UNA COMPOSICIÓN QUE INHIBE
MICROBIOS

CAMPO TÉCNICO

5

La presente invención se relaciona con un artículo sanitario, tal como toallas sanitarias, recubrimientos de pantaloncito, protectores de incontinencia, pañales, tampones, o similares, que comprende un producto extracelular de por lo menos una bacteria probiótica y/o por lo menos una bacteria probiótica y por lo menos un
10 aditivo seleccionado dado un efecto inhibitorio sinérgico sobre *Candida albicans* u otros organismos no deseados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 En el área urogenital habita un ecosistema microbiano complejo que comprende más de 50 diferentes especies de bacterias (Hill et al., Scand. J. Urol. Nephrol. 1984;86 (suppl.) 23-29). Las especies dominantes para las mujeres fértiles en esta
área son las bacterias que producen ácido láctico que pertenecen al género *Lactobacillus*. Estos miembros que producen ácido láctico son importantes para
20 retener una flora microbiana saludable en estas áreas, y actúan como bacterias probióticas con un efecto antagonista contra las especies microbianas patógenas. Las bacterias que producen ácido láctico inhiben el crecimiento y la colonización de otros microorganismos al ocupar nichos adecuados para la colonización, al
formar biopelículas y competir por los nutrientes disponibles, excluyendo de esta
25 manera la colonización por microorganismos dañinos. También, la producción de peróxido de hidrógeno, inhibe sustancias específicas, tales como bacteriocinas, y

ácidos orgánicos (que incluyen ácido láctico y ácido acético) que disminuyen el pH, que inhibe el crecimiento y la colonización mediante otros microorganismos.

El ecosistema microbiano de un individuo saludable se puede afectar por el uso de
5 antibióticos, durante los cambios hormonales, tal como durante el embarazo o el uso de contraceptivos con estrógeno, durante la menstruación, después de la menopausia, en personas que sufren de diabetes, etc. También, los microorganismos se pueden esparcir desde el ano al área urogenital, esto produce como resultado una afectación de la flora microbiana normal y deja al individuo
10 susceptible a infecciones microbianas tal como la vaginitis, las infecciones por candida, las infecciones del tracto urinario y las 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
15 están en particular riesgo debido a su más corta distancia entre el ano y el tracto urogenital; en riesgo están especialmente las mujeres jóvenes, quienes aún no han desarrollado bien la microflora en el área urogenital y las mujeres mayores, quienes en la mayoría de los casos ya no tienen flora protectora.

20 De manera similar al área urogenital, la piel está colonizada por una disposición de 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, provee al huésped con una defensa excelente contra los microbios invasores. El número de bacterias sobre la piel varía desde unos pocos
25 cientos por cm² sobre las superficies áridas desde el brazo anterior y posterior, a decenas de miles por cm² en las áreas húmedas tales como la axila y la pelvis. Esta flora normal juega un papel importante en evitar que organismos extraños

48

colonizan la piel, pero ésta requiere mantenerse en revisión, con el fin de evitar infecciones de la piel.

El *Staphylococcus aureus* es la causa más común de infecciones menores de la piel, tal como forúnculos o abscesos, así como también infecciones de heridas postoperatorias más serias. El tratamiento involucra el drenaje y éste usualmente es suficiente para lesiones menores, pero los antibióticos se pueden dar además cuando la infección es severa y el paciente tiene fiebre.

10 El síndrome de choque tóxico es una infección sistémica causada por cepas de *S. aureus* que producen la toxina del síndrome de choque tóxico. La enfermedad se ha vuelto prominente a través de su asociación con el uso del tampón por mujeres saludables, pero no está confinado a mujeres y puede ocurrir como resultado de infección con *S. aureus* en sitios no genitales.

15

Otras infecciones comunes de la piel se originan por *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A). Los organismos se adquieren a través del contacto con otras personas con lesiones infectadas de la piel y pueden colonizar primero y multiplicarse sobre la piel normal antes de la invasión a través de rupturas menores del epitelio y del desarrollo de lesiones.

20

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

25 A la *Candida* le gustan los sitios de la piel que son húmedos y calientes y también coloniza rápidamente la piel dañada. De esta manera, la sequedad relativa en la mayoría de las áreas de la piel evita el crecimiento de *Candida*, que por lo tanto se

encuentra en números bajos en la piel saludable. La *Candida* también coloniza la mucosa oral y vaginal y el sobre crecimiento puede dar como resultado la enfermedad en estos sitios. La *C. albicans* se asocia con la dermatitis de pañal. Un estudio ha mostrado que la *C. albicans* indujo lesiones que están influenciadas de manera notoria por el pH, un pH de la piel más bajo produce menos lesiones (B. Runeman, Acta Derm Venereol 2000; 80: 421-424).

Una manera de reducir estos problemas con la clase de infecciones descritas anteriormente es tener una buena higiene personal. Sin embargo, el uso excesivo de agentes de limpieza no solamente disminuye la cantidad de microbios dañinos, sino también daña la flora microbiana benéfica, haciéndola de nuevo susceptible a especies patógenas que colonizan y causan infecciones. Alternativamente, la administración de bacterias que producen ácido láctico al área urogenital y la piel, con el fin de competir con especies patógenas y facilitar el restablecimiento y mantenimiento de una flora microbiana benéfica en estas áreas, se ha encontrado que es un medio exitoso para tratar y evitar infecciones microbianas.

Se ha sugerido que las bacterias que producen ácido láctico se pueden suministrar por vía de productos absorbentes, tal como pañales, toallas sanitarias, guardas de incontinencia, recubrimientos de pantaloncito y tampones, como se describe en, por ejemplo, la WO 92/13577, WO 97/02846, WO 99/17813, WO 99/45099 y WO 00/35502.

Se han sugerido también otras maneras de suministrar bacterias que producen ácido láctico, tal como un tisú de higiene que permite tanto la limpieza como el cuidado de la piel en el área urogenital y el suministro de bacterias que producen ácido láctico prebiótico, por ejemplo, la WO 04/060416.

Un problema principal de suministrar productos destinados a ser utilizados para la transferencia de bacterias que producen ácido láctico, es que las bacterias tienen que retener la viabilidad durante el transporte y almacenamiento de los productos.

5 Las bacterias que producen ácido láctico pierden rápidamente viabilidad bajo condiciones semihúmedas, y es por lo tanto importante que las bacterias no se expongan a humedad durante el almacenamiento. Una manera de solucionar parcialmente este problema en los productos absorbentes provistos con bacterias que producen ácido láctico ha sido suministrar los productos con bacterias, secar
10 dichos productos para remover la mayor parte de la humedad en ellos y suministrar el producto en paquetes impermeables a la humedad (WO99/17813).

La WO 00/61201 describe un producto sanitario que contiene una cantidad efectiva de bacterias probióticas, viables, no patógenas, tales como *Bacillus*
15 *coagulans*, o un producto extracelular de éstas.

La EP 1140226 describe la combinación de una sustancia que regula el pH en la forma de un material superabsorbente parcialmente neutralizado con bacterias que producen ácido láctico.

20

En vista de la técnica anterior subsiste la necesidad de artículos sanitarios con un efecto prebiótico y/o probiótico mejorado, cuyos artículos son fáciles de almacenar y transportar.

25 **RESUMEN DE LA INVENCION**

En vista de que esta técnica anterior es un objeto de la presente invención suministrar un artículo sanitario que comprende una composición que inhibe los microbios con un efecto probiótico y/o prebiótico mejorado. También es un objeto de la presente invención que dicho artículo sanitario que comprende una
5 composición que inhibe los microbios se transporte y almacene fácilmente sin que la composición que inhibe los microbios pierda su balance de micro-flora y su función promotora de la salud.

Los problemas anteriormente definidos se resuelven por medio de la presente
10 invención mediante un artículo sanitario tal como toallas sanitarias, recubrimientos de pantaloncito, protectores de incontinencia, pañales, tampones o similares que comprenden una composición que inhibe los microbios que comprende un producto extracelular de por lo menos una bacteria probiótica y/o por lo menos una bacteria probiótica y por lo menos un aditivo, en la forma de un ácido orgánico,
15 que tiene un valor pKa que no excede 5.5, y/o una sal de éstos, que da un efecto probiótico y/o prebiótico sinérgico.

En un aspecto dicho valor pKa no excede 5.

20 De acuerdo con la presente invención dicho producto extracelular que inhibe los microbios es un sobrenadante obtenido mediante filtración o centrifugación de un cultivo de una bacteria prebiótica.

En una modalidad de la invención dicha composición que inhibe los microbios está
25 sustancialmente libre de bacterias probióticas, preferiblemente no presentes en una cantidad mayor de 100 CFU/ml y más preferiblemente no mayor de 10 CFU/ml.

En otra modalidad de la invención dicha composición que inhibe los microbios comprende por lo menos una bacteria probiótica y por lo menos uno de dichos aditivos.

5

En una modalidad adicional de la invención dicha composición que inhibe los 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.

10

En un aspecto de la invención la bacteria probiótica es una bacteria que produce ácido láctico.

15

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

20

En un aspecto de la invención dicho aditivo se escoge de ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caprónico, ácido succínico y/o sales de éstos. Preferiblemente dicho aditivo se elige de ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, fenilalanina, ácido cítrico o ácido succínico, ácido ascórbico, y/o una sal de éstos. Más preferiblemente dicho aditivo se elige de ácido ascórbico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico y/o una sal de éstos.

25

53

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

En razón a que la composición que inhibe los microbios de la invención que se
5 combina con bacterias probióticas y/o un producto extracelular de éstas y un
aditivo da un efecto sinérgico inesperado a la inhibición de los microorganismos
patógenos, un artículo sanitario de acuerdo con la invención que comprende esta
composición que inhibe los microbios tiene un efecto probiótico y/o prebiótico
mejorado. Además el artículo sanitario de la presente invención es fácil de
10 transportar y almacenar sin que la composición que inhibe los microbios pierda
sus propiedades benéficas.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

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

20

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

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

54

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

5 La Fig. 4a es una vista de planta de un artículo sanitario de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 4b es una vista en sección transversal a través del artículo sanitario de acuerdo con la línea II-II en la Fig. 4a.

10

La Fig. 5a es una vista de planta de un artículo sanitario de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 5b es una vista en sección transversal a través del artículo sanitario de acuerdo con la línea II-II en la Fig. 5a.

15

DEFINICIONES

Probióticos/probiótico en el presente contexto se relaciona con microorganismos vivos que confieren un beneficio saludable cuando se administran en cantidades adecuadas a un huésped.

20

Por "bacterias que producen ácido láctico" se significa una bacteria que produce ácido láctico. Las bacterias preferidas que producen ácido láctico para el objeto de la presente invención incluyen bacterias del género *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Pediococcus*. Preferiblemente la bacteria seleccionada utilizada es de las especies *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*,

25



Lactobacillus acidophilus o *Lactobacillus plantarum*. Más preferiblemente las cepas bacterianas se seleccionan de *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus fermentum*. Aún más preferiblemente la bacteria que produce ácido láctico es *Lactobacillus plantarum* LB 931 (depósito No. (DSMZ): DSM 11918) y

5 *Lactobacillus fermentum* Ess-1, (depósito No. (DSMZ): DSM 17851).

Los prebióticos/prebiótico en el presente contexto se relaciona con sustancias que promueven una microflora balanceada cuando se administran en cantidades adecuadas a un huésped. Ejemplos son los nutrientes para bacterias probióticas,

10 sustancias que promueven la adhesión al huésped para bacterias probióticas, sustancias que regulan el pH y productos extracelulares de bacterias probióticas.

Por inhibición de microbios se entiende la inhibición del crecimiento, colonización y/o supervivencia de otros microorganismos.

15

Por producto extracelular se significan productos secretados en cultivos de bacterias probióticas cuyos productos extracelulares tienen un efecto antimicrobiano. El producto extracelular se obtiene de cultivos de células bacterianas mediante por ejemplo, filtración, centrifugación, o ambos, y el

20 sobrenadante resultante que comprende el producto extracelular posee actividad antimicrobiana útil en una composición que inhibe los microbios.

El término "artículo sanitario" se refiere a los productos que se colocan contra la piel del portador para absorber y contener exudados del cuerpo, similares a orina,

25 heces y fluido de menstruación, cuyo artículo también se puede utilizar para suministrar bacterias probióticas a estas áreas. La invención se refiere principalmente a artículos sanitarios desechables, lo que significa artículos que no



están destinados a ser lavados o restablecidos de otra manera o reutilizados como artículo sanitario después de uso. Ejemplos de artículos sanitarios desechables incluyen productos higiénicos femeninos tales como toallas sanitarias, recubrimientos de pantaloncitos, pantaloncitos sanitarios, insertos femeninos y tampones; pañales y pañales pantalón para niños y adultos incontinentes; almohadillas de incontinencia; insertos de pañal y similares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

10 La presente invención pretende resolver el problema del crecimiento, colonización y/o supervivencia de microorganismos patógenos en el área urogenital y/o en un artículo sanitario durante el uso de éstos.

Este problema está en la presente invención resuelto al aplicar un producto extracelular de por lo menos una bacteria probiótica y/o 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 éstos, formando juntos una composición que inhibe microbios, a un artículo sanitario.

20 Se debe notar que por supuesto una combinación de dos o más cepas bacterianas probióticas se pueden utilizar para producir el producto extracelular de la invención. También, es por supuesto posible utilizar una combinación de por lo menos dos cepas bacterianas probióticas en una composición que inhibe los microbios de acuerdo con la presente invención.

25

La técnica anterior describe artículos sanitarios que solamente comprenden bacterias probióticas o productos extracelulares de éstos. Sin embargo, el efecto

57

que inhibe los microbios no es siempre completamente satisfactorio, y existen muchos problemas a solucionar cuando se producen y almacenan artículos sanitarios que contienen microorganismos viables como se discutió previamente.

- 5 En la presente invención se ha encontrado que al agregar un aditivo, en la forma de un ácido orgánico que tenga un valor pKa que no excede 5.5, preferiblemente que no exceda 5, y/o una sal de éstos, a una bacteria probiótica o productos extracelulares de ésta, existe un incremento sorprendentemente grande en la inhibición de *Candida albicans* y varios otros microorganismos, tales como por
- 10 ejemplo *E. coli* y *S. Saprofyticus*.

- La presente invención en algunas modalidades también tiene como objeto disminuir los problemas con la retención del efecto que inhibe los microbios del artículo sanitario durante almacenamiento. En razón a que todos los efectos en
- 15 algunas modalidades y por lo menos parte de los efectos en otras modalidades vienen de una composición que comprende sustancialmente organismos no vivos, el problema de mantener los microorganismos viables y así funcionales se elimina o disminuye.

- 20 La Fig. 4 y 5 muestran una modalidad de ejemplo de una toalla sanitaria 1 que comprende una lámina superior permeable a los líquidos 2, una lámina posterior 3 y una estructura absorbente 4 incluida entre estos. La lámina superior permeable a los líquidos 2 puede estar compuesta de un material no tejido, por ejemplo "spundoned", "meltblown", cardada hidroentramada, puesta en húmedo, etc. Los
- 25 materiales no tejidos adecuados pueden estar compuestos de fibras naturales, tales como pulpa de madera o fibras de algodón, fibras hechas por el hombre, tales como poliéster, polietileno, polipropileno, viscosa etc., o de una mezcla de

fibras naturales y hechas por el hombre. El material de la lámina superior puede estar compuesto además de fibras de estopa, que se pueden unir una a la otra en un patrón de unión, como por ejemplo, se describió en la EP-A-1 035 818. Ejemplos adicionales de materiales de lámina superior son espumas porosas, películas plásticas con aberturas, etc. Los materiales adecuados como materiales de lámina superior deben ser suaves y no irritantes a la piel y ser fácilmente penetradas por fluidos corporales, tales como orina o fluido menstrual.

La lámina posterior 3 puede consistir de una película plástica delgada, por ejemplo, una película de polietileno o polipropileno, un material no tejido recubierto con un material impermeable a los líquidos, un material no tejido hidrófobo, que resiste la penetración de líquidos. También se pueden utilizar laminados de películas plásticas y materiales no tejidos. El material de lámina posterior es preferiblemente respirable con el fin de permitir que el vapor escape de la estructura absorbente, aunque evitando aún que los líquidos pasen a través del material de la lámina posterior.

La lámina superior 2 y la lámina posterior 3 tienen un poco de mayor extensión en el plano que la estructura absorbente 4 y se extienden por fuera de los bordes de ésta para formar porciones proyectantes 5. Las capas 2 y 3 están conectadas una a la otra dentro de las porciones proyectantes 5, por ejemplo mediante engomado o soldado por calor o ultrasonido. La lámina superior y/o la lámina posterior pueden estar unidas además a la estructura absorbente mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como adhesivo o soldado mediante calor o ultrasonido. La estructura absorbente también puede estar no unida a la lámina superior y/o la lámina posterior.

59

Los medios de aseguramiento en la forma de una región 6 de un adhesivo se suministran en el lado de la lámina posterior que enfrenta alejada al usuario durante el uso. El adhesivo puede estar unido liberablemente a la prenda interior del portador. Un papel de liberación 7 protege la región adhesiva 6 antes de uso.

- 5 La región adhesiva 6 puede tener cualquier configuración adecuada, tal como tiras elongadas o transversales, puntos, áreas recubiertas completas, etc.

- En otras modalidades (no ilustradas) de artículos sanitarios de acuerdo con la invención otros tipos de aseguradores, como aseguradores de fricción, lengüetas
- 10 de cinta o aseguradores mecánicos similares a los aseguradores de gancho y argolla se pueden utilizar para asegurar artículos a las prendas interiores o alrededor de la cintura del portador. Algunos artículos sanitarios tienen la forma de pantaloncitos y por lo tanto no requieren medios de aseguramiento especiales. En otros casos el artículo sanitario es portado en pantalones elásticos especiales sin
- 15 la necesidad de aseguradores adicionales.

- La estructura absorbente 4 puede ser de cualquier clase convencional. Ejemplos de materiales absorbentes de ocurrencia común son pulpa de lanilla celulósica, capas de tisú, polímeros altamente absorbentes (los así llamados
- 20 superabsorbentes), materiales de espuma absorbente, materiales no tejidos absorbentes o similares. Es común combinar pulpa de lanilla celulósica con superabsorbentes en una estructura absorbente. También es común tener estructuras absorbentes que comprenden capas de diferentes materiales con diferentes propiedades con respecto a la capacidad de adquisición de líquido, a la capacidad
- 25 de distribución de líquido y a la capacidad de almacenamiento. Esto es bien conocido por la persona experta en la técnica y por lo tanto no tiene que describirse en detalle. Los cuerpos absorbentes delgados, que son comunes en

60

los artículos sanitarios de hoy, comprenden a menudo una mezcla comprimida o estructura en capas de pulpa de lanilla celulósica y superabsorbente. El tamaño y la capacidad absorbente de la estructura absorbente pueden variar para ser adecuada para diferentes usos tales como toallas sanitarias, recubrimientos de pantaloncitos, almohadillas de incontinencia para adulto y pañales, pañales para nene, pañales pantalón, etc. En algunos casos los artículos sanitarios están en la forma de un inserto femenino o un inserto de incontinencia con una función sustancialmente no absorbente, la función principal de estos artículos es en su lugar llevar y posiblemente suministrar una por ejemplo sustancia promotora de la salud. Ejemplos sobre insertos son una capa no tejida, una película plástica perforada o una capa de espuma, o láminas de éstos, todas preferiblemente con medios de unión a una prenda. Dicho inserto puede comprender opcionalmente una lámina posterior 3.

Un objeto de la presente invención es suministrar artículos sanitarios, tales como toallas sanitarias, recubrimientos de pantaloncito, pañales, guardas de incontinencia, etc., adecuados para absorber los fluidos corporales y simultáneamente liberar la composición que inhibe los microbios 8 que se va a transferir a la piel, o alternativamente, con el fin de inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados en el artículo sanitario mismo durante el uso del artículo.

Se entiende que el artículo sanitario descrito anteriormente y mostrado en los dibujos solamente representa ejemplos no limitantes y que la presente invención no está limitada a éstos, pero se puede utilizar en cualquier tipo de artículos sanitarios como se definió anteriormente.

21

Las bacterias probióticas que son adecuadas para uso en la presente invención producen en la mayoría de los casos ácido y son en todos los casos no patógenas. Existen muchas bacterias adecuadas identificadas aquí adelante, aunque la invención no está limitada a especies y cepas bacterianas habitualmente conocidas en tanto que la función anterior y los objetivos de las bacterias probióticas se cumplen.

Una característica importante de las bacterias que producen ácido láctico probiótico es su capacidad para producir ácido láctico y en algunos casos también otros ácidos, dicho ácido láctico incrementa la acidez de la mucosa de la piel que ayuda a evitar el crecimiento, colonización y supervivencia de hongos y bacterias no deseados. Así, mediante el mecanismo de producción de ácido, estas bacterias probióticas inhiben el crecimiento de bacterias y hongos que compiten y son dañinos. Además características importantes de dichas bacterias es su capacidad de producir peróxido de hidrógeno y otras sustancias que inhiben los microbios y también su capacidad a adherir las superficies de las células y evitar de esta manera la adhesión de otras bacterias y hongos dañinos a estas superficies.

Las bacterias probióticas típicas útiles en la composición que inhibe los microbios de esta invención son todos miembros de *Lactobacillus*, *Lactococcus* o *Pediococcus*, que son productores eficientes de ácido láctico, y también incluyen miembros no patógenos del género *Bacillus*, todos miembros del género *Bifidobacterium*, y *Pseudomonas limbergii*, aunque ciertas especies son especialmente preferidas como se describe adelante.

25

Los miembros preferidos del género *Lactobacillus* incluyen *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cereale*,

Lactobacillus delbrukei, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasei*,
Lactobacillus jensenii, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*,
Lactobacillus salivarius, *Lactobacillus thermophilus*, *Lactobacillus paracasai* sp.
paracasai, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis* y
5 similares.

Se prefiere particularmente la bacteria novedosa *Lactobacillus fermentum* Ess-1 y
Lactobacillus plantarum LB 931. El LB 931 se ha encontrado previamente como
valioso para evitar y/o tratar infecciones urogenitales en la medida en que éste
10 inhibe el crecimiento de un número grande de microorganismos patógenos, en por
ejemplo la EP 1060240. El *Lactobacillus fermentum* Ess-1 (depósito No. (DSMZ):
DSM 17851) se depositó de acuerdo al Tratado de Budapest en el Deutsche
Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b,
D-38124 Braunschweig) (depositor Essum AB, Box 3160, SE 90304 Umeå,
15 Suecia, depositado en enero 6, 2006).

Se debe notar que aunque los ejemplos de adelante donde solamente se han
utilizado cepas de Lactobacilli, estas cepas bacterianas se deben ver como un
modelo para bacterias probióticas útiles en la práctica de la presente invención.
20 Por lo tanto los ejemplos de adelante no deben ser vistos como limitantes para la
presente invención. Se pretende que cualquier bacteria probiótica se pueda utilizar
en la composición.

En una modalidad de la presente invención cuando la composición que inhibe los
25 microbios comprende un producto extracelular y por lo menos uno de dichos
aditivos, dicha composición está sustancialmente libre de bacterias probióticas. Se
nota que es extremadamente difícil elaborar una composición que esté totalmente

63

libre de bacterias probióticas, por lo tanto la bacteria probiótica está preferiblemente no presente en la composición que inhibe los microbios en una cantidad mayor de 100 CFU/ml y más preferiblemente no mayor de 10 CFU/ml. Esta composición tiene la ventaja de menos requisitos estrictos de almacenamiento en razón a que el producto extracelular es más durable que el microorganismo vivo.

El producto extracelular de la presente invención se obtiene 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. Con el fin de obtener los productos extracelulares, los cultivos de célula se cosechan como se describió adelante y el sobrenadante se obtiene mediante centrifugación o filtración o ambos. El sobrenadante así obtenido tiene una actividad que inhibe los microbios debido a los productos extracelulares comprendidos allí. Un ejemplo de cómo se puede preparar el producto extracelular se describe bajo el Ejemplo 3.

El producto extracelular puede estar en la forma como cuando se obtuvo directamente del cultivo bacteriano pero también es posible concretar y/o purificar el sobrenadante adicional. Por purificación se significa que algunos de las sustancias que inhiben los microbios están aislados mediante por ejemplo cromatografía, cristalización o destilación y se utilizan separadamente o en combinación con otras sustancias aisladas.

El aditivo que se agrega a las bacterias probióticas y/o al producto extracelular en la presente invención está en la forma de un ácido orgánico o una sal de éstos. Cuando se selecciona dicho aditivo este debe por supuesto estar hecho desde el

64

punto de vista de seguridad del producto. Los ácidos orgánicos o las sales correspondientes deben ser de tal naturaleza que cuando se aplican sobre un artículo sanitario ellos no deben originar ninguna irritación de la piel al portador del artículo sanitario, por lo tanto el pKa del ácido orgánico, cuando se desarrolla la medición en agua a 25°C, debe ser no preferiblemente inferior de 2. Si los valores pKa en su lugar son demasiado altos, los ácidos orgánicos o las sales de éstos estarán principalmente en su forma ácida. Esto significa que el aditivo no se disociará suficientemente en un ión de hidrógeno y su forma aniónica desprotonada, que se cree que es un prerrequisito con el fin de obtener dicho efecto sinérgico que inhibe los microbios con las bacterias prebióticas y/o el producto extracelular de éstas. Por lo tanto el valor pKa para el ácido orgánico adecuado para la presente invención no debe ser inferior de 5.5, preferiblemente inferior de 5. Si el ácido orgánico adecuado para la presente invención tiene más de un valor pKa, por lo menos uno de estos valores debe 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 y/o las sales correspondientes deben ser suficientemente altas de tal manera que dicho aditivo se pueda disolver en el sobrenadante. Alternativamente, cuando el aditivo está en una forma seca/secada sobre el artículo sanitario la solubilidad del aditivo debe ser de tal naturaleza que el aditivo rápidamente entre en solución cuando entra en contacto con los fluidos corporales durante el uso del artículo sanitario.

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

S

de éstos. Preferiblemente dicho aditivo se selecciona de ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico o ácido succínico, y/o una sal de éstos. Más preferiblemente dicho aditivo se selecciona de ácido ascórbico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico y/o una sal de éstos.

En una modalidad de la invención la sal es una sal de sodio. Las sales especialmente preferidas son propionato de sodio y acetato de sodio.

- 10 Cuando un artículo sanitario de la presente invención comprende bacterias probióticas estas se suministran típicamente en cantidades de aproximadamente $10^6 - 10^{11}$ CFU de bacterias probióticas viables por artículo. Típicamente las bacterias están en forma de células o esporas las cuales se suministran en una suspensión que se aplica al artículo sanitario que se seca posteriormente.
- 15 Preferiblemente, el artículo sanitario comprende aproximadamente $10^8 - 10^{10}$ CFU por artículo sanitario, aunque estas cantidades pueden variar dependiendo de la aplicación específica, la formulación del producto y el uso pretendido.

- Si el artículo sanitario en lugar de bacterias probióticas comprende el producto extracelular, el artículo sanitario comprende típicamente aproximadamente 0,5 – 100 ml y preferiblemente comprende 1 – 10 ml de producto extracelular.

- En combinación con el producto extracelular dicho aditivo se agrega típicamente con una concentración de 5 – 100 mM. Cuando se combina solamente con las bacterias probióticas dicho aditivo se agrega típicamente en cantidades de 0.15mg – 2.6g y preferiblemente 0.3mg – 0.3g al artículo sanitario, aunque estas

cantidades pueden variar dependiendo de la aplicación específica, la formulación del producto y el uso pretendido.

La composición que inhibe los microbios se puede aplicar directamente al artículo sanitario de acuerdo con la invención o suministrarse en un portador farmacéuticamente aceptable que mejora la transferencia de la composición que inhibe los microbios, ejemplos de tales incluyen agentes pegajosos tales como petrolato, un aceite o una cera.

10 En una modalidad preferida la composición que inhibe los microbios está en la forma de una suspensión, dicha suspensión se puede aplicar directamente al artículo sanitario mediante impregnación, rociado, impresión o similar, posteriormente el producto sanitario se seca, mediante por ejemplo, secado por calor.

15

En otra modalidad preferida la composición que inhibe los microbios está en la forma de un polvo. El polvo se puede mezclar en un portador farmacéuticamente aceptable como se describió anteriormente o se puede aplicar directamente al artículo sanitario como un polvo, en este último caso preferiblemente a la estructura absorbente o entre la estructura absorbente y la lámina superior, como se ilustra en la Fig. 5. En el caso donde el polvo se mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable, esta mezcla se puede aplicar al artículo sanitario mediante impregnación, rociado, impresión o similar, posteriormente el artículo sanitario se puede secar. Un dispositivo de suministro, significa un bolsillo separado, posiblemente impermeable a la humedad, unido a la lámina superior del artículo sanitario es también una manera ventajosa de suministrar dicha composición que inhibe microbios.

20

25

El polvo de acuerdo con lo anterior se puede obtener al evaporar la suspensión anteriormente discutida tal como mediante secado con calor, secado por convección, secado por rociado, secado por congelamiento, o similar. Puede ser necesario además moldear la composición seca que inhibe los microbios con el fin de obtener un polvo fino. Las bacterias probióticas se secan preferiblemente por congelamiento.

La composición que inhibe los microbios se puede colocar en cualquier parte en el artículo sanitario en tanto que ésta entre en contacto con el usuario del artículo sanitario cuando está en uso. La composición que inhibe los microbios se localiza preferiblemente sobre la lámina superior del artículo sanitario como se muestra en la Fig. 4.

En una modalidad alternativa preferida, mostrada en la Fig. 5, la composición que inhibe los microbios se localiza entre la lámina superior y la estructura absorbente.

Cuando el artículo sanitario comprende bacterias probióticas vivas las bacterias se deben proteger de la humedad. El artículo sanitario puede estar por lo tanto herméticamente incluido en un paquete impermeable a la humedad. La WO 00/76878 da un ejemplo de tal paquete impermeable a la humedad. Otro ejemplo de cómo se pueden proteger las bacterias es mediante el uso de un sistema de suministro como se ejemplifica en por ejemplo la WO 02/28446.

25

Una posibilidad adicional es suministrar dicha composición que inhibe los microbios separadamente en una forma en la cual sea conveniente aplicar

directamente a un artículo absorbente por el usuario, por ejemplo en su forma líquida, como un polvo, dispersado en una loción, dispersado en aceite. Los medios para aplicar dicha composición que inhibe los microbios podrían ser un rociado, un dispositivo de "roll-on", un tubo, una botella, una ampolla, una tira o un pegante.

En un aspecto aún adicional de la invención la composición que inhibe los microbios se utiliza en combinación con el artículo sanitario de acuerdo con la invención.

Otro aspecto de la invención es preparar el artículo sanitario que comprende aplicar dicha composición que inhibe los microbios a dicho artículo sanitario.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Prueba 1

El propósito de esta prueba fue determinar si los aditivos seleccionados afectan el crecimiento de *Candida albicans* y si una inhibición mejorada del crecimiento se puede lograr cuando ellos se agregan a los productos extracelulares de *Lactobacillus plantarum*, LB 931. Los aditivos utilizados en esta prueba fueron ácido ascórbico, ácido cítrico, fenilalanina, ácido acético, ácido propiónico y propionato de sodio.

Método

Cepa de Levadura

69

Un aislado clínico de *Candida albicans* (designado como *C. albicans* 702) se utilizó como cepa de prueba. Éste se aisló de la vagina de una mujer con candidiasis vaginal.

5

Control

Como control se utilizó un caldo dMRS puro (caldo MRS sin adición de acetato de sodio). Un volumen específico se transfirió a pozos de una placa micro título y se dejó secar al aire (45°C mínimo de 20 horas).

10

Producto Extracelular (ECP)

Los cultivos de LB 931 crecidos en caldo dMRS se centrifugaron hasta formar sedimentos de células y esterilizar el filtrado utilizando 0,22 µm de filtro (Millipore filter, Bedford, USA) con el fin de obtener el sobrenadante LB 931 que comprende el producto extracelular LB 931. Un volumen específico de sobrenadante filtrado estéril se transfirió a los pozos de una placa microtítulo y se dejó secar al aire (45°C mínimo de 20 horas) y posteriormente se suspendió en agua destilada estéril a una concentración tres veces mayor y se transfirieron 200µl a placas de micro título de 96 pozos.

15

20

Producto extracelular con aditivo

Los aditivos se agregaron a una concentración final de 50mM a tubos que contienen el sobrenadante filtrado estéril de LB 931. Se transfirió un volumen específico a pozos de una placa micro título y se dejó secar al aire (45°C mínimo

25



de 20 horas) y posteriormente se resuspendieron en agua destilada estéril a una concentración tres veces mayor (es decir, el volumen del agua destilada estéril es aproximadamente un tercio del volumen específico antes de secar al aire) y 200 μ l se transfirieron a placas micro título de 96 pozos.

5

Caldo con aditivo

Los aditivos se agregaron a una concentración final de 50 mM en caldo dMRS. El pH se ajustó al mismo valor de pH que en el producto extracelular con aditivo para el respectivo aditivo. Se transfirió un volumen específico a pozos de una placa micro título y se dejó secar al aire (45°C mínimo de 20 horas) y posteriormente se resuspendió en agua destilada estéril a una concentración tres veces mayor y se transfirieron 200 μ l a placas micro título de 96 pozos.

15 La *Candida* se agregó a una concentración final de $\sim 10^4$ células por pozo y la placa micro título se incubó a 37°C durante 24 horas.

El pH para diferentes aditivos varió entre $3,4 \pm 0,2$. El pH para el caldo con aditivo y el producto extracelular con aditivo fue siempre el mismo.

20

La prueba fue ciega de tal manera que no podía haber opiniones preconcebidas que coloraran los resultados. La inhibición de *Candida* se evaluó y se graduó, por dos personas que utilizan una plantilla, sobre una escala desde cinco a cero con base en observaciones visuales de la turbidez con un valor medio calculado estando presente. Los pozos que contienen crecimiento fuerte de *Candida* en un calo dMRS puro se graduó como cinco, mientras que los pozos sin crecimiento visual se graduaron como cero.

25

71

Resultados

Como se puede ver en la Fig. 1 muy pocos aditivos por ellos mismos probaron tener un efecto sobre el crecimiento de *Candida* aunque el pH fue muy bajo. El producto extracelular del LB 931 fue efectivo en la inhibición de *Candida*. Este efecto se mejoró sorprendentemente mediante la adición de los aditivos a los productos extracelulares del LB 931. Para todos los aditivos en combinación con el producto extracelular del LB 931, se logró un muy buen efecto inhibidor del crecimiento. El mejor efecto se logró cuando se agregó ácido propiónico al producto extracelular del LB931 (sin ningún crecimiento).

Prueba 2

El propósito de estas pruebas fue determinar si los aditivos seleccionados afectan el crecimiento de las bacterias y si se puede lograr una inhibición mejorada del crecimiento cuando ellas se agregan a los productos extracelulares de *Lactobacillus plantarum*, LB 931. Los aditivos utilizados en esta prueba fueron acetato de sodio, ácido succínico, propionato de sodio, ácido acético.

Método

Cepas Bacterianas

Los aislados clínicos de *E. coli* (designado *E. coli* 1) y *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus* 1) se utilizaron como cepas de prueba. Ellos se aislaron del tracto urogenital en mujeres con infecciones del tracto urinario.

X2

Control

Como control se utilizó un caldo dM17 puro (caldo M17 modificado mediante la
5 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). Se agregó 200 μl a placas micro título de
96 pozos.

Producto Extracelular (ECP)

10

Los cultivos de LB 931 crecidos en caldo dMRS se centrifugaron hasta formar
sedimentos de las células y esterilizar el filtrado utilizando un filtro de 0,22 μm
(Millipore filter, Bedford, USA) con el fin de obtener el sobrenadante LB 931 que
comprende el producto extracelular LB 931. Se transfirieron 200 μl a placas micro
15 título de 96 pozos.

Producto extracelular con aditivo

Los aditivos se agregaron a una concentración final de 50mM a tubos que
20 contienen la suspensión filtrada estéril de LB 931. Se transfirieron 200 μl a placas
micro título de 96 pozos.

Caldo con aditivo

25 Los aditivos se agregaron a una concentración final de 50mM en caldo dM17. Se
agregaron 200 μl a placas micro título de 96 pozos.

10µl de un cultivo durante toda la noche de *E. coli* resp. *S. saprophyticus*, ambos diluidos 100x, se agregaron a pozos en la placa micro título que se incubó a 37°C durante toda la noche.

5 El pH se ajustó a 6,9 en todos los ensayos.

La prueba fue ciega de tal manera que no podía haber opiniones preconcebidas que coloraran los resultados. La inhibición de *E. coli* resp. *S. saprophyticus* se evaluó y se graduó, por dos personas que utilizan una plantilla, sobre una escala
10 desde cinco a cero con base en observaciones visuales de la turbidez con un valor medio calculado estando presente. Los pozos que contienen crecimiento fuerte de *E. coli* resp. *S. saprophyticus* en un calo dM17 puro se graduó como cinco, mientras que los pozos sin crecimiento visual se graduaron como cero.

15 Resultados

Como se puede ver en la Fig. 2A ninguno de los aditivos probados solo probó tener un efecto sobre el crecimiento de *E. coli*. El producto extracelular del LB 931 fue efectivo en la inhibición de *E. coli*. Este efecto se mejoró sorprendentemente
20 mediante la adición de los aditivos a los productos extracelulares del LB 931. Para todos los aditivos en combinación con el producto extracelular del LB 931, se logró un muy buen efecto inhibidor del crecimiento.

Como se puede ver en la Fig. 2B ninguno de los aditivos probados solo probó tener un efecto sobre el crecimiento de *Staphylococcus saprophyticus*. El producto
25 extracelular de LB 931 fue efectivo en la inhibición de *Staphylococcus saprophyticus*. Este efecto se mejoró sorprendentemente mediante 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, se logró un muy buen efecto inhibidor del crecimiento.

5 **Prueba 3**

El propósito de esta prueba fue evaluar la inhibición mejorada de *Candida albicans* cuando el producto extracelular de *Lactobacillus fermentum* Ess-1 se combinó con los aditivos ácido ascórbico o ácido propiónico.

10

Método

El Ess-1 creció a fase estacionaria en caldo dMRS (caldo MRS sin la adición de acetato de sodio). El cultivo bacteriano se centrifugó hasta formar sedimentos de las células en un filtrado estéril utilizando un filtro de 0,22µm (Millipore filter, Bedford, USA) luego de lo cual se obtuvo el sobrenadante que comprende el producto extracelular. Se agregaron ácido propiónico y ácido ascórbico a una concentración final de 50mM a tubos que contienen el producto extracelular. Al filtrado se le ajustó el pH al valor pKa para el respectivo ácido (4,2 para ácido ascórbico y 4,87 para ácido propiónico) y se transfirieron 200µl a pozos de una placa micro título de 96 pozos. Se agregó *C. albicans* a una concentración final de $\sim 5 \times 10^4$ CFU ml⁻¹ para cada uno de los pozos. Las placas se incubaron durante 20 horas a 37°C y se evaluó y graduó el crecimiento, por dos personas que utilizan una plantilla, sobre una escala de cinco a cero con base en observaciones visuales de turbidez con un valor medio calculado estando presente. Los pozos que contienen un fuerte crecimiento de *Candida* en un caldo dMRS puro se

25



graduaron como cinco, mientras que los pozos sin crecimiento visual se graduaron como cero.

Resultados

5

Una inhibición creciente inesperada se obtuvo cuando el sobrenadante del Ess-1 se combinó con ácido ascórbico o ácido propiónico como se puede ver en la Fig. 3A y 3B respectivamente.

10 **Prueba 4**

El propósito de esta prueba fue evaluar la inhibición mejorada de *Candida* de acetato de Na en combinación con células de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* LB 931.

15

Método

Dos placas fueron hechas con agar M17 y 7 dos con agar MRS. El medio MRS (desarrollado por De Man, Rogosa y Sharpe), es un medio de crecimiento comúnmente utilizado para *Lactobacillus*. El agar MRS de Merck contiene 5 g de acetato de sodio por litro de agar. El M17 (Oxoid) es similar al sustrato comercial para *Lactobacillus* pero sin la adición de acetato de sodio. Los agares se prepararon como se describió en los paquetes.

25 El *Lactobacillus plantarum* LB931 se cultivó en caldo MRS a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas. *Candida albicans* 702 se cultivó en caldo M17 a 37°C durante 24 horas.

76

Los huecos (Ø 10 mm) se punzaron en las placas y se rellenaron con tarugos de 250µl de mezclas de agar que contienen ~10⁷ LB 931 en agar MRS). Las placas se dejaron durante 30 minutos y luego se incubaron 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. El cultivo nocturno de *C. albicans* en caldo M17 se diluyó 10 veces y se rociaron 100µl sobre la superficie de cada placa. Las placas se incubaron entonces durante 24 horas a 37°C. Como controles, se llenaron los huecos (Ø 10 mm) con agar MRS solamente.

Las placas se evaluaron con respecto a la inhibición del crecimiento de *Candida*. Se midieron (Ø mm) las zonas alrededor de los tarugos sin crecimiento de *Candida*.

Resultados

15

Los tamaños de las zonas se pueden ver en la Tabla 1

Tabla 1:

Agar en la caja Petri	Tarugo con solo agar (Ø mm)	Tarugo con LB931 (Ø mm)
Agar MRS	0	18.8
Agar M17	0	0
Agar MRS	0	18.1
Agar M17	0	0

El LB 931 creció bien en todos los tarugos donde se había inoculado el LB 931. No hubo zonas sin crecimiento de *Candida* sobre las placas con agar M17. En las placas con agar MRS hubo zonas claras alrededor de los tarugos LB 931 pero sin zonas alrededor de los tarugos con solo agar.

El LB 931 se aplicó en muy bajas cantidades a las placas, lo cual puede explicar porque no se dio sustancialmente inhibición de *Candida* sobre las placas de agar M17. Esto sin embargo indica una inhibición eficiente de *Candida* debido al efecto
5 sinérgico de LB 931 y el aditivo, en este caso acetato de sodio que estaba comprendido en el medio MRS.

EJEMPLOS

- 10 Los siguientes ejemplos relacionados con esta invención se ilustran y no deben, por supuesto, ser considerados como específicamente limitantes de la invención.

Ejemplo 1: Aislamiento y tipo de Ess-1

- 15 El propósito inicial de este estudio es aislar y tipificar una cepa de *Lactobacillus* que inhibe el crecimiento de *Candida albicans* y *Candida glabrata* en una gran proporción comparada con otras cepas de *Lactobacillus*.

Método

20

Cepas de Levadura

- Los aislados clínicos de *Candida albicans* y *Candida glabrata* se utilizaron como cepas de prueba. Éstas se aislaron de la vagina de mujeres con candidiasis
25 vaginal y de hembras saludables.

Detección Sistemática I.

58

Aproximadamente se cultivaron 140 cepas de *Lactobacillus*, que se originan de la piel humana, garganta, dientes, heces de nenes, vegetales y semillas en un caldo MRS y se estamparon sobre placas agar MRS. Las placas de agar se incubaron
5 bajo condiciones anaeróbicas a 37°C. Adicionalmente, se vertió agar SAB (Sabouraud) (LAB M, Bury, UK) sobre el agar MRS y se le permitió coagularse. El cultivo de *C. albicans* se sembró sobre el agar y las placas se incubaron aeróbicamente a 37°C. Se hizo una evaluación visual de la inhibición. Se seleccionaron cepas que inhiben *C. albicans* igualan o tienen una mayor extensión
10 que la cepa de referencia de *Lactobacillus plantarum* LB931 para una selección adicional (detección sistemática II).

Detección Sistemática II.

15 Se centrifugaron y filtraron suspensiones estériles de crecimiento de lactobacilli en caldo Dmrs (caldo MRS sin adición de acetato de sodio). El filtrado es por lo tanto denominado Filtrado libre de Célula de *Lactobacillus*, LCF. Se transfirió un volumen específico a los pozos de una placa micro título y se le permitió secarse al aire y posteriormente resuspenderse en agua destilada estéril a una
20 concentración tres veces mayor y transferirse a placas micro título de 96 pozos. La *Candida* se agregó a todos los frascos (se utilizaron tres aislados de *C. albicans* y *C. glabrata*, respectivamente). La inhibición se evaluó mediante observación visual de turbidez y se graduó mediante dos personas que utilizan una plantilla a escala de cinco a cero. Los pozos que contenían fuerte crecimiento de *Candida sp.* en
25 caldo dMRS puro se graduaron como cinco, mientras que los pozos sin crecimiento visual se graduaron como cero.

19

Tipificación API y tipificación genética

La identificación a nivel de las especies se hizo utilizando el sistema API 50 CHL (bioMérieux, Francia), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos
5 provenientes de las pruebas de fermentación se analizaron utilizando un software API Lab Plus. La tipificación genética se hizo mediante DSMZ (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH) mediante análisis de secuencia parcial del rARN 16S.

10 Resultados

Todas las cepas se evaluaron de acuerdo con la capacidad de inhibición de crecimiento contra *C. albicans* en la detección sistemática I. Se seleccionaron 23 cepas de *Lactobacillus* resultaron comparables o excedieron aquella del LB931
15 para la detección sistemática II. Fuera de aquellas 23 cepas de *Lactobacillus*, tres fueron cepas de referencia en la mayoría de las cepas que se aislaron del tracto oral.

El Ess-1 probó tener una capacidad comprensiva para inhibir el crecimiento de
20 *Candida*. Ninguna de las cepas de *Lactobacillus* probadas fue similar a la actividad de Ess-1 con relación al efecto de tanto *C. albicans* y *C. glabrata*. El patrón de fermentación de carbohidratos y la tipificación genética para el Ess-1 mostró que ésta pertenecía a las especies de *Lactobacillus fermentum*.

25 **Caracterización del Ess-1**

Se analizó el rADN 16S de la cepa Ess-1 (DSM 17851) mediante DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) mediante secuenciación directa de aproximadamente 450 nucleótidos de rADN 16S amplificado con PCR. La extracción de ADN genómico, amplificación mediada por PCR del rADN 16S y la purificación del producto PCR se llevó a cabo como se describió previamente (Rainey, F.A. *et al.* Int. J. Sys. Bacteriol. 1996(46):1088-1092). Los productos PCR purificados se secuenciaron utilizando el Kit CEQ™DTCS-Quickstart (Beckam Coulter) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Los productos de reacción de secuencia se electroforizaron utilizando el Sistema de Análisis Genético CEQ™8000.

Los datos de secuencia resultantes puestos en el editor ae2 de alineamiento (Maidak, B.L. *et al.* Nucl. Acids Res. 1999(27):171-173), alineado manualmente y comparado con las secuencias de gen rARN 16S representativas del organismo que pertenece a *Firmicutes* (Maidak, B.L. *et al.*). Por comparación las secuencias de rARN 16S se obtuvieron de la base de datos EMBL o RDP (Maidak, B.L. *et al.*).

Como resultado de este análisis la siguiente tabla 2 lista aquellos organismos, cuyas secuencias de gen rARN 16S muestran los valores de similaridad más altos comparados con la secuencia de rADN 16S de Ess-1

Tabla 2

Cepa	% de similaridad de Secuencia del gen rARN 16S con el 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

81

<i>Lactobacillus vaccिनostercus</i> DSM 20634	87.2
---	------

La secuencia del gen rADN 16S parcial de la cepa Ess-1 muestra la más alta similaridad con el *Lactobacillus fermentum*. Consecuentemente la cepa Ess-1 puede representar una cepa de *Lactobacillus fermentum*, pero puede también
5 representar nuevas especies dentro del género *Lactobacillus*.

Ejemplo 2: Producción de *Lactobacillus* Probiótico

A escala de laboratorio: un vaso estéril con un caldo ex. MRS se inoculó con un
10 inoculado puro de una cepa de *Lactobacillus* deseada. El caldo con bacterias se incubó durante toda la noche a 37°C y preferiblemente con una atmósfera de 5% de CO₂. Las células se lavaron entonces utilizando centrifugación y solución salina estéril. Se puede agregar azúcar protector, almidón o proteínas y la masa de célula se secó por congelamiento y se molió.

15

A escala de producción, el lote de semillas de trabajo se fermentó en diferentes etapas a escala de producción. La producción se controló y optimizó para la cepa específica que se va a producir. Después de la fermentación el cultivo se lavó y/o solo se concentró utilizando microfiltración o centrifugación de flujo cruzado. Las
20 sustancias protectoras de acuerdo con lo anterior se agregaron y las células se pueden secar por congelamiento y moler o secar por rociado.

Ejemplo 3: Producción de producto extracelular de por ejemplo *Lactobacillus*

25

A escala de laboratorio el cultivo de toda la noche de la cepa probiótica se produjo en el Ejemplo 2. Después de la filtración o centrifugación se recolectó el sobrenadante. El sobrenadante se concentró mediante evaporación o se secó completamente para secado ex. convección en aire seco, congelamiento, secado
5 o secado por rociado.

A escala de producción el cultivo bacteriano se fermentó de acuerdo con el Ejemplo 2. El producto extracelular se obtuvo como un filtrado que utiliza micro filtración de flujo cruzado o una centrifugación que utiliza sobrenadante. También
10 en este caso éste se puede concentrar adicionalmente utilizando evaporación o secando completamente utilizando por ejemplo secado por rociado.

Ejemplo 4: Formulaciones

15 Recubrimiento de pantaloncito anti Candida

El producto se basa en un recubrimiento interior de pantaloncito comercializado estándar, tal como los recubrimientos extra Libresse® (vendido por SCA Hygiene Products AB), al cual el producto extracelular del Ess-1 en combinación con un
20 aditivo, se agrega de acuerdo con lo siguiente: 10 ml de producto extracelular de Ess-1 se evaporó hasta 1ml al cual se agregó 3.7mg de ácido propiónico. El producto extracelular con ácido propiónico se imprimió sobre la superficie del recubrimiento del pantaloncito que se seca antes de empacar.

25 Almohadilla de incontinencia ligera con crecimiento reducido de bacterias y control del olor

El producto está basado en una almohadilla de incontinencia ligera comercializada estándar, tal como Tena® Lady Normal (vendido por SCA Hygiene Products AB), al cual los productos extracelulares del LB931 se agregan de acuerdo con lo siguiente: se mezcla 100ml de producto extracelular de LB931 con 1g de ácido cítrico. La mezcla se evaporó y se secó y posteriormente el polvo se homogenizó mezclado en el núcleo absorbente de la almohadilla.

Recubrimiento ligero para higiene genital mejorada

10 El producto se basa en un recubrimiento interior de pantaloncito comercializado estándar, tal como recubrimientos ligeros Libresse® (vendido por SCA Hygiene Products AB), al cual los productos extracelulares de tanto el Ess-1 como el LB931 se agregan de acuerdo con lo siguiente: se mezcla 5ml de producto extracelular de Ess-1 y 5 ml de producto extracelular de LB931 y se evaporan a 1ml, al cual se
15 agrega 4.1mg de acetato de sodio. La mezcla se evaporó y se secó y el polvo se mezcló con 0.1g de cera de silicona y finalmente se imprimió en el centro de la lámina superior del recubrimiento.

Se debe notar que aún si todos los tres ejemplos sobre las formulaciones solo
20 comprenden *Lactobacillus plantarum* LB 931 y/o *Lactobacillus fermentum* Ess-1 como bacterias probióticas, todas las bacterias probióticas adecuadas para la presente invención como se describieron previamente también se pueden utilizar.

81

Archivo de referencia del solicitante o el agente PD53841PC00	Solicitud Internacional No. PCT/SE 2006/001313
---	--

**INDICACIONES QUE SE RELACIONAN CON MICROORGANISMOS DEPOSITADOS
U OTRO MATERIAL BIOLÓGICO**

(Regla PCT 13bis)

A. Las indicaciones hechas adelante se relacionan con los microorganismos depositados u otro material biológico referido a que se hace referencia en la descripción en la página 10, línea 20-23.	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO	Depósitos adicionales se identifican en una hoja adicional ☐
Nombre de la institución depositaria Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Dirección de la institución depositaria (incluye el código postal y país) Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig Alemania	
Fecha de depósito 2006-01-06	Número de Acceso DSM 17851
C. INDICACIONES ADICIONALES (dejar en blanco si no aplica)	Esta información continúa en una hoja adicional ☐
Recibo en el caso de un depósito original (copia incluida con la forma de solicitud)	
Declaración de viabilidad (copia incluida en la forma de solicitud)	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS CUALES SE HACEN LAS INDICACIONES (si las indicaciones no son para todos los Estados designados)	
E. SUMINISTRO SEPARADO DE INDICACIONES (dejar en blanco si no aplica)	
Las indicaciones listadas adelante se presentarán a la Oficina Internacional posteriormente (especificar la naturaleza general de las indicaciones, por ejemplo, "Número de Acceso del depósito")	
Declaración de que el depositante ha autorizado al Solicitante a hacer referencia al material biológico depositado en la solicitud y que ha dado su consentimiento sin reserva e irrevocable de que el material depositado se hace disponible al público de acuerdo con la Regla 28 (1)(d) de la Convención de Patente Europea (EPC).	
☐ Solo para uso de la oficina receptora Esta hoja se recibió con la solicitud Internacional	☐ Solo para uso de la Oficina Internacional Esta hoja se recibió por la Oficina Internacional en:
Funcionario autorizado Milka Kamppinen	Funcionario Autorizado

85

REIVINDICACIONES

1. Un artículo sanitario (1) tal como una toalla sanitaria, un recubrimiento de pantaloncito, un protector de incontinencia, un pañal, una almohadilla de incontinencia, un inserto femenino, un tampón, o similar que comprende una lámina superior (2), dicho artículo sanitario (1) que comprende una composición que inhibe los microbios (8), dicha composición que inhibe los microbios comprende un producto extracelular de por lo menos una bacteria probiótica y/o 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 éstos.
2. El artículo sanitario de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho valor pKa no excede 5.
3. El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho producto extracelular está en la forma de un sobrenadante, obtenido mediante centrifugación o filtración de un cultivo de una bacteria probiótica.
4. El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha composición que inhibe los microbios (8) comprende por lo menos una bacteria probiótica y por lo menos uno de dichos aditivos.
5. El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en donde dicha composición que inhibe los microbios (8) 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.

6. El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en donde dicha composición que inhibe los microbios (8) está sustancialmente libre de bacterias probióticas, preferiblemente no presentes en una cantidad mayor de 100 CFU/ml y más preferiblemente no mayor de 10 CFU/ml.
7. El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha bacteria probiótica es una bacteria que produce ácido láctico.
8. El artículo sanitario de acuerdo a la reivindicación 7, en donde dicha bacteria que produce ácido láctico es *Lactobacillus plantarum* LB 931 o *Lactobacillus fermentum* Ess-1 o una combinación de éstos.
9. El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho aditivo se elige de ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caprónico, ácido succínico y/o una sal de éstos; preferiblemente dicho aditivo se elige de ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico o ácido succínico, y/o una sal de éstos; más preferiblemente dicho aditivo se elige de ácido ascórbico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico y/o una sal de éstos.

10. El artículo sanitario de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha sal es una sal de sodio; preferiblemente propionato de sodio y/o acetato de sodio.
- 5 11. El artículo sanitario que comprende una composición que inhibe los microbios (8) de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición que inhibe los microbios (8) se localiza sobre la lámina superior (2).
- 10 12. Un kit que comprende dicha composición que inhibe los microbios (8) como se definió en las reivindicaciones 1-10 y dicho artículo sanitario (1).
- 15 13. El kit de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicha composición que inhibe los microbios (8) se suministra en una ampolla, una botella, un tubo, un dispositivo "roll-on", como un pegante o un pulverizado.
- 20 14. Uso de la composición que inhibe los microbios (8) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en combinación con dicho artículo sanitario (1).
15. Método para preparar un artículo sanitario (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 que comprende aplicar dicha composición que inhibe los microbios (8) a dicho artículo sanitario (1).

88

ARTÍCULO SANITARIO QUE COMPRENDE UNA COMPOSICIÓN QUE INHIBE
MICROBIOS

RESUMEN

5

Un artículo sanitario (1) tal como una toalla sanitaria, un recubrimiento de pantaloncito, un protector de incontinencia, un pañal, una almohadilla de incontinencia, un inserto femenino, un tampón, o similar que comprende una lámina superior (2), dicho artículo sanitario (1) comprende una composición que

10 inhibe microbios (8), dicha composición que (8) comprende por lo menos un producto extracelular de por lo menos una bacteria probiótica y/o por lo menos una bacteria probiótica y por lo menos una aditivo en la forma de un ácido orgánico, con por lo menos uno de sus valores pKa que no excede 5,5, y/o una sal de éste.

89

1/7

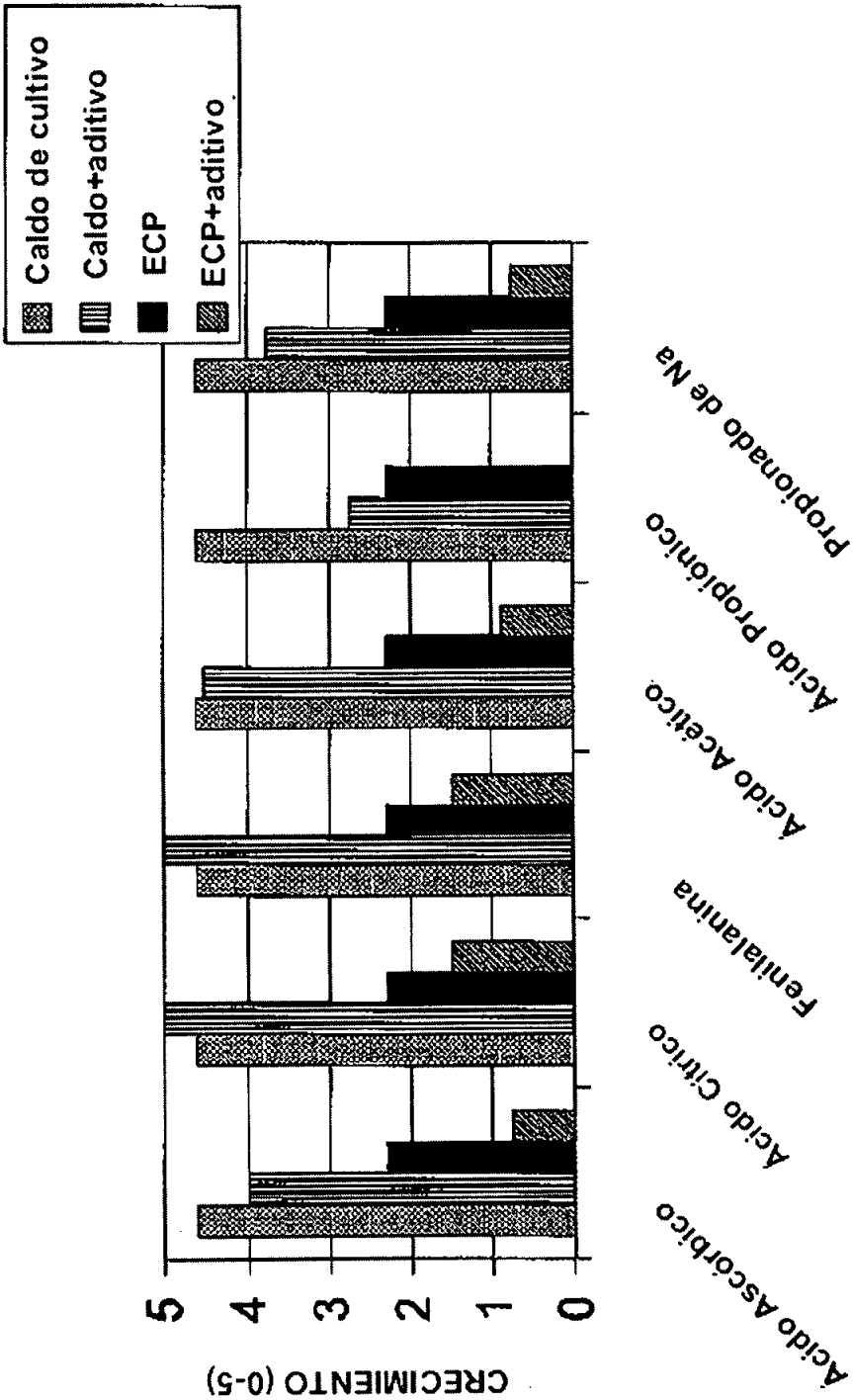


Fig. 1

90

27

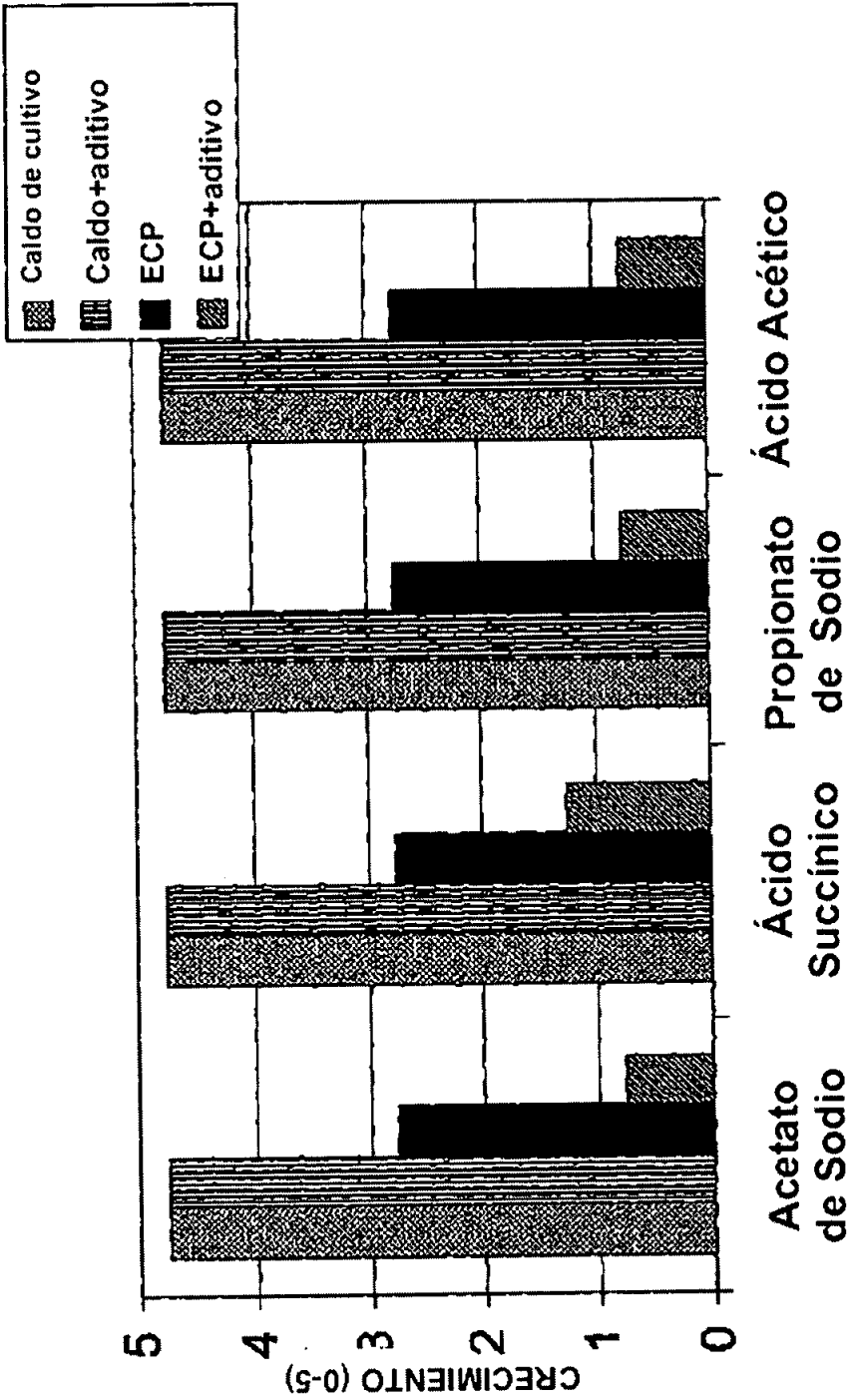


Fig. 2A

41

3/7

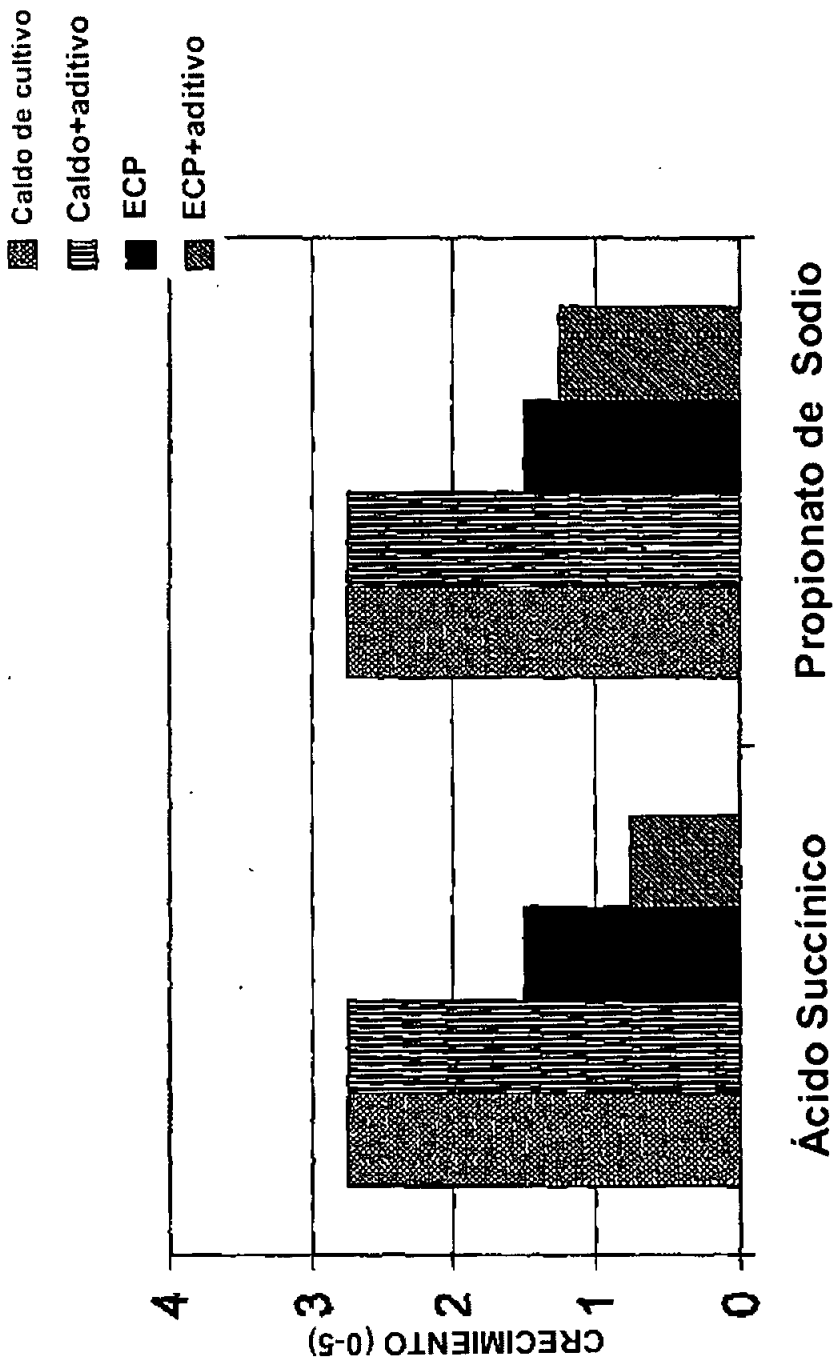


Fig. 2B

φ2

4/7

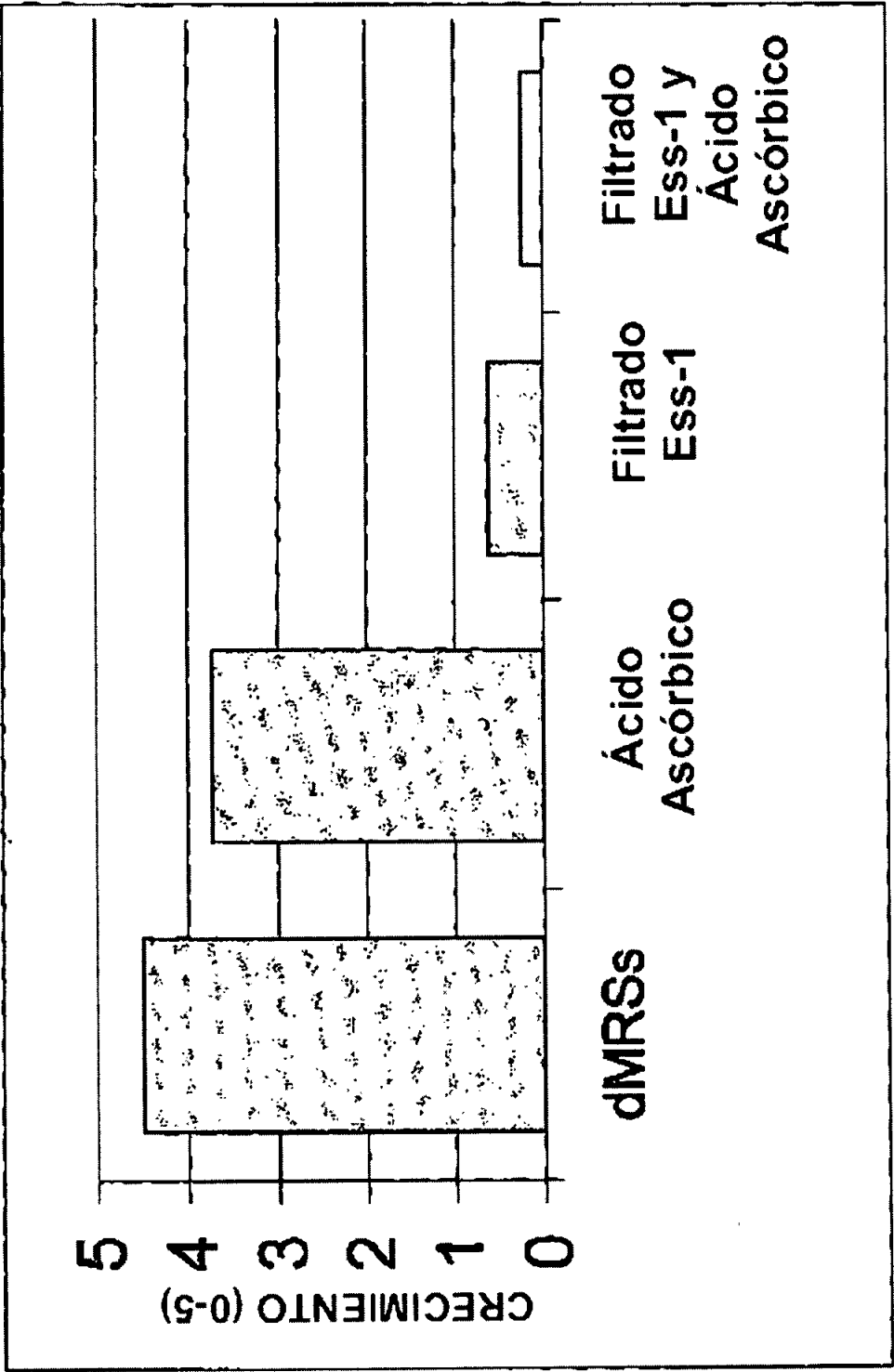


Fig. 3A

5/7

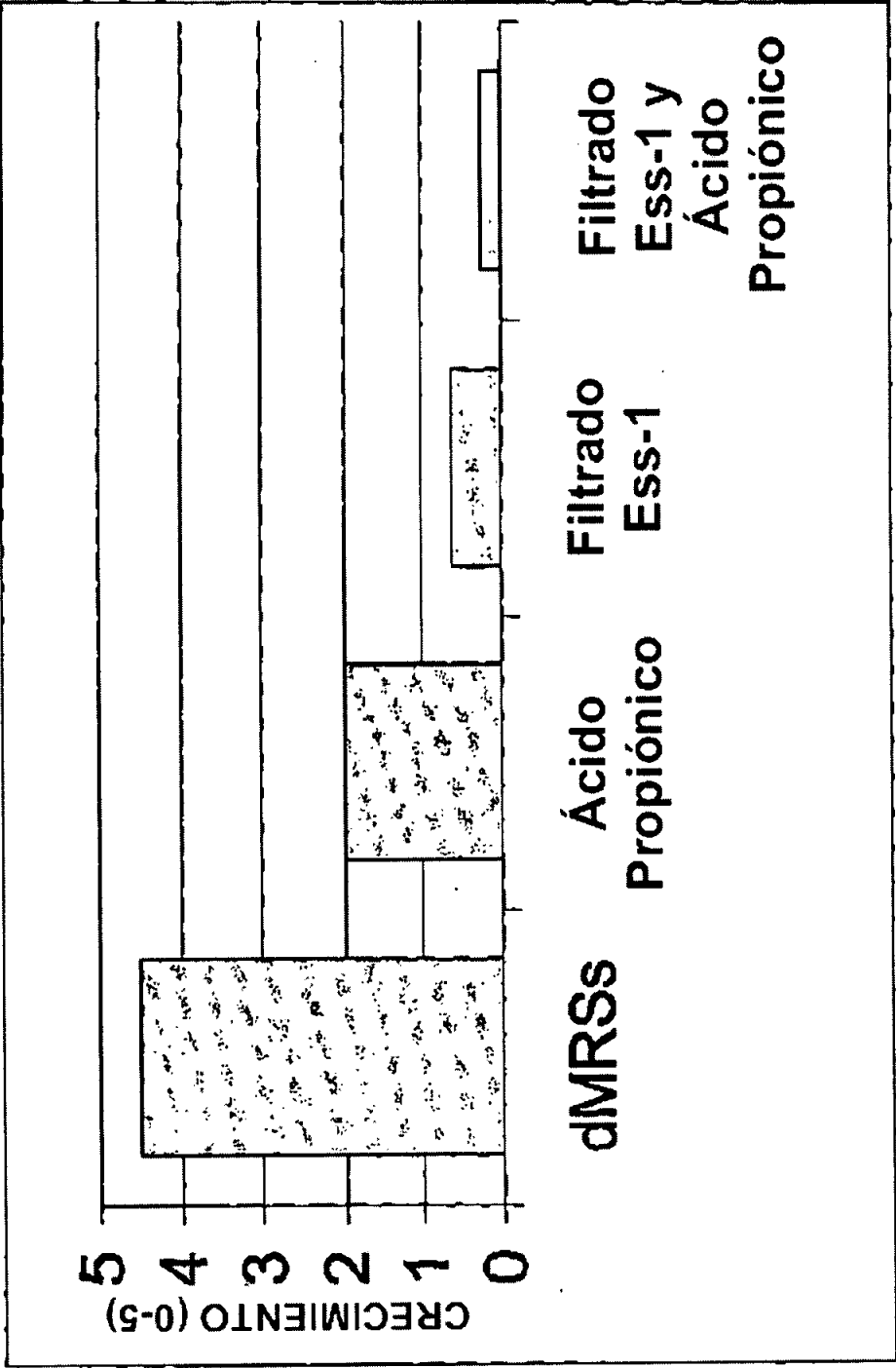


Fig. 3B

94

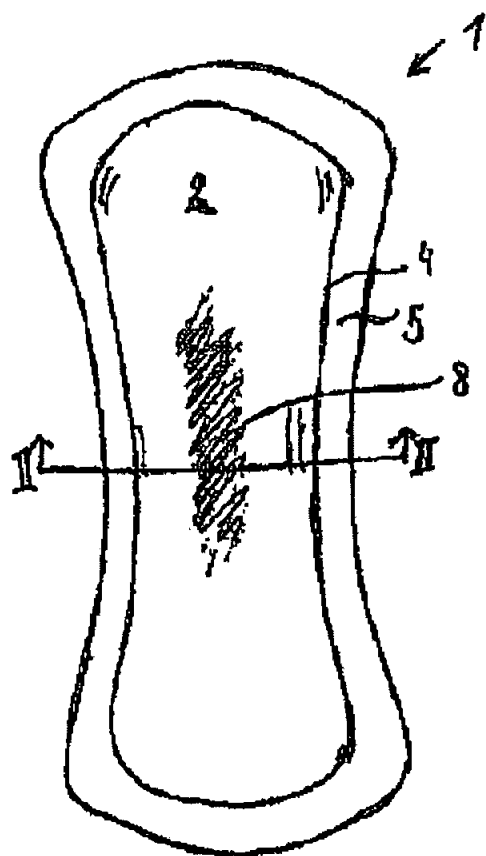


Fig. 4a

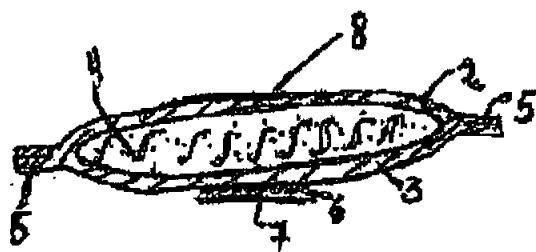


Fig. 4b

717

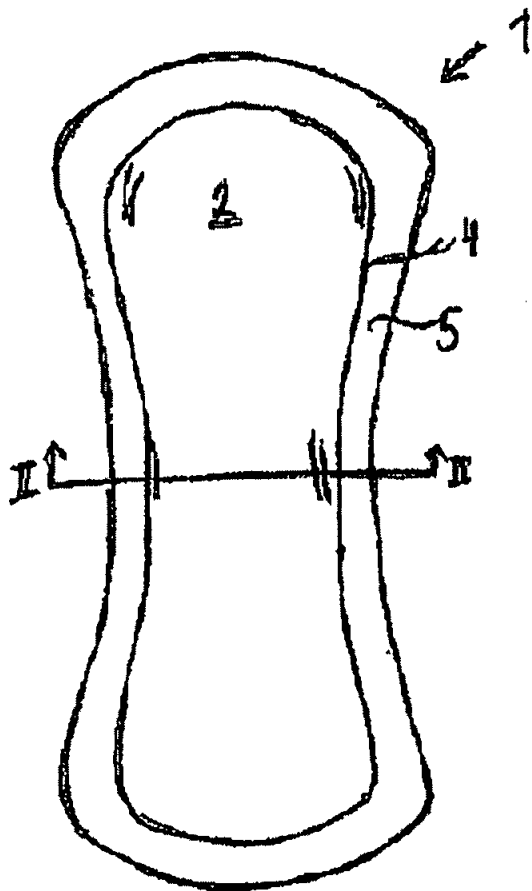


Fig. 5a

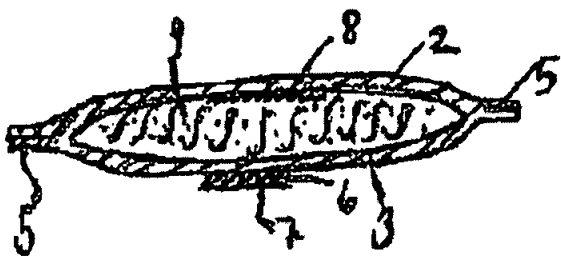


Fig. 5b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE2006/001313

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: A61L, A61F

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

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), claim 5, abstract --	1-15
Y	US 20020090365 A1 (CHRISOPE), 11 July 2002 (11.07.2002), paragraph [0016],[0019],[0103], claims 32-33, abstract --	1-15
A	US 6716435 B1 (FARMER ET AL), 6 April 2004 (06.04.2004), page 12, line 54 - line 60; page 18, line 35 - line 42, abstract --	1-15

☒ 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

29 -06- 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

Beate Slusarczyk/EK
Telephone No. +46 8 782 25 00

97

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2006/001313

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 9945976 A1 (THE PROCTER & GAMBLE COMPANY), 16 Sept 1999 (16.09.1999), page 14 - page 15, abstract --	1-15
A	WO 9917813 A1 (SCA HYGIENE PRODUCTS AB), 15 April 1999 (15.04.1999), claims 1-11, abstract -- -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2006/001313

International patent classification (IPC)

A61L 15/36 (2006.01)

A61F 13/15 (2006.01)

A61L 15/46 (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 **LCICKPXECF**.

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.

99

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

28/05/2007

International application No.
PCT/SE2006/001313

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	6716435	B1	06/04/2004	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	7025974	B	11/04/2006
				US	20040191232	A	30/09/2004
				US	20060177429	A	10/08/2006
				WO	0061201	A	19/10/2000
				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
				JP	2002512615	T	23/04/2002
				US	6645506	B	11/11/2003
				US	6723326	B	20/04/2004
				US	6905692	B	14/06/2005
				US	20030003107	A	02/01/2003
				EP	1629846	A	01/03/2006
				ES	2255730	T	01/07/2006
				WO	9847374	A	29/10/1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

28/05/2007

International application No.
PCT/SE2006/001313

WO	9945976	A1	16/09/1999	AT	289206	T	15/03/2005
				AU	3082099	A	27/09/1999
				CA	2322461	A,C	16/09/1999
				DE	69923766	D,T	16/03/2006
				EP	1061964	A,B	27/12/2000
				SE	1061964	T3	
				ES	2234246	T	16/06/2005
				JP	2002505918	T	26/02/2002
				TW	431893	B	00/00/0000
				US	20020147433	A	10/10/2002
				ZA	9902005	A	13/09/1999

WO	9917813	A1	15/04/1999	AT	234121	T	15/03/2003
				AU	739096	B	04/10/2001
				AU	9470798	A	27/04/1999
				CA	2305739	A	15/04/1999
				DE	69812151	D,T	16/10/2003
				DK	1032434	T	07/07/2003
				EP	1032434	A,B	06/09/2000
				SE	1032434	T3	
				ES	2195396	T	01/12/2003
				JP	3676233	B	27/07/2005
				JP	2001518362	T	16/10/2001
				NZ	503947	A	28/09/2001
				PL	190783	B	31/01/2006
				PL	340332	A	29/01/2001
				PT	1032434	T	31/07/2003
				RU	2212902	C	27/09/2003
				SE	9703669	D	00/00/0000
				SK	5002000	A	12/09/2000
				TR	200000935	T	00/00/0000
				TW	415840	B	00/00/0000
				ZA	9809211	A	22/04/1999

(2)

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 PD53841PC00	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEA/418	
International application No. PCT/SE2006/001313	International filing date (day/month/year) 17.11.2006	Priority date (day/month/year)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61L15/36		
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>5</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 	

102

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/SE2006/001313

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

1-23 as originally filed

Claims, Numbers

1-15 received on 17.02.2009 with letter of 17.02.2009

Drawings, Sheets

1/7-7/7 as originally filed

- ☐ 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.
 - ☐ 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)).

103

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/SE2006/001313

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>10</u>
	No: Claims	<u>1-9,11-15</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-15</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	
	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/SE2006/001313

Re Item I

Basis of the report

The amendments filed with the letter dated 17.02.2009 meets the requirements of Article 34(2)(b) PCT. A basis for new claim 12 can be found in former claim 12 and p. 13, l. 26-28.

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: WO 2004 060416 A1, cited in ISR
- D7: WO9945099 A1, cited in the application
- D8: US2005276836 A1, introduced into the procedure
- D9: WO9423585 A1, introduced into the procedure

1. Novelty:

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of at least claims 1-10 and 12-15 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

D7 discloses absorbent products such as a **feminine hygiene product diaper**, sanitary napkin, panty guard or an incontinence guard comprising ***Lactobacillus plantarum* strain LB931** and antioxidants such as **ascorbic acid** (D7: claim 7; p. 6, line 1).

Hence D7 is at least anticipating the novelty of claims 1-9 and 11-15.

As D4 deals with hygiene tissues and not with absorbent products, D4 is no longer novelty destroying for the present application.

2. Inventive Step:

The document D7 is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of the

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

International application No.

PCT/SE2006/001313

present application, and discloses all the features set out in claims 1-9 and 11-15. The sole difference between D7 and the present application lies in claim 10, wherein the organic acid is in the form of a sodium salt preferably a sodium propionate or sodium acetate.

The subjective problem to be solved by the present invention may be regarded as the provision of an alternative sanitary article with an improved prebiotic and /or probiotic effect (see p. 3, lines 32-33). As the application does not compare directly with the closest prior art examples the objective technical problem to be solved is the provision of an alternative sanitary article.

The solution to this problem proposed in claim 10 of the present application is considered as not involving an inventive step (Article 33(3) PCT) for the following reasons:

As documents D8 and D9 teach to use an sodium acetate salt as buffering agent for the lactic acid producing bacteria (D8: claim 34; §0099 and D9: claims), the person skilled in the art would choose sodium acetate when looking for an alternative sanitary article. Therefore present claims 1-15 do not involve an inventive step over the disclosure of D4 in combination with D8 or D9 according to Article 33(3) PCT.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

3. The application does not meet the requirements of Article 6 PCT, because claims 12 and 13 are not clear.
4. Claims 12 and 13 are unclear as they are construed in terms of a "kit of part", but do not describe a kit of part, as a kit usually contains more than one **active** element, which is in the present case the hygiene tissue comprising the microbe-inhibiting composition as defined in claims 1-9. Therefore the scope of claims 12-13 is unclear and does not meet the requirements of Art. 6 PCT.

CLAIMS

1. A sanitary article (1) such as a sanitary napkin, a panty liner, an incontinence protector, a diaper, an incontinence pad, a feminine insert, a tampon, or the like comprising a top sheet (2), said sanitary article (1) comprising a microbe-inhibiting composition (8), said microbe-inhibiting composition comprising an extracellular product of at least one probiotic bacterium and/or 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.
2. The sanitary article according to claim 1, wherein said pKa value does not exceed 5.
3. The sanitary article according to any of claims 1 or 2, wherein said extracellular product is in the form of a supernatant, obtained by centrifugation or filtration of a culture of a probiotic bacterium.
4. The sanitary article according to any of claims 1 or 2, wherein said microbe-inhibiting composition (8) comprises at least one probiotic bacterium and at least one of said additives.
5. The sanitary article according to any of claims 1 - 3, wherein said microbe-inhibiting composition (8) comprises at least one probiotic bacterium, an extracellular product of at least one probiotic bacterium and at least one of said additives.
6. The sanitary article according to any of claims 1 - 3, wherein said microbe-inhibiting composition (8) is substantially free from probiotic bacteria, preferably not present in an amount higher than 100 CFU/ml and more preferably not higher than 10 CFU/ml.
7. The sanitary article according to any of the preceding claims, wherein said probiotic bacterium is a lactic acid producing bacterium.
8. The sanitary article according to claim 7, wherein said lactic acid producing bacterium is *Lactobacillus plantarum* LB 931 or *Lactobacillus fermentum* Ess-1 or a combination thereof.

9. The sanitary article according to any of the preceding claims, 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.
10. The sanitary article according to claim 9, wherein said salt is a sodium salt; preferably sodium propionate and/or sodium acetate.
11. The sanitary article comprising a microbe-inhibiting composition (8) according to any of the preceding claims, wherein the microbe-inhibiting composition (8) is located on the top sheet (2).
12. A kit comprising said microbe-inhibiting composition (8) as defined in claims 1-10 and said sanitary article (1), whereby said microbe-inhibiting composition (8) is provided separately from said sanitary article (1).
13. The kit according to claim 12, wherein said microbe-inhibiting composition (8) is provided in an ampoule, a bottle, a tube, a roll-on device, as a stick or a spray.
14. Use of the microbe-inhibiting (8) composition according to any of claims 1-10 in combination with said sanitary article (1).
15. Method of preparing a sanitary article (1) according to any of claims 1-11 comprising applying said microbe-inhibiting composition (8) to said sanitary article (1).

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

- PARA REALIZAR EL EXAMEN DE
PATENTABILIDAD

REIVINDICACIONES

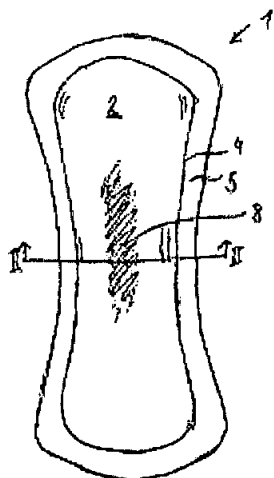
1. Un artículo sanitario (1) tal como una toalla sanitaria, un recubrimiento de pantaloncito, un protector de incontinencia, un pañal, una almohadilla de incontinencia, un inserto femenino, un tampón, o similar que comprende una lámina superior (2), dicho artículo sanitario (1) que comprende una composición que inhibe los microbios (8), dicha composición que inhibe los microbios comprende un producto extracelular de por lo menos una bacteria probiótica y/o 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 éstos.
2. El artículo sanitario de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho valor pKa no excede 5.
3. El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho producto extracelular está en la forma de un sobrenadante, obtenido mediante centrifugación o filtración de un cultivo de una bacteria probiótica.
4. El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha composición que inhibe los microbios (8) comprende por lo menos una bacteria probiótica y por lo menos uno de dichos aditivos.
5. El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en donde dicha composición que inhibe los microbios (8) 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.

110

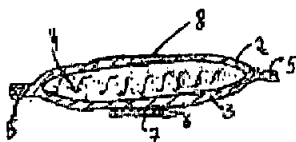
6. El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en donde dicha composición que inhibe los microbios (8) está sustancialmente libre de bacterias probióticas, preferiblemente no presentes en una cantidad mayor de 100 CFU/ml y más preferiblemente no mayor de 10 CFU/ml.
7. El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha bacteria probiótica es una bacteria que produce ácido láctico.
8. El artículo sanitario de acuerdo a la reivindicación 7, en donde dicha bacteria que produce ácido láctico es *Lactobacillus plantarum* LB 931 o *Lactobacillus fermentum* Ess-1 o una combinación de éstos.
9. El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho aditivo se elige de ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caprónico, ácido succínico y/o una sal de éstos; preferiblemente dicho aditivo se elige de ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico o ácido succínico, y/o una sal de éstos; más preferiblemente dicho aditivo se elige de ácido ascórbico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico y/o una sal de éstos.
10. El artículo sanitario de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha sal es una sal de sodio; preferiblemente propionato de sodio y/o acetato de sodio.

11. El artículo sanitario que comprende una composición que inhibe los microbios (8) de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición que inhibe los microbios (8) se localiza sobre la lámina superior (2).
12. Un kit que comprende dicha composición que inhibe los microbios (8) como se definió en las reivindicaciones 1-10 y dicho artículo sanitario (1), por medio del cual dicha composición que inhibe los microbios (8) se suministra separadamente de dicho artículo sanitario (1).
13. El kit de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicha composición que inhibe los microbios (8) se suministra en una ampolla, una botella, un tubo, un dispositivo "roll-on", como un pegante o un pulverizado.
14. Uso de la composición que inhibe los microbios (8) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en combinación con dicho artículo sanitario (1).
15. Método para preparar un artículo sanitario (1) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 que comprende aplicar dicha composición que inhibe los microbios (8) a dicho artículo sanitario (1).

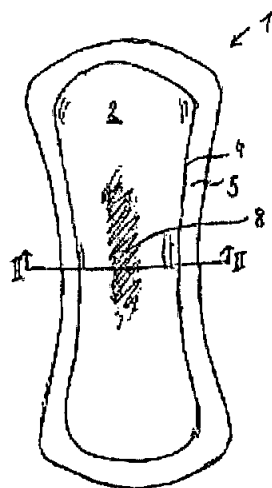
112



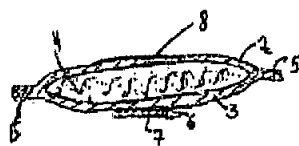
a



b



a



b

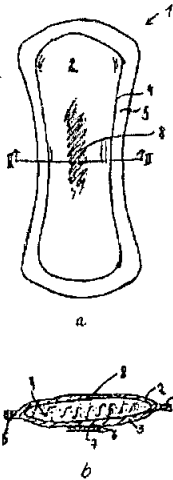
113

(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl: A61L 015/036
22) Fecha de solicitud:	(71) Solicitante(s) SCA HYGIENE PRODUCTS AB
(30) Prioridad (31) <i>Prioridad</i> (32) <i>Fecha</i> (33) <i>País</i>	(72) Inventor(es) ULRICA HUSMARK ULLA FORSGREN BRUSK
	(74) Apoderado: EMILIO FERRERO
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 17/06/2009	(87) Publicación internacional
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha: 22/05/2008
Fecha de presentación de la solicitud: 17/11/2006	N° publicación: WO 2008/060200 A1
No. de solicitud PCT/SE2006/001313	
(54) Titulo: ARTÍCULO SANITARIO QUE COMPRENDE UNA COMPOSICIÓN QUE INHIBE MICROBIOS	

Reivindicación(es):

- Un artículo sanitario (1) tal como una toalla sanitaria, un recubrimiento de pantaloncito, un protector de incontinencia, un pañal, una almohadilla de incontinencia, un inserto femenino, un tampón, o similar que comprende una lámina superior (2), dicho artículo sanitario (1) que comprende una composición que inhibe los microbios (8), dicha composición que inhibe los microbios comprende un producto extracelular de por lo menos una bacteria probiótica y/o 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 éstos.
- El artículo sanitario de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho valor pKa no excede 5.
- El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho producto extracelular está en la forma de un sobrenadante, obtenido mediante centrifugación o filtración de un cultivo de una bacteria probiótica.
- El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha composición que inhibe los microbios (8) comprende por lo menos una bacteria probiótica y por lo menos uno de dichos aditivos.
- El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en donde dicha composición que inhibe los microbios (8) 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.
- El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en donde dicha composición que inhibe los microbios (8) está sustancialmente libre de bacterias probióticas, preferiblemente no presentes en una cantidad mayor de 100 CFU/ml y más preferiblemente no mayor de 10 CFU/ml.
- El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha bacteria probiótica es una bacteria que produce ácido láctico.

- El artículo sanitario de acuerdo a la reivindicación 7, en donde dicha bacteria que produce ácido láctico es *Lactobacillus plantarum* LB 931 o *Lactobacillus fermentum* Ess-1 o una combinación de éstos.
- El artículo sanitario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho aditivo se elige de ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caprónico, ácido succínico y/o una sal de éstos; preferiblemente dicho aditivo se elige de ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico o ácido succínico, y/o una sal de éstos; más preferiblemente dicho aditivo se elige de ácido ascórbico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico y/o una sal de éstos.
- El artículo sanitario de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha sal es una sal de sodio; preferiblemente propionato de sodio y/o acetato de sodio.
- El artículo sanitario que comprende una composición que inhibe los microbios (8) de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición que inhibe los microbios (8) se localiza sobre la lámina superior (2).



114

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-062894- -00000-0000

Fecha: 2009-06-17 17:40:28 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 114

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 39,961
FECHA : JUNIO 1 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754367	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 :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: 11256-841-226-9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-062894- -00000-0000

Fecha: 2009-06-17 17:40:28
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONI
Eve: 379 FASENACIONALII
Folios: 114



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 []

Federico Nuccino

Firma Responsable

Fecha

17-06-2009

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 116

2020
Bogotá D.C.,

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

REFERENCIA	Radicación No.	9 62894
	Solicitud internacional	PCT/SE2006/001313
	Fecha inicio fase nacional	17/06/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	8418
	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,

10 2 JUL. 2009

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

jfernand