

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 298**

51 Int. Cl.:

A61K 36/85 (2006.01)

A61K 36/35 (2006.01)

A61K 36/185 (2006.01)

A61K 36/51 (2006.01)

A61K 36/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08844034 .2**

96 Fecha de presentación: **30.10.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2211884**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.08.2010**

54 Título: **Hidrolizados de extractos vegetales y agentes antibacterianos contenidos en ellos**

30 Prioridad:
31.10.2007 DE 102007052223

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2012

73 Titular/es:
**BIONORICA SE
KERSCHENSTEINERSTRASSE 11 -15
92318 NEUMARKT, DE**

72 Inventor/es:
**BONN, Günther, K.;
STECHER, Günther;
POPP, Michael, A. y
MAYER, Robert**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 381 298 T3

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

DESCRIPCIÓN

Hidrolizados de extractos vegetales y agentes antibacterianos contenidos en ellos

- 5 La presente invención se refiere a un hidrolizado de por lo menos un extracto de por lo menos un material vegetal según la definición principal de la reivindicación 1 y a un agente antibacteriano según la definición principal de la reivindicación 18.
- 10 Los extractos combinados de cinco plantas medicinales indígenas:
Rumicis herba (*Rumex acetosa* L., *Rumex acetosella* L., *Rumex obtusifolius* L., *Rumex patientia* L. y *Rumex crispus* L.);
Verbena officinalis L.;
Sambucus nigra L.;
15 *Primula veris* L. y *Primula elatior* (L.) Hill; y
Gentiana lutea L.
- ya son conocidos como marca SINUPRET® (marca registrada de la empresa BIONORICA) desde hace más de 70 años como secretolítico para infecciones de las vías respiratorias superiores y en especial para la sinusitis.
- 20 Cada droga individual aporta una fracción de la eficacia única que tiene esta composición: de la *Gentiana lutea* (genciana amarilla) se emplea por lo general la raíz para obtener medicamentos. Entre sus contenidos, que ejercen un efecto expectorante (mucolítico), se encuentran diversos secoiridoideglicósidos.
- En el caso de las Rumicis herba (acedera común; vinagrera), las sustancias activas de las hojas y los tallos disuelven la mucosidad, actúan como antiinflamatorias y tienen un efecto positivo en la resistencia propia del organismo.
25 Estos contenidos abarcan p.ej. flavonoides, ácido oxálico y diversos taninos (curtientes).
- La *Verbena officinalis* (verbena común) tiene un efecto mucolítico y antiviral. Las principales sustancias activas de las hojas y tallos empleados como medicinas son entre otros los iridoideglicósidos, glicósidos de ácido cinámico y flavonoides.
30
- Del *Sambucus nigra* (saúco común) se emplean las flores, cuyos contenidos tienen efecto mucolítico. Estos contenidos abarcan p.ej. diversos flavonolglucósidos y como sustancia activa principal la sambunigrina, que es un glicósido cianógeno de efecto antiviral.
- 35 Las sustancias activas de las flores y el cáliz de la *Primula veris* (primavera) y/o *Primula elatior* (L.) Hill (híbridos de primavera y polianta) tienen acción antiviral y mucolítica. Sus contenidos abarcan p.ej. las triterpenosaponinas y los fenolglucósidos, como la primulaverina. La *Primula veris* y la *Primula elatior* actúan como secretolíticos moderados y expectorantes durante el tratamiento de las enfermedades de las vías respiratorias.
- 40 Con una combinación de las cinco plantas curativas se obtiene una composición, con la que se puede obtener un efecto suficiente para fines medicinales. Esta composición puede aplicarse con preferencia para tratar infecciones del segmento garganta-nariz-oído y es indicada en especial para el tratamiento de la sinusitis aguda y crónica.
- Las sinusitis pueden ser agudas o crónicas. Ambas formas son frecuentes y en tres de cada cuatro casos la sinusitis tiene como secuela la propagación de la inflamación de la mucosa de un catarro hacia los senos nasales secundarios.
45
- Los senos nasales secundarios pertenecen a las vías respiratorias superiores. Las vías respiratorias abarcan desde el seno nasal principal con diversos senos nasales secundarios hasta los alvéolos pulmonares. Los senos nasales secundarios están formados por los senos frontales, los senos etmoidales, los senos esfenoideales y los senos maxilares. Todos los senos de los huesos mencionados están revestidos interiormente por una mucosa y a través de conductos estrechos, también llamados ostium, desembocan en el seno nasal principal.
- 50
- Sobre la mucosidad protectora, que reviste la superficie interior de las vías respiratorias, se pegan las partículas de suciedad y los gérmenes patógenos, por ejemplo virus y bacterias, que entran con el aire aspirado y seguidamente son atacados por las defensas de la mucosa, que los neutralizan. Para que los cuerpos extraños puedan ser expulsados del organismo, la mucosidad por acción de los cilios vibrátiles del epitelio tiene que transportarse hacia la faringe (garganta), en la que puede ser ingerida (tragada).
55
- 60 Para poder repeler las enfermedades infecciosas de las vías respiratorias, la mucosa tiene que disponer plenamente de los mecanismos de protección y limpieza. Para ello es imprescindible la evacuación de la mucosidad cargada de patógenos, que los cilios vibrátiles trabajen perfectamente y con sus movimientos ondulatorios sigan transportando la mucosidad y que la mucosidad propiamente dicha sea fresca y de viscosidad baja.

En caso de infección, los mecanismos de protección y limpieza de la mucosa ya no están plenamente operativos.

Los virus, por ejemplo los rinovirus, los adenovirus o los coronavirus, desencadenan reacciones inflamatorias en las mucosas, como resultado de ello la mucosa se hincha y produce mayor cantidad de mucosidad. El flujo de mucosidad es inicialmente acuoso, pero después aumenta su viscosidad. En el curso de la invención de la mucosa nasal pueden hincharse también los orificios (ostium) de los senos secundarios y por ello la mucosidad ya no puede fluir y evacuarse hacia la nariz. Puede producirse la congestión de los senos secundarios. Los cilios vibrátiles ya no pueden moverse dentro de la mucosidad densa y quedan pegados. El mecanismo de limpieza de la mucosa ha dejado de funcionar.

En semejante entorno de mucosidad densa (muy viscosa), las bacterias omnipresentes se hallan especialmente cómodas. La mucosidad constituye un caldo de cultivo óptimo para las bacterias, en el que pueden multiplicarse rápidamente. De este modo, en tres de cada cuatro casos la sinusitis aguda es la secuela de un resfriado inicialmente simple.

Cuando duran mucho tiempo estas condiciones desfavorables, por ejemplo la mucosa hinchada y los cilios vibrátiles pegados con la mucosidad viscosa, entonces la sinusitis puede convertirse en crónica, con lo cual la mucosa y el epitelio nasal pueden quedar dañados a la larga.

Los patógenos importantes de las enfermedades otorrinolaringológicas (HNO), que se instalan en la mucosidad, son por ejemplo el *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* o *Haemophilus influenzae*.

Entre ellos está además la capa de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, llamada MRSA. Contra esta bacteria ya no bastan los antibióticos estándar, por ejemplo los antibióticos de β -lactama, como son la oxacilina, penicilina y amoxicilina, porque debido al uso demasiado frecuente de los antibióticos, que no consiguen erradicar por completo a los patógenos, los supervivientes desarrollan resistencia. Otro riesgo adicional de estos gérmenes patógenos estriba en su presencia en centros quirúrgicos intensivos, en los que pueden provocar inflamaciones pulmonares, infecciones de las heridas e intoxicaciones de la sangre (septicemia, toxemia).

Las drogas en bruto molidas y los extractos etanólicos/acuosos o bien los extractos secos obtenidos a partir de estos últimos (que pueden obtenerse p.ej. por eliminación del disolvente o agente de extracción a presión reducida) de la *Gentiana lutea*, Rumicis herba, *Verbena officinalis*, *Sambucus nigra* y *Primula veris* ya se emplean en el fármaco Sinupret® (como extracto: en la formulación en forma de gotas; y como grageas, que contienen las drogas en bruto molidas) de la empresa BIONORICA como secretolíticos (mucolíticos) y han dado buenos resultados por su poder curativo de base exclusivamente vegetal.

Las plantas curativas empleadas en el Sinupret® se seleccionan, se analizan y se procesan cuidadosamente. BIONORICA logra una calidad constante del medicamento con estrategias óptimas de cultivo y recolección y con un control de calidad muy riguroso.

En el caso de taponamiento de las vías respiratorias superiores con mucosidad densa, los contenidos de la composición empleada (*Gentiana lutea* : Rumicis herba: *Verbena officinalis* : *Sambucus nigra* : *Primula veris* = 1:3:3:3:3) propician la formación de mucosidad fresca y de baja viscosidad. De este modo se disuelve la mucosidad acumulada y puede evacuarse hacia la cavidad de la faringe (garganta). De este modo remite la inflamación de la mucosa nasal, es decir, la mucosa se deshinchas y los senos nasales se abren. El Sinupret® actúa, pues, de modo suave para restablecer la fuerza autolimpiadora de las vías respiratorias. Una característica del Sinupret® es su buena compatibilidad (tolerancia), de modo que la dosificación recomendada por BIONORICA raramente produce efectos secundarios en los pacientes y no se conocen interacciones con otros medicamentos.

La principal sustancia activa del *Sambucus nigra*, el glicósido cianógeno sambunigrina, despliega un efecto antiviral, que se atribuye a que se deposita sobre las espículas de los virus de la gripe (influenzavirus), con las que penetran en las células y pueden provocar infecciones, y de este modo las bloquea (Grabovac, A. y Ullmer, A., Österreichische Apotheker-Verlagsgesellschaft m.b.H., 2003).

En la patente alemana DE 10 2005 053 926 B3 se describe un efecto antibacteriano tópico de las drogas individuales mencionadas en la introducción y también de la mezcla de drogas.

Este efecto es sorprendente para los expertos porque hasta ahora siempre se había creído que los extractos de las Rumicis herba, *Verbena officinalis*, *Sambucus nigra* y *Primula veris* solamente tenían efectos secretolíticos, pero no antibacterianos.

Además, por la solicitud de patente alemana DE 103 41 579 A1 se sabe que los extractos de la *Gentiana lutea* tienen efectos antibacterianos.

Es cierto que en ambos casos existe un espectro de acción muy interesante desde el punto de vista clínico contra un gran número de gérmenes patógenos clínicamente importantes, pero las dosis requeridas son hasta ahora inviables en la práctica.

5 Partiendo del estado de la técnica de la composición del Sinupret® del documento DE 10 2005 053 926 B3 es, pues, objeto de la presente invención proporcionar un material que tenga una mejor eficacia antibacteriana.

10 El objeto anterior se alcanza con las características definidas en las reivindicaciones 1 y 18.

La invención se refiere en especial a un hidrolizado de por lo menos un extracto, que se obtiene por extracción con etanol/agua de material vegetal seco de:

15 a) por lo menos una de las plantas elegidas entre el grupo formado por: *Verbena officinalis* L., *Sambucus nigra* L., *Primula veris* L., *Primula elatior* (L.) Hill y *Gentiana lutea* L.; y también de una mezcla de las mismas; o
b) una mezcla de: *Verbena officinalis* L., *Sambucus nigra* L., *Primula veris* L., *Gentiana lutea* L. y Rumicis herba;

y posterior eliminación del agente de extracción etanol/agua, dicho hidrolizado puede obtenerse por hidrólisis del extracto con un ácido inorgánico.

20 Un hidrolizado preferido se caracteriza porque los extractos pueden obtenerse con un agente de extracción formado por un 50 % en vol. de etanol y un 50 % en vol. de agua a partir del material vegetal con una agitación de 24 h y posterior evaporación con vacío del disolvente.

25 Otra forma preferida de ejecución de la invención consiste en un hidrolizado que puede obtenerse por hidrólisis de los extractos vegetales con ácido clorhídrico como ácido inorgánico, en especial con ácido clorhídrico de una concentración de 1 M a 10 M, con preferencia de 6 a 9 M, en especial en torno a 8 M, entre 80°C y 100°C, en especial aprox. a 90°C, durante un tiempo de 30 min a 120 min, en especial de 40 min a 60 min, con preferencia aprox. de 45 min.

30 Es preferido realizar la hidrólisis de los extractos en presencia de etanol, en especial etanol diluido con agua, con preferencia con etanol del 50 % en vol.

35 Para que los hidrolizados de la presente invención tengan una buena compatibilidad (tolerancia) fisiológica, después del tratamiento con el ácido se concentran los extractos a sequedad, se recogen con preferencia en agua, en un tampón o en etanol diluido y eventualmente se neutralizan con una base farmacéuticamente aceptable. Como base se toma en consideración p.ej. el NaOH, Na₂CO₃ o Na₂HPO₄.

40 El hidrolizado se obtiene con preferencia a partir de un extracto que proviene de los siguientes componentes vegetales:

Rumicis herba (*Rumex acetosa* L., *Rumex acetosella* L., *Rumex obtusifolius* L., *Rumex patientia* L. y *Rumex crispus* L.): hojas y tallo;
45 *Verbena officinalis*: hojas y partes superiores del tallo;
Sambucus nigra: flores;
Primula veris y/o *Primula eliator*: flores y cáliz; y
Gentiana lutea: raíces.

50 Es especialmente preferido un hidrolizado de un extracto formado por una mezcla de:

Gentiana lutea: raíces;
Rumicis herba: hojas y tallo;
Verbena officinalis: hojas y partes superiores del tallo;
55 *Sambucus nigra*: flores; y
Primula veris: flores y cáliz;

las drogas individuales están presentes en el extracto hidrolizado en especial en una proporción ponderal comprendida entre 1:1:1:1:1 y 1:3:3:3:3.

60 Se ha puesto de manifiesto de modo totalmente sorprendente que los hidrolizados de la invención tienen efectos antibacterianos.

Los hidrolizados de la presente invención tienen en general un efecto antibacteriano significativo, cuya acción es comparable a la de un control antibiótico formado por amoxicilina y ácido clavulánico (en una proporción ponderal de

6:1). En cambio, los extractos puros, que no se han sometido a la hidrólisis, tienen solo una actividad antibacteriana escasa o nula en el sistema de ensayo aplicado.

5 Los hidrolizados de la presente invención pueden emplearse para la fabricación de productos con acción antibacteriana contra las bacterias importantes de la piel y de las vías respiratorias, en especial contra los cocos grampositivos, en especial contra el *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans* y/o contra los bacilos gramnegativos, en especial el *Haemophilus influenzae*.

10 En el contexto de la presente invención se han realizado ensayos de los hidrolizados contra los siguientes gérmenes patógenos importantes en las enfermedades de la piel, del HNO y de las vías respiratorias y se ha constatado que son eficaces contra: el *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus pneumoniae* (DSMZ 20566), *Streptococcus pyogenes* (DSMZ 20565), *Streptococcus mutans* (ATCC 35668), *Haemophilus influenzae* (DSMZ 4690), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) y *Enterococcus casseliflavus* (VRE) (DSMZ 20680) y también contra las bacterias intestinales *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Enterococcus faecalis* (VRE) (ATCC 19433).

20 De modo ventajoso y de por sí conocido, los hidrolizados de la presente invención pueden utilizarse para la fabricación de un agente antibacteriano. Dichos agentes antibacterianos pueden utilizarse para proteger contra y/o para tratar las infecciones orales o tópicas de la piel y mucosas en una formulación galénica apropiada para su aplicación.

25 Las formulaciones galénicas de los hidrolizados/agentes antibacterianos de la presente invención se caracterizan porque abarcan las formulaciones orales tales como grageas, tabletas, tabletas recubiertas con película, polvos, cápsulas o productos líquidos diluidos, en especial gotas, zumos o jarabes.

30 En caso de utilización por aplicación tópica son apropiados en especial los espráis, los ungüentos, las emulsiones, los polvos, los polvos finos, los preparados líquidos o sólidos para la inhalación, las compresas, los apósitos para heridas o para las encías, los tampones, las soluciones aplicadas con pincel sobre las amígdalas, las soluciones de gargarismos o las soluciones de lavado de nariz y oído.

Los tampones recién mencionados son también apropiados para las aplicaciones en odontología.

35 Para la utilización de los hidrolizados de la invención como soluciones de lavado de nariz y oído se combinan estos con ventaja con concentraciones fisiológicas o hiperosmolares de sales o de mezclas de sales.

Para el uso como agente antibacteriano se ha constatado que un preparado en forma de liofilizado tiene muchas ventajas, a saber, en especial para el almacenado y la estabilidad a largo plazo.

40 Los agentes antibacterianos de la presente invención pueden contener obviamente los adyuvantes farmacéuticos habituales.

45 Durante las investigaciones microbiológicas realizadas en el Instituto de Química Analítica y Radioquímica de la Universidad de Innsbruck se ha encontrado de modo sorprendente que los hidrolizados de la invención tienen un efecto antibacteriano amplio, en algunos casos acusado, contra los patógenos importantes de la piel, de las vías respiratorias y del HNO, que durante los ensayos en cuestión han tenido un efecto antibacteriano mucho más acusado que los extractos no hidrolizados. Por ejemplo, en los ensayos de sensibilidad antibacteriana por el método de difusión a través de agar según Mueller-Hinton [Mueller, H.J. y Hinton, J.: A proteinfree medium for primary isolation of the Gonococcus and Meningococcus, en Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 48, 330-333, 1941] se pone de manifiesto
50 que de los cinco extractos de drogas individuales no hidrolizados solamente son eficaces contra varios patógenos las Rumicis herba y la *Primula veris* y la mezcla no hidrolizada de la *Gentiana lutea*, *Sambucus nigra*, *Verbena officinalis*, Rumicis herba y *Primula veris* de modo sorprendente no tiene prácticamente ningún efecto antibacteriano en el ensayo de difusión a través de agar contra el panel de bacterias de referencia que se somete al ensayo. Es interesante constatar que se obtiene también el mismo resultado, es decir, que el efecto bacteriano se dirige en cada
55 caso como máximo contra un germen en las más variadas combinaciones de por lo menos tres drogas individuales de las cinco mencionadas.

60 Esto es acorde con la patente alemana DE 10 2005 053 926 B3, de la que se desprende que el efecto antibacteriano de las drogas individuales no hidrolizadas o de las combinaciones de las mismas solamente se observa para unos pocos gérmenes. En lo que respecta a los patógenos, en los que los extractos no hidrolizados ejercen alguna acción así como al grado de tal acción, existe una gran conformidad (coincidencia) entre el estado de la técnica y la presente invención.

65 Por ello ha sido tanto más sorprendente el resultado de que después de la hidrólisis de los extractos de las drogas individuales su perfil de efectos antibacterianos se invierte en algunos casos: por ejemplo, un extracto hidrolizado

según la invención de las Rumicis herba prácticamente ya no tiene actividad antibacteriana, mientras que el extracto no hidrolizado tenía previamente un marcado efecto contra la mayoría de las cepas bacterianas probadas en el ensayo.

- 5 Sin embargo, la mayor sorpresa consistió en que un hidrolizado de una mezcla de la *Gentiana lutea*, *Sambucus nigra*, *Verbena officinalis*, *Primula veris* y Rumicis herba tiene un efecto antibacteriano significativo contra todas las cepas bacterianas probadas en el ensayo.

10 Los hidrolizados y el agente antibacteriano de la presente invención pueden utilizarse, pues, con ventaja para el tratamiento de infecciones provocadas por patógenos importantes de las vías respiratorias. El efecto mucolítico y antiinflamatorio de las drogas y mezclas de drogas estudiadas se complementa con el efecto antibacteriano adicional, que permite no solo debilitar una infección de las vías respiratorias superiores por disolución de la mucosidad viscosa, cargada de gérmenes patógenos, sino también bloquearla por completo con la muerte de los gérmenes patógenos bacterianos.

15 Gracias al efecto medicinal resultante de las cinco plantas curativas, la *Gentiana lutea*, Rumicis herba, *Verbena officinalis*, *Sambucus nigra* y *Primula veris*, se puede tratar un paciente afectado por la sinusitis de modo suave, sin necesidad de componentes químicos sintéticos. El preparado se caracteriza además por una buena tolerancia (compatibilidad) en lo tocante a sus interacciones con otros medicamentos y en lo que respecta a efectos secundarios que raramente aparecen.

20 El agente antibacteriano de la presente invención es eficaz en especial contra los siguientes patógenos, desplegando su efecto antibacteriano en particular contra los cocos grampositivos, por ejemplo el *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Klebsiella*, contra los bacilos gramnegativos, por ejemplo el *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* y contra las bacterias del intestino, por ejemplo el *Enterococcus faecalis* (VRE), *Enterococcus casseliflavus* y la *E. coli*.

25 La presente invención se refiere también a la utilización de los hidrolizados y agentes antibacterianos de la invención para la fabricación de un fármaco destinado al tratamiento de infecciones provocadas por patógenos importantes de las vías respiratorias y del HNO dentro del ámbito de las vías respiratorias y del HNO.

Otras ventajas y características de la presente invención se desprenden de la descripción y de los ejemplos de ejecución.

35 Ejemplos

Preparación de los extractos vegetales

40 Las drogas individuales *Gentiana lutea*, Rumicis herba, *Verbena officinalis*, *Sambucus nigra* y *Primula veri* y los extractos mixtos con composiciones variables de drogas (extracto de 5 plantas, extracto de 4 plantas, extracto de 3 plantas) se extraen a temperatura ambiente con una mezcla de etanol al 50 % en H₂O (v/v, aprox. 1 g de material vegetal por 20 ml de disolvente) con agitación durante 24 h. En el caso de los extractos mixtos, esto significa que de cada planta se emplea, tal como se ha indicado previamente, aprox. 1 g de material y que dicha mezcla de materiales se extrae en total con 20 ml de disolvente. La proporción ponderal de las drogas individuales se sitúa en:

45 1:1:1:1:1, 1:1:1:1, 1:1:1.

Preparación de los hidrolizados

50 A 1,6 ml de los extractos recién descritos se les añaden 320 µl de HCl del 25 % (equivalentes a 8,1 moles/l) y 80 µl de EtOH del 50 % y se hidrolizan a 90°C durante 45 minutos.

Con fines comparativos se realiza la hidrólisis en las mismas condiciones en un segundo paso con 1 ml de extracto al que se añade 1 ml de HCl del 25 %. Se concentran los extractos, se recoge el residuo en 1 ml de agua estéril y comprueba el efecto antibacteriano de la solución de ensayo resultante.

55 Se compara el efecto de los hidrolizados con el efecto de los extractos individuales o mixtos antes de la hidrólisis. Los extractos no hidrolizados están en EtOH al 50 % en H₂O (ver antes), eventualmente se iguala por evaporación la concentración de los contenidos de los extractos no hidrolizados con la de los hidrolizados. De este modo, cuando los pesos de drogas vegetales son iguales, los contenidos extraídos ocuparán en cada caso el mismo volumen.

60 Estudio del efecto antibacteriano antes y después de la hidrólisis de los extractos vegetales

Procedimiento de exploración (screening)

65 Sobre placas de agar Müller Hinton o sobre placas de agar Müller Hinton con un 5 % de sangre de carnero, que

tienen una concentración desconocida de las bacterias a ensayar, se depositan 80 µl de solución de ensayo (sin hidrolizar o hidrolizada) y se incuban a 37°C durante 24 h.

Máquina espiral de placas (Spiral Platter):

5 Se suspende una colonia de bacterias en 5 ml de un caldo CASO y se incuban a 37°C durante 24 h.

Después de centrifugar la muestra se separa el líquido sobrenadante, se lava con NaCl del 0,9 % y se diluye hasta una concentración de 10^7 cfu/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro).

10 Se diluyen también 80 µl de solución de ensayo (sin hidrolizar o hidrolizada) en relación 1:2, 1:20 y 1:200 y se mezcla con la suspensión de bacterias (en el caso del *Pneumococcus* y *H. influenzae* en relación 1:10, en el caso de los demás patógenos en relación 1:100). Como control positivo se emplea el NaCl del 0,9 %.

15 Después de 0, 4 y 8 h se depositan las muestras sobre placas en una máquina Whitley Automatic Spiral Platter (WASP) y se incuban a 37°C durante 24 horas.

Antes de la hidrólisis

20 Ensayos de exploración: drogas individuales/extracto mixto antes de la hidrólisis

En la tabla 1 se recogen los resultados del estudio de los efectos antibacterianos de los correspondiente extractos individuales de la *Gentiana lutea* (*Gentiana l.*), *Sambucus nigra* (*Sambucus n.*), *Verbena officinalis* (*Verbena o.*), Rumex herba (Rumex h.) y *Primula veris* (*Primula v.*) así como de un extracto mixto de las 5 plantas (extracto 5 plantas) contra los patógenos *Staphylococcus aureus* (*Staph. aureus*) (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (ATCC 27853), *Streptococcus pneumoniae* (*Pneumococcus*) (DSMZ 20566), *Streptococcus pyogenes* (*Strept. pyogenes*) (DSMZ 20565), *Klebsiella pneumoniae* (*Klebsiella*) (ATCC 13883), *Escherichia coli* (*E. coli*) (ATCC 25922), *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) (DSMZ 4690), *Staphylococcus epidermidis* (*Staph. epidermidis*) (ATCC 12228), *Enterococcus faecalis* (VRE) (*Ent. faecalis* (VRE) (ATCC 19433)) y *Enterococcus casseliflavus* (VRE) (*Ent. casseliflavus* (VRE) (DSMZ 20680)). +M = actividad antibacteriana en agar según Mueller Hinton; +B = actividad antibacteriana en agar según Mueller Hinton con un 5 % de sangre de carnero, + = efecto en ambas placas.

Tabla 1

35

	<i>Gentiana l.</i>	<i>Sambucus n.</i>	<i>Verbena o.</i>	Rumicis h.	<i>Primula v.</i>	extracto de 5 plantas
<i>Staph. aureus</i>	∅	∅	∅	+	+M	∅
<i>P. aeruginosa</i>	∅	+B	∅	+B	∅	∅
<i>Pneumococcus</i>	∅	∅	∅	+M	+M	∅
<i>Strept. pyogenes</i>	∅	∅	∅	+M	+M	∅
<i>Klebsiella</i>	∅	∅	∅	∅	∅	∅
<i>E. coli</i>	∅	∅	∅	∅	∅	∅
<i>H. influenzae</i>	∅	∅	∅	∅	∅	∅
<i>Staph. epidermidis</i>	∅	∅	∅	+	∅	∅
<i>Ent. faecalis</i> (VRE)	∅	∅	∅	+	∅	∅
<i>Ent. casseliflavus</i> (VRE)	∅	∅	∅	+M	∅	∅

máquina de placas Spiral Platter: Rumicis herba, antes de la hidrólisis

40 En la tabla 2 se recoge la cuantificación del efecto antibacteriano de las Rumicis herba y de la *Primula veris* por deposición sobre placas en máquina Spiral Platter contra los patógenos mencionados en la tabla 1. Las muestras se cuantifican en cada caso en diluciones de 1:20 o de 1:200. ++++ = 10^2 cfu/ml después de 0 h, +++ = 10^2 cfu/ml después de 4 h, ++ = 10^2 cfu/ml después de 8 h, + = 10^2 - 10^4 cfu/ml después de 8 h, (+) = actividad superior a la del grupo de control.

Tabla 2

	Rumicis h.		Primula v.	
	1:20	1-200	1:20	1-200
<i>Staph. aureus</i>	+++	+	++	(+)
<i>P. aeruginosa</i>	∅	∅	∅	∅
<i>Pneumococcus</i>	++++	++++	++++	++++
<i>Strept. pyogenes</i>	++++	++++	++++	++
<i>Klebsiella</i>	∅	∅	∅	∅
<i>E. coli</i>	∅	∅	∅	∅
<i>H. influenzae</i>	∅	∅	∅	∅
<i>Staph. epidermidis</i>	++	++	∅	∅
<i>Ent. faecalis</i> (VRE)	++++	++++	∅	∅
<i>Ent. casseliflavus</i> (VRE)	++++	++++	∅	∅

Ensayos de exploración: mezclas de plantas de diversas composiciones, no hidrolizadas

- 5 En la tabla 3 se recogen los efectos antibacterianos de los extractos mixtos de las drogas individuales mencionadas en la tabla 1 al 50 % en etanol, formados en cada caso por 5, 4 ó 3 plantas, contra los patógenos mencionados en la tabla 1 obtenidos en ensayos de exploración. *Gentiana lutea* (G), *Sambucus nigra* (S), *Verbena officinalis* (V), Rumicis herba (R) y *Primula veris* (P). + = efecto en las dos placas (agar de Müller Hinton, agar de Müller Hinton con un 5 % de sangre de carnero), (+) = efecto en una placa.
- 10

Tabla 3

	RGVS P	RVS P	RGV P	RGS P	RGVS	GVSP	RV P	VS P	GV P	GV S	RS P
<i>Staph. aureus</i>	∅	+	+	+	(+)	(+)	∅	∅	∅	∅	(+)
<i>P. aeruginosa</i>	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
<i>Pneumococcus</i>	∅	∅	∅	∅	∅	∅	(+)	∅	∅	∅	∅
<i>Strept. pyogenes</i>	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+
<i>Klebsiella</i>	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
<i>E. coli</i>	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
<i>H. influenzae</i>	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
<i>Staph. epidermidis</i>	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
<i>Ent. faecalis</i> (VRE)	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
<i>Ent. casseliflavus</i> (VRE)	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

	RGP	RGS	RGV	RVS	GSP
<i>Staph. aureus</i>	+	∅	∅	∅	∅
<i>P. aeruginosa</i>	∅	∅	∅	∅	∅
<i>Pneumococcus</i>	∅	∅	∅	∅	∅
<i>Strept. pyogenes</i>	∅	+	∅	∅	∅
<i>Klebsiella</i>	∅	∅	∅	∅	∅
<i>E. coli</i>	∅	∅	∅	∅	∅
<i>H. influenzae</i>	∅	∅	∅	∅	∅
<i>Staph. epidermidis</i>	∅	∅	∅	∅	∅
<i>Ent. faecalis</i> (VRE)	∅	∅	∅	∅	∅
<i>Ent. casseliflavus</i> (VRE)	∅	∅	∅	∅	∅

Después de la hidrólisis

Ensayos de exploración: drogas individuales/extracto mixto después de la hidrólisis

- 20 En la tabla 4 se representan los efectos antibacterianos de los extractos obtenidos de las drogas vegetales mencio-

nadas en la tabla 1 y de un extracto mixto formado por las cinco plantas, después de haberse hidrolizado con ácido clorhídrico, contra los patógenos mencionados en la tabla 1. Una vez realizada la hidrólisis se concentran los extractos a sequedad y se disuelven en agua estéril. +M = actividad antibacteriana en el agar de Mueller Hinton; + = efecto sobre ambas placas (agar de Müllter Hinton, agar de Müller Hinton con un 5 % de sangre de carnero), (+) = efecto sobre una placa.

5

Tabla 4

	<i>Gentiana l.</i>	<i>Sambucus n.</i>	<i>Verbena o.</i>	Rumicis h.	<i>Primula v.</i>	extracto de 5 plantas
<i>Staph. aureus</i>	+	+	∅	∅	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	(+)	∅	∅	+	+
<i>Pneumococcus</i>	+	+	+	∅	+	+
<i>Strept. pyogenes</i>	+	+	+	∅	+	+
<i>Klebsiella</i>	+	(+)	∅	∅	+	+
<i>E. coli</i>	+	∅	∅	∅	+	+
<i>H. influenzae</i>	+	+	∅	∅	+	+
<i>Staph. epidermidis</i>	+	+	+	∅	+	+
<i>Ent. faecalis</i> (VRE)	+	∅	∅	∅	+	+
<i>Ent. casseliflavus</i> (VRE)	+	∅	∅	∅	+	+

10 Máquina de placas Spiral Platter: cuantificación de las drogas individuales o del extracto de 5 plantas

En la tabla 5 se recoge la cuantificación de los hidrolizados obtenidos de las drogas vegetales mencionadas en la tabla 1 y del extracto de 5 plantas mediante la máquina de placas contra los patógenos mencionados en la tabla 1. Todas las soluciones se determinan en una dilución de 1:20. +++++ = 10^2 cfu/ml después de 0 h, +++ = 10^2 cfu/ml después de 4 h, ++ = 10^2 cfu/ml después de 8 h, + = 10^3 - 10^4 cfu/ml después de 8 h, (+) = más actividad que la del grupo de control.

15

Tabla 5

	<i>Gentiana l.</i>	<i>Sambucus n.</i>	<i>Verbena o.</i>	<i>Primula v.</i>	extracto de 5 plantas
<i>Staph. aureus</i>	(+)	(+)	+	+++	(+)
<i>P. aeruginosa</i>	++++	+++	++++	++++	++++
<i>Pneumococcus</i>	+++	+	(+)	++++	
<i>Strept. pyogenes</i>	++++	++++	++++	++++	++++
<i>Klebsiella</i>	+++	++	++	+++	+++
<i>E. coli</i>	+++	(+)	(+)	+	+
<i>H. influenzae</i>	++++	++++	++++	++++	++++
<i>Staph. epidermidis</i>	+++	+++	+++	++++	+++
<i>Ent. faecalis</i> (VRE)	+++	++	+	+++	+++
<i>Ent. casseliflavus</i> (VRE)	+++	++	+++	+++	+++

20

Comparación de las reproducibilidades de los efectos antibacterianos

En la tabla 6 se recoge un estudio de la reproducibilidad de los efectos antibacterianos de varios extractos de las mismas drogas individuales (*Sambucus nigra*, *Gentiana lutea*, *Primula veris*). La cuantificación se realiza en una máquina Spiral Platter con una dilución de la muestra de 1:20. +++++ = 10^2 cfu/ml después de 0 h, +++ = 10^2 cfu/ml después de 4 h, ++ = 10^2 cfu/ml después de 8 h, + = 10^3 - 10^4 cfu/ml después de 8 h, (+) = mayor actividad que la del grupo de control.

25

Tabla 6

<i>Sambucus n.</i>	extracto 1	extracto 2	extracto 3
<i>Staph. aureus</i>	(+)	(+)	(+)
<i>P. aeruginosa</i>	+++	+++	++++
<i>Pneumococcus</i>	+	++	++
<i>Strept. pyogenes</i>	++++	+++	+++
<i>Klebsiella</i>	++	(+)	+++
<i>E. coli</i>	(+)	(+)	
<i>H. influenzae</i>	++++	++++	
<i>Staph. epidermidis</i>	+++	++	++++
<i>Ent. faecalis</i> (VRE)	++	(+)	++
<i>Ent. casseliflavus</i> (VRE)	++	++	+++

5

<i>Gentiana l.</i>	extracto 1	extracto 2	extracto 3
<i>Staph. aureus</i>	(+)	(+)	(+)
<i>P. aeruginosa</i>	++++	++++	++++
<i>Pneumococcus</i>	+++	++++	++++
<i>Strept. pyogenes</i>	++++	++++	++++
<i>Klebsiella</i>	+++	+++	++++
<i>E. coli</i>	+++	+	++++
<i>H. influenzae</i>	++++	++++	++++
<i>Staph. epidermidis</i>	+++	+++	++++
<i>Ent. faecalis</i> (VRE)	+++	++	+++
<i>Ent. casseliflavus</i> (VRE)	+++	+++	++++

<i>Primula v.</i>	extracto 1	extracto 2	extracto 3	extracto 4	extracto 5
<i>Staph. aureus</i>	+++	(+)	++	(+)	+
<i>P. aeruginosa</i>	++++	+++	++++	++++	++++
<i>Pneumococcus</i>	++++	(+)	+++	+++	+++
<i>Strept. pyogenes</i>	++++	+++	++++	++++	+++
<i>Klebsiella</i>	+++	(+)	++++	+	+++
<i>E. coli</i>	+	(+)	+++	++	+
<i>H. influenzae</i>	++++	+++	++++	++++	++++
<i>Staph. epidermidis</i>	++++	(+)	+++	+++	+++
<i>Ent. faecalis</i> (VRE)	+++	(+)	+++	+	+
<i>Ent. casseliflavus</i> (VRE)	+++	++	+++	+++	++

REIVINDICACIONES

1. Hidrolizado por lo menos de un extracto, que se obtiene por extracción con etanol/agua de material vegetal seco de:
- 5 a) por lo menos una de las plantas elegidas entre el grupo formado por: la *Verbena officinalis* L., *Sambucus nigra* L., *Primula veris* L., *Primula elatior* (L.) Hill y *Gentiana lutea* L.; o bien de una mezcla de las mismas; o
b) de una mezcla de: *Verbena officinalis* L., *Sambucus nigra* L., *Primula veris* L., *Gentiana lutea* L. y las Rumicis herba;
- 10 y posterior eliminación del agente de extracción etanol/agua, caracterizado porque el hidrolizado puede obtenerse por hidrólisis del extracto con un ácido inorgánico.
2. Hidrolizado según la reivindicación 1, caracterizado porque los extractos pueden obtenerse a partir del material vegetal con un agente de extracción formado por un 50 % en vol. de etanol y un 50 % en vol. de agua con agitación durante un período de tiempo de 6 h a 36 h, en especial de 12 a 30 h, con preferencia aprox. de 24 h y eventualmente posterior evaporación del disolvente con vacío.
3. Hidrolizado según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque puede obtenerse por hidrólisis de los extractos empleando como ácido inorgánico el ácido clorhídrico, en especial ácido clorhídrico de una concentración de 1 M a 10 M, con preferencia de 6 a 9 M, en especial aprox. 8 M, a una temperatura entre 80°C y 100°C, en especial aprox. a 90°C, durante un tiempo de 30 min a 120 min, en especial de 40 min a 60 min, con preferencia aprox. de 45 min.
4. Hidrolizado según la reivindicación 3, caracterizado porque la hidrólisis de los extractos se realiza en presencia de etanol, en especial etanol diluido con agua, con preferencia etanol del 50 % en vol.
5. Hidrolizado según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se concentra a sequedad para obtener un extracto seco y eventualmente está presente en forma neutralizada.
- 30 6. Hidrolizado según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el material vegetal empleado para la obtención del extracto seco proviene de los siguientes componentes vegetales:
- Rumicis herba (*Rumex acetosa* L., *Rumex acetosella* L., *Rumex obtusifolius* L., *Rumex patientia* L. y *Rumex crispus* L.): hojas y tallo;
- 35 *Verbena officinalis*: hojas y partes superiores del tallo;
Sambucus nigra: flores;
Primula veris y/o *Primula eliator*: flores y cáliz; y
Gentiana lutea: raíces.
- 40 7. Hidrolizado según la reivindicación 6, caracterizado porque el extracto está formado por una mezcla de:
- Gentiana lutea*: raíces;
Rumicis herba: hojas y tallo;
Verbena officinalis: hojas y partes superiores del tallo;
- 45 *Sambucus nigra*: flores; y
Primula veris: flores y cáliz;
- las drogas individuales están presentes en especial en una proporción ponderal comprendida entre 1:1:1:1:1 y 1:3:3:3:3.
- 50 8. Hidrolizado según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque tiene efecto antibacteriano.
9. Hidrolizado según la reivindicación 8, caracterizado porque el efecto antibacteriano va dirigido contra bacterias importantes de enfermedades de la piel, de HNO o de las vías respiratorias, en especial contra los cocos grampositivos, en especial el *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans* y/o los bacilos gramnegativos, en especial el *Haemophilus influenzae*.
- 55 10. Hidrolizado según la reivindicación 9, caracterizado porque los patógenos se eligen entre el *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus pneumoniae* (DSMZ 20566), *Streptococcus pyogenes* (DSMZ 20565), *Haemophilus influenzae* (DSMZ 4690); *Enterococcus casseliflavus* (DSMZ 20680); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883); *E. coli* y *Enterococcus faecalis*; y también entre sus mezclas.
- 60 11. Hidrolizado según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque puede administrarse en forma de formulación galénica para la protección y/o el tratamiento de infecciones por vía oral o tópica sobre la piel y las
- 65

mucosas.

- 5 12. Hidrolizado según la reivindicación 11, caracterizado porque sus formulaciones orales comprenden las grageas, tabletas, tabletas recubiertas con película, cápsulas, diluciones líquidas, en especial gotas, zumos, jarabes.
- 10 13. Hidrolizado según la reivindicación 11, caracterizado porque las formulaciones de aplicación tópica abarcan los espráis, los ungüentos, las emulsiones, polvos, polvos finos, preparados líquidos o sólidos para la inhalación, las compresas, los apósitos para heridas o para encías, los tampones, las soluciones aplicables con pincel sobre las amígdalas, las soluciones para gargarismos o las soluciones para el lavado de nariz y oído.
- 15 14. Hidrolizado según la reivindicación 13, caracterizado porque los tampones son también apropiados para aplicaciones odontológicas.
- 15 15. Hidrolizado según la reivindicación 13, caracterizado porque las soluciones de lavado de nariz y oído se presenta en forma de combinación con concentraciones fisiológicas o hiperosmolares de sales o de mezclas de sales.
- 20 16. Hidrolizado según una de las reivindicaciones de 1 a 15, caracterizado porque se presenta en forma de liofilizado.
- 25 17. Agente antibacteriano, caracterizado porque contiene un hidrolizado según por lo menos una de las reivindicaciones de 1 a 16.
18. Agente antibacteriano según la reivindicación 17, caracterizado porque contiene los adyuvantes farmacéuticos habituales.
19. Agente antibacteriano según la reivindicación 17 ó 18, caracterizado porque se presenta en forma de formulación "retard" (de liberación retardada).