

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 503 340**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

C12N 9/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2005 E 05799363 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 1814977**

54 Título: **Composiciones a base de Arthrospira y usos de los mismos**

30 Prioridad:

03.11.2004 AU 2004906317

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

06.10.2014

73 Titular/es:

**BIOVITE AUSTRALIA PTY LTD (100.0%)
1/45 - 47 TOWNSHIP DRIVE
WEST BURLEIGH, QUEENSLAND 4219, AU**

72 Inventor/es:

**DUNCAN, KELVIN WINSTON;
JOHNSTON, PETER OWEN y
BROWN, ASHLEY MICHAEL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 503 340 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

Composiciones a base de *Arthrospira* y usos de los mismos

5 La presente invención se refiere a una composición antifúngica tópica que comprende una cantidad fungicida eficaz de una *Arthrospira* fisiológicamente estresada no liofilizada, a un método para preparar dicha composición para uso tópico en un sujeto y a una cantidad fungicida eficaz de *Arthrospira* fisiológicamente estresada no liofilizada para administración tópica a un sujeto para uso en la prevención o el tratamiento de una infección o infestación fúngica del sujeto.

10 La *Arthrospira* (anteriormente conocida como *Spirulina*) es una cianobacteria que se cultiva principalmente para uso como fuente de alimento y/o proteína. Se han descrito también usos terapéuticos para *Arthrospira*, incluyendo el uso como agente antivírico, agente anticanceroso, reductor del colesterol, reductor de la diabetes, reductor de la hipertensión e inmunomodulador. Véanse, por ejemplo, las referencias citadas en el sitio web de SpirulinaSource.com en <http://www.spirulinasource.com/library.html>.

15 El documento WO 1998/025.471 da a conocer un método de preparación de un compuesto de *Spirulina* tratado, incluyendo dicho método las etapas de rehidratar *Spirulina* desecada, estresar el cultivo y liofilizar la composición hasta un polvo. El compuesto resultante tiene actividad como compuesto antivírico y compuesto antibacteriano.

Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición de *Arthrospira* para uso como antifúngico.

20 Los presentes inventores han descubierto que la *Arthrospira*, cuando se estresa fisiológicamente, produce al menos un tipo de agente bioactivo que es activo contra hongos, bacterias y presuntamente virus. La *Arthrospira* puede estresarse fisiológicamente, por ejemplo, privando al organismo de nutrientes o luz, o deshidratando/secando el organismo. Es una señal de que un filamento de *Arthrospira* (tracoma) está "fisiológicamente estresado" cuando entra en estado anabiótico, en cuyo estado el filamento se redondea y se produce un recubrimiento mucoide espeso. Se cree por los inventores que el filamento y/o recubrimiento mucoide espeso contiene uno o más agentes bioactivos que protegen al organismo frente a los predadores. Uno o más de los bioactivos pueden degradar la pared celular o exoesqueleto de un organismo predador. Uno o más de los agentes bioactivos pueden ser, por ejemplo, un agente lítico o modificador tal como quitinasa, quitosanasa o quitina desacetilasa, que digiere quitina, un derivado de quitina (tal como quitosano) u otro polímero de pared celular que tenga, por ejemplo, *N*-acetilglucosamina o *D*-glucosamina como subunidad polimérica. El peptidoglicano de bacterias grampositivas es uno de dichos polímeros, que comprende *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico. La quitina, derivado de quitina o polímero puede estar en cualquier forma adecuada. La quitina, derivado de quitina o polímero puede estar en una forma sustancialmente purificada o puede ser parte de un organismo tal como la pared celular de un hongo o bacteria grampositiva, o parte del exoesqueleto de un insecto.

30 Preferiblemente, el agente bioactivo puede ser una quitinasa, quitosanasa o quitina desacetilasa y el sustrato diana es quitina, un derivado de quitina o un polímero que tiene *N*-acetil-*D*-glucosamina como subunidad polimérica. Preferiblemente, se usa la respirometría para ensayar la modificación (concretamente degradación) de la quitina, derivado de quitina u otro polímero.

40 La presente invención se refiere a un método de preparación de una composición antifúngica para uso tópico en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de: (1) estresar fisiológicamente *Arthrospira*, por falta de nutrientes o luz, por deshidratación o retirando hasta un 80 % del líquido en el que se está cultivando la *Arthrospira*; y (2) combinar una cantidad fungicida eficaz de la *Arthrospira* estresada de (1) con un portador, disolvente, base o excipiente adecuado para administración tópica al sujeto, en el que la cantidad fungicida eficaz es eficaz frente a hongos, y en el que la *Arthrospira* no se ha liofilizado.

Se reivindican realizaciones preferidas de dicho método en las reivindicaciones dependientes 2 a 6.

45 La presente invención se refiere también a una composición antifúngica tópica que comprende una cantidad fungicida eficaz de *Arthrospira* fisiológicamente estresada no liofilizada, en el que el estresado fisiológico se consigue por falta de nutrientes o luz, por deshidratación o por retirada de hasta un 80 % del líquido en el que se está cultivando la *Arthrospira*, y un portador, disolvente, base o excipiente adecuado para administración tópica a un sujeto, en la que la cantidad fungicida eficaz es eficaz frente a hongos.

Se reivindican realizaciones preferidas de dicha composición en las reivindicaciones 8 a 10.

50 La invención se refiere finalmente a una cantidad fungicida eficaz de *Arthrospira* fisiológicamente estresada no liofilizada, en la que el estresado fisiológico se consigue por falta de nutrientes o luz, por deshidratación o retirando hasta un 80 % del líquido en el que se está cultivando la *Arthrospira*, y un portador, disolvente, base o excipiente para administración tópica a un sujeto, para uso en la prevención o el tratamiento de una infección o infestación fúngica del sujeto.

55 Se reivindican realizaciones preferidas de dicha cantidad fungicida eficaz de *Arthrospira* fisiológicamente estresada no liofilizada en las reivindicaciones 12 a 14.

Uso de *Arthrospira* fisiológicamente estresada como agente biocida y/o terapéutico

La quitina, derivados de quitina y polímeros que contienen glucosamina se encuentran en la naturaleza, habitualmente como componente de una pared celular o exoesqueleto, por ejemplo, de algas, hongos, protozoos, ciliados, celentéreos, briozoos, moluscos, anélidos, artrópodos, branquiópodos, foronídeos, poganóforos y bacterias (bacterias grampositivas y *Rhizobia*).

Por ello, la *Arthrospira* fisiológicamente estresada que tiene actividad lítica o modificadora frente a quitina, derivados de quitina y polímeros que contienen glucosamina puede usarse potencialmente como agente biocida contra un amplio intervalo de organismos. "Biocida", como se usa en la presente memoria, hace referencia a la muerte de un organismo o la inhibición del crecimiento o replicación de un organismo (concretamente, el organismo puede no morir realmente). Ha de apreciarse que algunas aplicaciones del biocida serán con fines terapéuticos, lo que no se reivindica en las reivindicaciones, pero sirve para una mejor comprensión de la invención.

Sorprendentemente, los inventores han encontrado que sacar a *Arthrospira* de su entorno de crecimiento puede ser suficiente para que aparezca el estrés fisiológico y para inducir la expresión de uno o más agentes que tienen actividad biocida. Es decir, las etapas para estresar fisiológicamente *Arthrospira* como se enseñan en las memorias descriptivas de las patentes de Nueva Zelanda nº 336620 y 336619 no tienen que llevarse a cabo, y la *Arthrospira* no tiene que procesarse adicionalmente (desestabilizarse, descomprimirse explosivamente, potenciarse, molerse, rehidratar con bicarbonato de sodio o liofilizarse) para que haya actividad biocida.

Además, se ha encontrado que todas las preparaciones comercialmente disponibles (comprimidos, cápsulas y polvos) de *Arthrospira* que se han ensayado hasta ahora por los inventores tienen actividad contra un sustrato, y se cree que esa actividad es indicativa de actividad biocida. Dichas preparaciones se preparan habitualmente recogiendo *Arthrospira*, lavando y secando *Arthrospira*, sin una etapa para estresar específicamente el organismo. De hecho, los cultivadores comerciales de *Arthrospira* tienden a minimizar el estrés del organismo lo más posible, ya que el recubrimiento mucoso espeso tiende a obstruir la maquinaria para procesar el organismo.

Para una cualquiera o más de las composiciones descritas en la presente memoria, la *Arthrospira* puede ser cualquier especie adecuada, o mezcla de especies o variantes de *Arthrospira* incluyendo, pero sin limitación, *A. maxima*. Ha de destacarse que *Arthrospira* y *Spirulina* son dos géneros separados. La separación entre estos dos géneros se ha afirmado repetidamente basándose en muchas características, incluyendo: helicidad y tamaño del tricoma, estructura de la pared celular y patrón de poros, vacuolas gaseosas, patrón de tilacoides, motilidad y fragmentación del tricoma, contenido de GC, catálogo oligonucleotídico de ARNr de 16S y mutaciones en el locus *cpcB--cpcA*. Véanse, por ejemplo, J. F. Manen y J. Falquet (2002) "The *cpcB--cpcA* locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): evidence for horizontal transfer". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 52, 861-867; y capítulo 1: "Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *Maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *Platensis*" de Luisa Tomaselli, de "*Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell-biology and Biotechnology". Taylor y Francis. Avigad Vonshak (Ed) 1997. Las composiciones descritas en esta memoria descriptiva excluyen las especies del género *Spirulina*.

La composición puede comprender filamentos intactos de *Arthrospira*, segmentos de los filamentos, segmentos desestabilizados/lisados o extractos/fracciones de los mismos. La composición puede comprender *Arthrospira* que está viva o que no está viva. Preferiblemente, la composición comprende filamentos y segmentos de *Arthrospira* desestabilizados.

Preferiblemente, la etapa de estresado fisiológico de *Arthrospira* comprende retirar hasta un 80 % del líquido en el que se está cultivando la *Arthrospira*; y la etapa (2) está precedida por las etapas (1a) y (1b) siguientes: (1a) lavado de la *Arthrospira* estresada para retirar contaminantes y (1b) secado de la *Arthrospira* lavada.

Las etapas opcionales incluyen: estresar fisiológicamente adicionalmente la *Arthrospira* de cualquier modo adecuado, desestabilizar los filamentos y segmentos de cualquier modo adecuado, esterilizar el organismo de cualquier modo adecuado, decolorar la *Arthrospira* de cualquier modo adecuado, retirar o degradar la clorofila de cualquier modo adecuado, y moler la *Arthrospira* secada.

Algunas de las etapas anteriores se describen, por ejemplo, en las memorias descriptivas de las patentes de Nueva Zelanda nº 336620 y 336619, cuyos contenidos completos se incorporan a la presente como referencia cruzada. Por ejemplo, puede llevarse a cabo el estresado en el momento de la recogida privando a *Arthrospira* de nutrientes esenciales (disminución de nutrientes) o luz durante un periodo suficiente para estresarla pero no matarla controlando las condiciones de crecimiento. El estresado puede ser también por desecación parcial o recogiendo la *Arthrospira* y manteniéndola viva en condiciones húmedas hasta que se estrese pero no muera. Por ejemplo, puede secarse por pulverización *Arthrospira*, formando un polvo fino de células desestabilizadas. El secado por pulverización puede tener lugar, por ejemplo, a 50-190 °C durante unos pocos segundos. Por ejemplo, el secado puede llevarse a cabo de cualquier modo adecuado incluyendo secado ciclónico, secado por bomba de calor, secado por tubo de calor, secado refractario o secado térmico a aproximadamente 67 °C durante cortos periodos de tiempo. Por ejemplo, los filamentos pueden desestabilizarse usando molido o descompresión explosiva como se

describe en las patentes de Nueva Zelanda nº 328013 y nº 328740, cuyos contenidos completos se incorporan a la presente memoria como referencia cruzada.

5 La concentración de *Arthrospira* en la composición puede variar dependiendo de la aplicación, por ejemplo, en cualquier punto de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 %. La composición puede incluir cualquier disolvente, portador, base, excipiente, carga, aglutinante, plastificante, emulsionante, estabilizante, lubricante, agente de tamponación, emoliente, agente solubilizante, agente de suspensión, espesantes, fragancia, colorante y conservante adecuado.

10 Dependiendo del uso pretendido, la composición puede comprender adicionalmente uno o más principios activos no derivados de *Arthrospira*, tales como antimicrobianos (por ejemplo, bactericidas o antifúngicos), agentes terapéuticos (por ejemplo, agentes curadores de heridas, esteroides) o nutrientes generales (por ejemplo, aminoácidos, vitaminas). Dichos principios activos son bien conocidos en la materia.

15 La composición puede estar en cualquier forma adecuada. La composición puede administrarse o aplicarse de cualquier modo adecuado. La composición puede ser un líquido, gel o sólido, o una mezcla de los mismos. La composición puede ser un cultivo líquido de *Arthrospira* que se aplica como pulverizador. Como alternativa, la composición puede ser un polvo que se distribuye uniformemente por un sitio diana por agitación o aplicación por soplado. El sujeto infectado o infestado puede sumergirse en un baño que contiene una forma líquida de la composición. La composición y método de aplicación o administración pueden ser como se describe en las memorias descriptivas de las patentes de Nueva Zelanda nº 336620 y 336619.

20 Para uso fungicida, la composición puede administrarse o aplicarse, por ejemplo, por vía oral, parenteral, por pulverizador de inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal o vaginal. La composición puede ser un comprimido, disolución, aerosol, pulverizador, crema, pomada, loción, emulsión, gel o polvo. La composición puede estar en forma de vendaje, apósito, gasa adhesiva, supositorio, pesario o emplastro impregnado con *Arthrospira*.

Uso de *Arthrospira* estresada fisiológicamente como antifúngico

25 Según la presente invención, se proporciona una composición antifúngica tópica que comprende una cantidad fungicida eficaz de *Arthrospira* fisiológicamente estresada no liofilizada, en la que el estresado fisiológico se consigue por la falta de nutrientes o luz, por deshidratación o retirando hasta un 80 % del líquido en el que se está cultivando la *Arthrospira*, y un portador, disolvente, base o excipiente adecuado para administración tópica a un sujeto, en la que la cantidad fungicida eficaz es eficaz contra hongos.

30 Según la presente invención, se proporciona un método para preparar una composición antifúngica para uso tópico en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de: (1) estresar fisiológicamente *Arthrospira* por falta de nutrientes o luz, por deshidratación o retirando hasta un 80 % del líquido en el que se está cultivando la *Arthrospira*; y (2) combinando una cantidad fungicida eficaz de la *Arthrospira* estresada de (1) con un portador, disolvente, base o excipiente adecuado para administración tópica al sujeto, en el que la cantidad fungicida eficaz es eficaz contra hongos; y en el que la *Arthrospira* no se ha liofilizado.

35 La *Arthrospira* fisiológicamente estresada puede usarse para tratar al menos los siguientes tipos de hongos: *Zygomycotina*; *Ascomycotina*; *Fungi imperfecti*; *Malassezia*; *Microsporum*; *Trichophyton* y *Epidermophyton*.

En una primera realización, el sujeto es un ser humano o un animal tal como un mamífero o un vertebrado. En sujetos humanos, la composición puede usarse para tratar:

- 40
- tiña (por ejemplo, pie de atleta, tiña crural, tiña corporal, infección del lecho ungueal profundo) que está causada principalmente por especies de *Microsporum*, *Trichophyton*, *Candida* y *Epidermophyton*;
 - candidiasis, que está causada por *Candida*;
 - caspa, que está causada por *Malassezia*;
 - micetoma tropical- un crecimiento de extensión granular en piel, tejido muscular y nódulos linfáticos- que está causado por *Madurella*;

45

 - esporotricosis – un crecimiento de extensión granular en piel y nódulos linfáticos- que está causada por *Sporothrix schenckii* e
 - histoplasmosis – una neumonía crónica con infección de extensión sistémica- que está causada por *Histoplasma capsulatum*.

50 En sujetos animales, la composición puede usarse para tratar, por ejemplo, tiña corporal, infecciones de las pezuñas (*Candida*, *Malassezia*), dermatitis y foliculitis (*Microsporum*, *Trichophyton*, *Alternaria*, *Fusarium*). Las afecciones fúngicas tópicas en animales están causadas habitualmente por los mismos hongos que en seres humanos.

- 5 En una segunda realización, el sujeto es un producto agrícola u hortícola, tal como una planta, flor, fruta, hortaliza, cereal, grano, legumbre, semilla de hongo, pasto o césped. La composición puede usarse para tratar, por ejemplo, tizón de espiga y pudrición de corona (*Fusarium*), eccema facial (*Pithomyces chartarum*), botritis (*Botrytis cineria*), mancha de la hoja (*Septaria*, *Alteria*, *Bipolaris*), oídio (*Sphaerotheca macularis*, *Erysiphe*, *Sphaerotheca pannosa*), pudrición marrón (*Monilinia fruticola*) y roya de hoja/tallo (*Puccinia*).
- 10 En una tercera realización, el sujeto es suelo, madera, material de construcción o un edificio. La composición puede usarse, por ejemplo, en o sobre edificios para el tratamiento de moho y sobre materiales de construcción y postes de la luz para el tratamiento de pudrición fúngica de madera.
- 15 Preferiblemente, el sujeto es un ser humano, un animal, un producto agrícola u hortícola, suelo o una estructura artificial.
- Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que la *Arthrospira* fisiológicamente estresada interacciona sinérgicamente con principios activos antifúngicos homologados (agentes fungiestáticos) proporcionando un amplio espectro superior de actividad antifúngica. Los inventores han encontrado que la *Arthrospira* estresada puede inhibir el crecimiento de hongos, matar hongos y prevenir el recrecimiento de hongos.
- 20 Según la presente invención, se proporciona una composición antifúngica que comprende una combinación sinérgica de *Arthrospira* fisiológicamente estresada y al menos un agente fungiestático.
- Según la presente invención, se proporciona un método para preparar una composición antifúngica para uso tópico en un sujeto, comprendiendo adicionalmente dicho método la etapa de combinar al menos un agente fungiestático con la cantidad fungicida eficaz de *Arthrospira* estresada y el portador, disolvente, base o excipiente.
- 25 Según la invención, se proporciona también la cantidad fungicida eficaz de *Arthrospira* fisiológicamente estresada no liofilizada como se describe anteriormente, más al menos un agente fungiestático, para administración tópica a un sujeto, para uso en la prevención o el tratamiento de una infección o infestación fúngica del sujeto.
- Puede usarse cualquier agente fungiestático adecuado (principio activo homologado) tal como terbinafina, bifonazol, clotrimazol, miconazol, econazol, ketoconazol o tolnaftato. Puede usarse cualquier concentración adecuada de principio activo homologado y dependerá del uso pretendido de la composición.
- 30 Preferiblemente, el agente fungiestático se selecciona del grupo consistente en terbinafina, bifonazol, clotrimazol, miconazol, econazol, ketoconazol y tolnaftato.
- Al usar *Arthrospira* fisiológicamente estresada como antifúngico en la piel, los inventores han encontrado que uno o más de otros sustituyentes de *Arthrospira* interaccionan sinérgicamente con uno o más agentes bioactivos, promoviendo la curación de la piel. Estos otros sustituyentes es probable que incluyan: β -caroteno, que proporciona nutrición a la piel; ficocianina, que es un antiinflamatorio; otras proteínas y otros nutrientes, incluyendo vitaminas, minerales, oligoelementos, antioxidantes, aceites esenciales y carbohidratos.
- 35 En primer lugar, la *Arthrospira* estresada inhibe o mata el hongo, y después otros sustituyentes de *Arthrospira* reparan el daño causado por el microbio.
- Los presentes inventores han encontrado que la *Arthrospira* tiene cualidades terapéuticas incluso cuando no está fisiológicamente estresada, tal como en el tratamiento de afecciones cutáneas y en reparación cutánea, que no se reivindica en las reivindicaciones, pero sirve para una mejor comprensión de la invención.
- 40 El defecto cutáneo puede ser, por ejemplo, una cicatriz, daño por acné, rosácea, una zona enrojecida, una grieta, una quemadura, una ampolla, psoriasis, eccema, escamas, arrugas, una pápula, una estomatitis, una lesión, una pústula, una herida, costra láctea, dermatitis del pañal, una úlcera, una úlcera bucal, dermatitis del afeitado, varicela, dermatitis, talones y codos agrietados.
- Otros aspectos y realizaciones de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la misma.
- Breve descripción de las figuras**
- 45 La Figura 1 muestra la actividad de *Arthrospira* fisiológicamente estresada (AMYCOT® y polvo no procesado) sobre quitina evaluada por respirometría;
- la Figura 2 muestra la actividad antifúngica de AMYCOT® sobre *C. albicans*;
- la Figura 3 muestra la actividad antibacteriana de AMYCOT® sobre *P. acne* evaluada por respirometría;
- 50 la Figura 4 muestra la actividad antifúngica de diferentes preparaciones comerciales de *Arthrospira* (*Spirulina*) sobre *T. rubrum*;

- la Figura 5 muestra la actividad antifúngica de una preparación comercial (Life Stream) de *Arthrospira* sobre *A. niger*;
- la Figura 6 muestra la actividad antifúngica de AMYCOT® sobre *M. canis*;La Figura 7 muestra la actividad antifúngica de AMYCOT® sobre *E. graminearum*;
- la Figura 8 muestra la actividad antifúngica de AMYCOT® sobre *M. furfur*;
- 5 la Figura 9a muestra la actividad antifúngica del champú AMYCOT® sobre *T. rubrum*;
- la Figura 9b muestra la actividad antifúngica del champú AMYCOT® sobre *C. albicans*;
- la Figura 10 muestra la actividad antifúngica de AMYCOT® sobre *P. chartarum*;
- la Figura 11 muestra la actividad antifúngica de AMYCOT® sobre *B. cinerea*;
- 10 la Figura 12 muestra los resultados inhibidores de *T. rubrum* usando AMYCOT® y diversos principios activos antifúngicos homologados;
- la Figura 13 muestra los resultados inhibidores de *T. mentagrophytes* usando AMYCOT® y diversos principios activos homologados;
- la Figura 14 muestra los resultados inhibidores de *C. albicans* usando AMYCOT® y diversos principios activos homologados;.
- 15 la Figura 15 muestra los resultados inhibidores de *C. albicans* usando un principio activo homologado;
- la Figura 16 muestra los resultados inhibidores de *T. mentagrophytes* usando AMYCOT® en combinación con un principio activo homologado y diversos principios activos homologados;
- la Figura 17 muestra los resultados inhibidores de *C. albicans* usando AMYCOT® en combinación con un principio activo homologado y diversos principios activos homologados;
- 20 la Figura 18 muestra los resultados inhibidores de *T. mentagrophytes* usando AMYCOT® en combinación con principios activos homologados;
- la Figura 19 muestra los resultados inhibidores de *T. mentagrophytes* usando AMYCOT® en combinación con principios activos homologados;
- 25 la Figura 20 muestra los resultados inhibidores de *T. mentagrophytes* usando AMYCOT® en combinación con un principio activo homologado y diversos principios activos homologados;
- la Figura 21 muestra los resultados inhibidores de *C. albicans* usando AMYCOT® en combinación con un principio activo homologado y diversos principios activos homologados;
- la Figura 22 muestra los resultados fungicidas de *T. mentagrophytes* usando AMYCOT® en combinación con principios activos homologados;
- 30 la Figura 23 muestra los resultados fungicidas de *T. rubrum* usando AMYCOT® en combinación con principios activos homologados;
- la Figura 24 muestra los resultados fungicidas de *T. mentagrophytes* usando AMYCOT® en combinación con principios activos homologados;
- 35 la Figura 25 muestra los resultados fungicidas de *T. mentagrophytes* usando AMYCOT® en combinación con principios activos homologados;
- la Figura 26 muestra los resultados fungicidas de *T. mentagrophytes* usando AMYCOT® en combinación con principios activos homologados;
- la Figura 27 muestra los resultados fungicidas de *C. albicans* usando AMYCOT® en combinación con un principio activo homologado y diversos principios activos homologados;
- 40 la Figura 28 muestra los resultados fungicidas de *T. rubrum* usando AMYCOT® y principios activos homologados;
- la Figura 29 muestra la actividad de *Arthrospira* fisiológicamente estresada (AMYCOT®) sobre quitina a diferentes temperaturas evaluada por respirometría;
- la Figura 30 muestra la actividad de *Arthrospira* fisiológicamente estresada (AMYCOT®) sobre quitina en diversas condiciones de pH evaluada por respirometría;
- 45 la Figura 31 muestra la actividad antifúngica de *Arthrospira* sobre *T. mentagrophytes*;

la Figura 32 muestra la actividad antifúngica de *Arthrospira* sobre *T. rubrum*;

la Figura 33 muestra la actividad antifúngica de *Arthrospira* sobre *M. fructicola*; y

la Figura 34 muestra la actividad antifúngica de "AMYCOT® potenciado" y "AMYCOT® original" sobre *Alternaria sp.*

5 Solo a modo de ilustración, se describen con detalle realizaciones preferidas de la presente invención, con referencia a la siguiente serie de ejemplos.

Ejemplo 1- Preparación de *Arthrospira* fisiológicamente estresada

10 Se estresó un cultivo de *Arthrospira maxima* (obtenible en Biovite Australia Pty Ltd) por disminución de nutrientes o desecación parcial. Se deshidrató la *Arthrospira* y se secó, formando un polvo "no procesado". Se descomprimió explosivamente entonces la *Arthrospira* secada (se potenció) usando el método descrito en las patentes de Nueva Zelanda nº 328013 y nº 328740. Se rehidrató la *Arthrospira*, se decoloró, se secó y se molió, formando un "polvo de premezcla". Se dispersó entonces el polvo de premezcla en un portador adecuado (por ejemplo, crema acuosa comercialmente disponible de la Farmacopea británica o agua). Se hace referencia al polvo de premezcla como "polvo de premezcla de AMYCOT®".

Ejemplo 2- Caracterización de la actividad de *Arthrospira* estresada

15 Los resultados de la respirometría sugieren que la *Arthrospira* fisiológicamente estresada es capaz de modificar o lisar sustratos que comprenden quitina, quitosano y/o *N*-acetil-D-glucosamina.

Sustrato de quitina

20 Se hicieron reaccionar separadamente cantidades estándares de polvo de premezcla de AMYCOT® y el polvo no procesado con quitina BHD polimérica de cuatro unidades (Sigma, número de catálogo C7170) en un respirómetro Warburg usando técnicas estándares. Se mezcló cada composición junto con quitina y se midió a cantidad de gas desprendido. Se monitorizó la reacción durante 1 hora después de equilibrado durante 30 minutos. La misma composición, pero hervida previamente en un baño de agua durante 5 minutos, no producía ningún gas, lo que sugería que la actividad podría ser enzimática y podría ser debida a uno o más tipos de proteínas desnaturalizables.

25 Se representan los resultados en la Figura 1. La tasa de actividad (presuntamente actividad enzimática) del polvo no procesado era de 694,9 ml/g de material celulosa/g de sustrato/hora. La tasa de actividad del polvo de premezcla de AMYCOT® era de 729,65 ml/g de material celular/g de sustrato/hora.

30 Se usó también la respirometría para identificar la temperatura óptima para la actividad. Se incubó polvo de premezcla de AMYCOT® (0,02 g y 0,06 g) con quitina (0,02 g) a 20 °C, 30 °C, 33 °C y 40 °C. Se incubó también polvo de premezcla de AMYCOT® basado en crema (0,05 g) con quitina (0,02 g) a esas temperaturas. Se representan los resultados en la Figura 29. Se determinó que la temperatura óptima para la actividad en cada caso era de 33 °C.

35 Se usó también la respirometría para identificar el pH óptimo para la actividad. Se suspendió polvo de premezcla de AMYCOT® (0,02 g) en tampones de pH variable (60-70 % de etanol, 30-40 % de agua, 0-0,05 % de fenoltaleína, 0-0,03 % de azul de bromotimol, 0-0,02 % de sal de sodio de rojo de metilo, 0-0,01 % de hidróxido de sodio y 0-0,01 % de sal de sodio de naranja de metilo a pH 5, 7, 9 y 11) y se incubó con quitina (0,02 g) a 33 °C. Se representan los resultados en la Figura 30. Se determinó que el pH óptimo para la actividad era de 6.

Estos resultados sugieren que el agente o agentes bioactivos deberían tener actividad cuando se apliquen tópicamente a la piel, ya que la piel tiene una temperatura y pH similares.

Sustratos de *N*-acetil-D-glucosamina y quitosano

40 Se incubó separadamente polvo de premezcla de AMYCOT® (0,02 g) con sustratos de *N*-acetil-D-glucosamina (0,02 g, número de catálogo Sigma A8625-5G) y quitosano (0,02 g, número de catálogo Sigma C3646) en un respirómetro Warburg a 33 °C. Se monitorizó cada reacción durante 1 hora después de equilibrado durante 30 minutos.

Se presentan los resultados para AMYCOT® más *N*-acetil-D-glucosamina en la tabla siguiente.

Tabla 1- AMYCOT® + <i>N</i> -acetil-D-glucosamina			
Tiempo (min)	mm g de gas	mm g de gas	mm g de gas
0	0	0	0
5	9	6	7
10	12	9	11

Tabla 1- AMYCOT® + N-acetil-D-glucosamina			
Tiempo (min)	mm g de gas	mm g de gas	mm g de gas
30	12	10	11
60	12	10	11

Se presentan los resultados para AMYCOT® más quitosano en la tabla siguiente.

Tabla 2- AMYCOT® + quitosano			
Tiempo (min)	mm g de gas	mm g de gas	mm g de gas
0	0	0	0
5	12	10	10
10	14	12	14
30	17	13	15
60	17	14	16

5 Para comparación, se presentan los resultados para AMYCOT® (0,02 g) más quitina (0,02 g), incubados a 33 °C, en la tabla siguiente.

Tabla 3- AMYCOT® + quitina			
Tiempo (min)	mm g de gas	mm g de gas	mm g de gas
0	0	0	0
5	12	10	15
10	18	18	20
30	19	18	21
60	19	19	21

10 Estos resultados sugieren que la *Arthrospira* fisiológicamente estresada tiene uno o más agentes bioactivos que lisan o modifican quitina, quitosano y/o N-acetil-D-glucosamina, o posiblemente otro tipo de polímero que tiene N-acetil-D-glucosamina como subunidad polimérica. El agente bioactivo puede ser, por ejemplo, una quitinasa, quitosanasa o quitina desacetilasa.

Ejemplo 3- Actividad antifúngica y antibacteriana de *Arthrospira* estresada

Se ensayó *in vitro* la actividad biocida de polvo de premezcla de AMYCOT® en hongos vivos y bacterias grampositivas. Esto último no se reivindica, pero sirve para una mejor comprensión de la invención.

15 Se consiguieron cultivos vivos de los patógenos diana de la American Type Culture Collection (ATCC), la Australian Collection of Microorganisms (ACM) y Sullivan Nicolaidés. Se muestran los cultivos que se ensayaron en la Tabla 4.

Tabla 4			
Patógeno	Nº ATCC	Nº ACM	Aislamientos
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	4808, 9533	5068	
<i>Candida albicans</i>	753	4574	

Patógeno	Nº ATCC	Nº ACM	Aislamientos
<i>Trichophyton rubrum</i>			SN01 (Sullivan Niccolaides)
<i>Epidermophyton floccosum</i>			SN02 (Sullivan Niccolaides)
<i>Propionibacterium acne</i>	25746	5109	

Se cultivó un césped uniforme de cada patógeno en un plato que contiene medio agar de dextrosa de patata (PDA). Después de 3-4 días de incubación, se cortaron cuatro pocillos en el medio de PDA con un taladracorchos estéril de 8 mm de diámetro. Se dispusieron en cada pocillo cantidades medidas de polvo de premezcla AMYCOT® y cremas/polvos de control. Se cultivaron los platos en condiciones apropiadas para el patógeno respectivo y se inspeccionaron diariamente los discos.

Después de 2-4 días, resultaron evidentes dos zonas concéntricas alrededor del pocillo:

1. Una zona “de aclaramiento” circular transparente más pequeña alrededor del pocillo. Esta es el área donde se han destruido los hongos, dejando solo materia citoplásmica seca residual (como se observa por microscopía óptica y electrónica).
2. Una zona “afectada” semitransparente mayor que se extiende desde el perímetro de la zona de aclaramiento. La zona afectada se reconoce por la menor altura del césped, su menor densidad y mayor transparencia en comparación con césped no afectado. Este es un área donde las paredes de células fúngicas se han destruido en gran medida, pero algunas siguen presentes, a menudo como esferas citoplásmicas redondeadas (como se observa por microscopía óptica y electrónica).

Se toma la medida de las zonas desde el perímetro externo del pocillo hasta el perímetro externo de la zona de cada caso. Se hace referencia a esta medida como la distancia zonal (DZ). El radio de las zonas es una medida no lineal de la eficacia del agente o agentes biocidas contra el patógeno *in vitro*.

Se muestran en la Tabla 5 los resultados de control *in vitro*.

Nº ACM	Patógeno	Resultado	Tamaño de la zona de aclaramiento (DZ) (mm)	Tamaño de la zona afectada (mm)
5068	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Aclaramiento	6	10
4574		Aclaramiento	6,5	-
5109	<i>Propionibacterium acne</i> (cultivado anaeróbicamente)	Sin aclaramiento	-	-
Nº ATCC				
4808	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Aclaramiento	5	8
9533	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Aclaramiento	6	10
753	<i>Candica albicans</i>	Aclaramiento	6,5	-
25746	<i>Propionibacterium acne</i> (cultivado anaeróbicamente)	Sin aclaramiento	-	-
Nº de aislamiento				

Nº ACM	Patógeno	Resultado	Tamaño de la zona de aclaramiento (DZ) (mm)	Tamaño de la zona afectada (mm)
SN01	<i>Tricophyton rubrum</i>	Aclaramiento	6	-
SN02	<i>Epidermophyton floccosum</i>	Aclaramiento	5	8
301	<i>Tinea pedis</i> - aislamiento	Aclaramiento	6	10
307	Tiña crural- aislamiento	Aclaramiento	6	10

La Figura 2 muestra el aclaramiento de *Canada albicans* (ACM 4574) usando AMYCOT®, que es prueba de la eficacia de uno o más agentes biocidas contra la afección candidiasis. El polvo de premezcla AMYCOT® está en la posición inferior y una "crema de ensayo humana" que tiene AMYCOT® al 12,5 % p/p en una crema acuosa, está en la posición superior (DZ de 9 mm).

En el caso de la bacteria anaeróbica causante de acné *Propionibacterium acne*, no se obtuvo aclaramiento cuando se ensayó en condiciones anaeróbicas. Se proporciona una explicación para esto en el ejemplo 4, que no se reivindica pero que sirve para una mejor comprensión de la invención.

Ejemplo 4- Actividad antibacteriana de *Arthrospira* estresada sobre *Propionibacterium acne*

La respirometría mostró que AMYCOT® tiene actividad antibacteriana contra *P. acne*.

Se hicieron reaccionar separadamente el polvo de premezcla de AMYCOT® (0,02 g) y 5 g de "crema de ensayo humana" que comprende AMYCOT® al 12,5 % p/p con un caldo del organismo aneróbico causante de acné *P. acne* (nº ACM 5109) en un respirómetro de Warburg en presencia o ausencia de oxígeno. Se compararon los resultados con aquellos de un control que comprende caldo de *P. acne* desprovisto de AMYCOT®. En ausencia de oxígeno, no se liberó gas. En presencia de oxígeno, se liberó gas y cada composición tenía actividad antibacteriana.

Se representan en la Figura 3 los resultados para AMYCOT® y crema de ensayo humana en presencia de oxígeno. La tasa del polvo de premezcla AMYCOT® (presuntamente enzimática) era de 626,00 ml/g de material celular/g de sustrato/hora. La tasa de la crema de ensayo humana era de 12,00 ml/g de material celular/g de sustrato/hora.

Los resultados mostraban que, para que la composición funcione como antibacteriano sobre *P. acne in vivo*, se requiere la presencia de oxígeno. Por lo tanto, al menos uno de los agentes biocidas puede ser una oxidasa.

Los inventores sospechan que uno o más de los agentes biocidas contra hongos puede lisar o modificar la pared celular de hongos. Dicho agente puede ser una quitinasa, quitosanaso o quitina desacetilasa.

Aunque no se cree que *P. acne* y otras bacterias grampositivas tengan quitina ni quitosano en sus paredes celulares, se sospecha que uno o más agentes biocidas lisan o modifican *N*-acetil-D-glucosamina/peptidoglicanos en la pared de la célula bacteriana.

Ejemplo 5- Diferentes fuentes comerciales de *Arthrospira* tienen actividad antifúngica

Se consiguieron preparaciones comerciales de *Arthrospira* secada (polvos y cápsulas) de diferentes suministradores en diferentes jurisdicciones y se ensayó la actividad antifúngica. Los polvos se preparan típicamente recogiendo *Arthrospira*, lavando la *Arthrospira* recogida y secando la *Arthrospira* lavada. Algunos suministradores muelen la *Arthrospira* en húmedo. La preparación no conlleva la etapa de estresar específicamente a *Arthrospira* después de la recogida de modo que la *Arthrospira* entre en estado anabiótico. De hecho, como se menciona anteriormente, los cultivadores comerciales de *Arthrospira* tienden a minimizar el estresado del organismo lo más posible ya que el recubrimiento mucoso espeso tiende a obstruir la maquinaria para el procesamiento del organismo.

Se obtuvieron polvos de *Arthrospira* (*Spirulina*) de los siguientes suministradores:

1. China Spirulina- Jiangsu Cibainian Nutrition Food Co., Ltd. China
2. Febico - Far East Biotech Co. Ltd. Taiwán

3. Life Stream/Earthrise - DIC. California, EE.UU.
4. Pacifica - Cyanotech. Hawaii, EE.UU.
5. Siam Algae Co. - DIC. Tailandia
6. Spirin -Yunnan Spirin Co. Ltd. China
- 5 7. Synergy - DIC. China

Se mezcló cada polvo en una crema acuosa usando una concentración de 12,5 % p/p. Se decoloró entonces cada crema. Se cultivó un césped uniforme de *T. rubrum* sobre medio PDA en un plato. Después de 3-4 días de incubación, se cortaron pocillos en el medio PDA con un taladracorchos estéril. Se dispusieron cantidades medidas de cada crema en el pocillo respectivo y se incubaron entonces los platos durante 2-4 días.

- 10 La Figura 4 muestra las actividades antifúngicas de Siam Algae Co. al 12,5 % p/p (posición derecha), Life Stream al 12,5 % p/p (posición inferior) y China Spirulina al 12,5 % p/p (posición izquierda).

Los resultados mostraban que todos los polvos comerciales ensayados tenían cierta actividad antifúngica. La respirometría confirmó que todos los polvos comerciales ensayados tenían también actividad (presuntamente enzimática) cuando se incubaban con quitina (resultados no mostrados).

- 15 Se seleccionó aleatoriamente un polvo (Life Stream) para mezclar con una crema acuosa sin receta a una concentración de 12,5 % p/p sin procesamiento adicional y se ensayó la actividad antifúngica contra *Aspergillus niger*. La crema produjo un aclaramiento de 4 mm, como se observa en la Figura 5 en las posiciones superior, derecha, inferior e izquierda. Esto indicaba que posiblemente todas las preparaciones comerciales de *Arthrospira* secada era probable que tuvieran el mismo nivel de actividad antifúngica, sin requerir una etapa de estresado
- 20 adicional o etapa de procesamiento adicional tal como la desestabilización de filamentos.

Ejemplo 6- Actividad de *Arthrospira* estresada contra enfermedades fúngicas de mamíferos

Se ensayó la actividad antifúngica de AMYCOT® *in vitro* contra diferentes enfermedades fúngicas de mamíferos. Se consiguieron los siguientes patógenos del Departamento de industrias primarias, el Departamento de Agricultura, ACM y viveros:

- 25
- *Candida albicans*
 - *Microsporum canis*
 - *Trichophyton mentagrophytes*
 - *Trichophyton rubrum*
 - *Epidermophyton floccosum*

30

 - *Fusarium graminearum*
 - *Alternaria sp*
 - *Malassezia furfur*

- 35 Se cultivó un césped uniforme de cada patógeno en medio PDA. Después de 1-2 días de incubación, se cortaron pocillos en el medio PDA con un taladracorchos estéril de 8 mm de diámetro. Se dispusieron cantidades medidas de AMYCOT® en cada pocillo. Se cultivaron los platos a una temperatura apropiada dependiendo del patógeno. Se inspeccionaron diariamente los platos con pocillos. Se midió el aclaramiento después de 2-3 días. Se toma la medida de la zona desde el perímetro del pocillo al perímetro exterior de la zona.

Esta zona estaba vacía de células fúngicas vivas, probando la eficacia de AMYCOT® contra los patógenos diana.

- 40 La crema con AMYCOT® al 12,5% p/p producía un aclaramiento de 8 mm del patógeno *T. rubrum*. *T. rubrum* es el agente causal de infecciones de pezuña y tiña corporal.

La crema con AMYCOT® al 12,5% p/p producía un aclaramiento de 15 mm del patógeno *T. mentagrophytes*. *T. mentagrophytes* es el agente causal de infecciones de pezuña y tiña corporal.

La Figura 6 muestra que un pocillo de crema con AMYCOT® al 12,5 % p/p producía un aclaramiento de 3 mm del patógeno *M. canis*. *M. canis* es el agente causal de infecciones de pezuña y tiña corporal.

- 45 La crema con AMYCOT® al 12,5 % p/p producía un aclaramiento de 3 mm del patógeno *E. floccosum*. *E. floccosum* es el agente causal de infecciones de pezuña y tiña corporal.

La crema con AMYCOT® al 12,5 % p/p producía un aclaramiento de 4,5 mm del patógeno *C. albicans*. *C. albicans* es el agente causal de tiña corporal y dermatitis.

La Figura 7 muestra que un pocillo de crema con AMYCOT® al 12,5% p/p producía un aclaramiento de 12 mm del patógeno *F. graminearum*. *F. graminearum* es el agente causal de infecciones de pezuña.

- 5 La Figura 8 muestra que los pocillos de crema con AMYCOT® al 12,5 % p/p producían aclaramientos de *M. furfur*. *M. furfur* es el agente causal de la caspa.

La Figura 9a muestra que un pocillo de champú con AMYCOT® al 5 % producía un aclaramiento de 3 mm del patógeno *T. rubrum*.

- 10 La Figura 9b muestra que un pocillo de champú con AMYCOT® al 5 % p/p producía un aclaramiento de 20 mm del patógeno *C. albicans*.

Ejemplo 7 – Actividad de *Arthrospira* estresada contra enfermedades fúngicas de las plantas

Se ensayó la actividad antifúngica de AMYCOT® *in vitro* contra diferentes actividades fúngicas de plantas. Se consiguieron los siguientes patógenos del Departamento de industrias primarias, Departamento de agricultura, ACM y viveros:

- 15
- *Fusarium graminearum*
 - *Pithomyces chartarum*
 - *Botrytis cinerea*
 - *Alternaria sp.*

- 20 Se cultivó un césped uniforme de cada patógeno en medio PDA. Después de 1-2 días de incubación, se cortaron pocillos en el medio PDA con un taladracorchos estéril de 8 mm de diámetro. Se dispusieron cantidades medidas de AMYCOT® en cada pocillo. Se cultivaron los platos a una temperatura apropiada dependiendo del patógeno. Se inspeccionaron diariamente los platos con pocillos.

Se midió el aclaramiento después de 2-3 días. Se toma la medida de la zona desde el perímetro del pocillo al perímetro exterior de la zona.

- 25 La zona estaba vacía de células fúngicas vivas, probando la eficacia de AMYCOT® contra los patógenos diana.

La crema con AMYCOT al 12,5% p/p producía un aclaramiento de 13 mm del patógeno *F. graminearum*. *F. graminearum* es el agente causal de tizón de espiga y pudrición de corona en granos pequeños.

La Figura 10 muestra que un pocillo de crema con AMYCOT® al 12,5 % p/p producía un aclaramiento de 10 mm del patógeno *P. chartarum*. *P. chartarum* es el agente causal de eccema facial en ganado ovino.

- 30 La crema con AMYCOT® al 12,5 % p/p producía un aclaramiento de 8 mm del patógeno *B. cinerea*. *B. cinerea* es el agente causal de botritis en la fruta.

La crema con AMYCOT® al 12,5 % p/p producía un aclaramiento de 9 mm del patógeno *Alternaria sp.*, el agente causal de mancha de la hoja en la fruta.

Ejemplo 8- Ensayo de AMYCOT® como pulverizador sobre patógenos fúngicos vegetales

- 35 Se ensayó AMYCOT® en forma de pulverizador antifúngico *in vitro* contra un patógeno vegetal común, *Botrytis cinerea*. Se hidrató polvo AMYCOT® al 5 % p/p con agua, pero era solo escasamente soluble.

- 40 Se cultivó un césped uniforme de *B. cinerea* en medio PDA en un plato. Se pulverizó entonces el lado derecho del plato con el pulverizador y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 horas. El lado izquierdo del plato no se pulverizó. La Figura 11 muestra que el lado pulverizado del plato tenía hongos muertos. El pulverizador era eficaz para eliminar botritis e inhibir la esporulación adicional.

Ejemplo 9- Ensayos antimicrobianos *in vitro* con *Arthrospira* estresada y principios activos homologados

Se ensayaron las actividades antifúngicas y antibacterianas de diversas cremas antifúngicas y antibacterianas sin receta (incluyendo Lamisil™, Dakta Gold™, Canesten™, Tinaderm™, Daktarin™, Tripod Labs™, Resolve Tinea™, Resolve Balm™, Resolve Plus™, Clearasil™, Benzac W™) y AMYCOT® en este y otros ejemplos.

- 45 En este ejemplo, se ensayaron las actividades antifúngica y antibacteriana de diversas cremas sin receta y AMYCOT® por un laboratorio independiente (ConMac Laboratory Services) contra los patógenos diana *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* y *Propionibacterium acne*.

Se muestran los resultados en la Tabla 6

Tabla 6				
Patógeno diana	Crema de ensayo	Día de aclaramiento 1	Día de aclaramiento 2	Día de aclaramiento 3
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1) control	Nada detectado	Nada detectado	Nada detectado
	2) Amycot®	0,5-1 mm no aclarado redondeado	4 mm no aclarado redondeado	1-2 mm aclarado redondeado, 3-4 mm no aclarado redondeado
	3) Lamisil	Nada detectado	Nada detectado	Nada detectado
	4) Dakta Gold	Nada detectado	Nada detectado	Nada detectado
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1) Control	Nada detectado	Nada detectado	Nada detectado
	2) Amycot®	1 mm aclarado redondeado	2,5 mm aclarado redondeado	2,5 mm aclarado redondeado, 5 mm no aclarado redondeado
	3) Canesten	Nada detectado	Nada detectado	Nada detectado
	4) Lamisil	Nada detectado	Nada detectado	Nada detectado
<i>Trichophyton rubrum</i>	1) Control	Nada detectado	Nada detectado	Nada detectado
	2) Amycot®	1 mm aclarado redondeado	5,5 mm aclarado redondeado	5,5 mm aclarado redondeado, 4 m no aclarado redondeado
	3) Tinaderm	Nada detectado	Nada detectado	Nada detectado
	4) Lamisil	Nada detectado	1 mm aclarado irregular	1,5 mm aclarado irregular
<i>Propionibacterium acnes</i>	1) Control	Nada detectado	Nada detectado	Nada detectado
	2) Amycot®	Nada detectado	Nada detectado	Nada detectado
	3) Clearasil	Nada detectado	Nada detectado	Nada detectado
	4) Benzac W	Nada detectado	Nada detectado	Nada detectado

Los resultados muestran que solo AMYCOT® era activo contra cada patógeno. El único otro ejemplo de crema que muestra actividad era Lamisil™ contra *T. rubrum*.

5 Ejemplo 10- Ensayos *in vitro* con principios activos homologados y combinaciones con AMYCOT®

Los antifúngicos tales como miconazol, tolnaftato, bifonazol y coltrimazol funcionan inhibiendo la producción de proteína, evitando funciones normales tales como la reproducción. La terbinafina antifúngica funciona evitando la formación de esteroides vitales.

10 El primer objetivo de estos ensayos *in vitro* era determinar las eficacias de diversas cremas sin receta o sus principios activos como inhibidores fúngicos y comparar con la eficacia de AMYCOT®. El segundo objetivo era determinar la eficacia de AMYCOT® en combinación con una o más cremas sin receta o sus principios activos como inhibidores fúngicos.

15 Se inoculó medio líquido de Sabouraud con el patógeno elegido. Se incubaron los caldos durante 1 semana a 28 °C. Se sumergió una torunda estéril en caldo de patógeno y se inoculó una placa de medio PDA por estriado de la placa a ángulos rectos, asegurando que la placa tenía un césped uniforme,

Los principios activos homologados todavía no en base de crema se mezclaron con una base de crema respectiva. Se dispuso la crema seleccionada sobre un disco de papel de filtro de 10 mm de diámetro y se dispuso el disco sobre una placa recién inoculada. Se dispusieron hasta 4 discos diferentes sobre una placa. Se incubó entonces la

placa durante 24-48 horas a la temperatura apropiada, dependiendo del patógeno. Se tomaron entonces fotos al término de las 24-48 horas.

Se muestran los resultados del ensayo inhibidor en las Figuras 12-21 y en las Tablas 7-16 siguientes.

Tabla 7- Ensayo inhibidor (Figura 12)		
Patógeno: <i>Trichophyton rubrum</i>		
Posición	Agente	Tamaño del aclaramiento (mm)
Superior	Crema con AMYCOT® al 12,5 %	8
Derecha	Tinaderm (tolnaftato al 2 %)	0
Inferior	Placebo	0
Izquierda	Daktarin (miconazol al 2 %)	15

Tabla 8- Ensayo inhibidor (Figura 13)		
Patógeno: <i>Trichophyton mentagrophytes</i>		
Posición	Agente	Tamaño del aclaramiento (mm)
Superior	Crema con AMYCOT® al 12,5 %	4
Derecha	Tinaderm (tolnaftato al 2 %)	1
Inferior	Placebo	0
Izquierda	Daktarin (miconazol al 2 %)	11

Tabla 9- Ensayo inhibidor (Figura 14)		
Patógeno: <i>Candida albicans</i>		
Posición	Agente	Tamaño del aclaramiento (mm)
Superior	Crema con AMYCOT® al 12,5 %	2
Derecha	Tinaderm (tolnaftato al 2 %)	3
Inferior	Placebo	0
Izquierda	Daktarin (miconazol al 2 %)	15

Tabla 10- Ensayo inhibidor (Figura 15)	
Patógeno: <i>Candida albicans</i>	
Agente	Tamaño del aclaramiento (mm)
Tripod Labs (clotrimazol al 1% + aceite de árbol del té)	10

Tabla 11- Ensayo inhibidor (Figura 16)		
Patógeno: <i>Trichophyton mentagrophytes</i>		
Posición	Agente	Tamaño del aclaramiento (mm)
Superior	50 % de crema con AMYCOT® al 12,5 % + 50 % de Daktarin (miconazol al 2 %)	10
Derecha	Resolve Tinea (miconazol al 2 %)	10
Inferior	Resolve Balm (miconazol al 2 %)	7
Izquierda	Resolve Plus (miconazol al 2 %)	11

Tabla 12- Ensayo inhibidor (Figura 17)		
Patógeno: <i>Candida albicans</i>		
Posición	Agente	Tamaño del aclaramiento (mm)
Superior	AMYCOT® + Daktarin	10
Derecha	Resolve Tinea (miconazol al 2 %)	6
Inferior	Resolve Balm (miconazol al 2 %)	7
Izquierda	Resolve Plus (miconazol al 2 %)	11

Tabla 13- Ensayo inhibidor (Figura 18)		
Patógeno: <i>Trichophyton mentagrophytes</i>		
Posición	Agente	Tamaño del aclaramiento (mm)
Superior	Crema con AMYCOT® al 12,5 %	1
Derecha	AMYCOT® al 12 % + clotrimazol al 10 %	13
Inferior	AMYCOT® al 12 % + terbinafina al 1 %	1
Izquierda	AMYCOT® al 12 % + tolnaftato al 10 %	

Tabla 14- Ensayo inhibidor (Figura 19)		
Patógeno: <i>Trichophyton mentagrophytes</i>		
Posición	Agente	Tamaño del aclaramiento (mm)
Superior	Crema con AMYCOT® al 12,5 %	1
Derecha	AMYCOT® al 12 % + 10 % de clotrimazol	11
Inferior	AMYCOT® al 12 % + terbinafina al 1 %	2
Izquierda	AMYCOT® al 12 % + tolnaftato al 10 %	4

Tabla 15- Ensayo inhibidor (Figura 20)		
Patógeno: <i>Trichophyton mentagrophytes</i>		
Posición	Agente	Tamaño del aclaramiento (mm)
Superior	Crema con AMYCOT® al 12,5 % + miconazol al 2 %	11
Derecha	Placebo	0
Inferior	Resolve Balm (miconazol al 2 %)	7
Izquierda	Resolve Plus (miconazol al 2 %)	7

Tabla 16- Ensayo inhibidor (Figura 21)		
Patógeno: <i>Candida albicans</i>		
Posición	Agente	Tamaño del aclaramiento (mm)
Superior	50 % de crema con AMYCOT® al 12,5 % + 50 % de Daktarin (miconazol al 2 %)	14
Derecha	Clotrimazol al 1 %	4
Inferior	Tolnaftato al 10 %	0
Izquierda	Miconazol al 2 %	9

Los principios activos homologados de la Figura 21 están en una base de crema acuosa en contraposición a la base alcohólica que se usa normalmente.

- 5 En los ensayos *in vitro*, se observó que miconazol y clotrimazol eran los inhibidores más eficaces de hongos patológicos (véanse las Figuras 12-21). Las Figuras 16 y 17 y las Tablas 11 y 12 establecen que el miconazol es un inhibidor fúngico eficaz. AMYCOT® actúa también como inhibidor, pero es solo aproximadamente un 40 % tan eficaz como clotrimazol y miconazol (véanse las Figuras 12-14). Las Figuras 18-21 y las Tablas 13-16 sugieren que las combinaciones de AMYCOT® más miconazol y AMYCOT® más clotrimazol son los inhibidores fúngicos más eficaces *in vitro* cuando se comparan con terbinafina y tolinaftato.

El tercer objetivo de estos ensayos *in vitro* era determinar las eficacias de diversas cremas sin receta o sus principios activos como fungicidas y comparar con la eficacia de AMYCOT®. El cuarto objetivo era determinar la eficacia de AMYCOT® en combinación con principios activos homologados.

- 15 El ensayo fungicida implicaba cultivar un césped del patógeno sobre placas de medio PDA durante un periodo de 2-3 días y exponer entonces el patógeno maduro a los antifúngicos. Esto se hizo cortando pocillos en el agar con césped, retirando el agar y rellenando los pocillos con crema.

Se muestran los resultados del ensayo fungicida en las Figuras 22-28 y las Tablas 17-23 siguientes.

Tabla 17- Ensayo inhibidor (Figura 22)		
Patógeno: <i>Trichophyton mentagrophytes</i>		
Posición	Agente	Tamaño del aclaramiento (mm)
Superior	Crema con AMYCOT® al 12,5 %	6
Derecha	Crema con AMYCOT® al 12,5 % + terbinafina al 1 %	6
Inferior	Crema con AMYCOT® al 12,5 % tolinaftato al 10 %	6
Izquierda	Crema con AMYCOT® al 12,5 % + clotrimazol al 10 %	5

Tabla 18- Ensayo inhibidor (Figura 23)		
Patógeno: <i>Trichophyton rubrum</i>		
Posición	Agente	Tamaño del aclaramiento (mm)
Superior	Crema con AMYCOT® al 12,5 %	9
Derecha	Crema con AMYCOT® al 12,5 % + clotrimazol al 10 %	7
Inferior	Crema con AMYCOT® al 12,5 % + miconazol al 1 %	8
Izquierda	Placebo	0

Tabla 19- Ensayo inhibidor (Figura 24)		
Patógeno: <i>Trichophyton mentagrophytes</i>		
Posición	Agente	Tamaño del aclaramiento (mm)
Superior	Crema con AMYCOT® al 12,5 %	6
Derecha	Crema con AMYCOT® al 12,5 % + terbinafina al 1 %	5
Inferior	Crema con AMYCOT® al 12,5 % tolnaftato al 10 %	5
Izquierda	Crema con AMYCOT® al 12,5 % + clotrimazol al 10 %	4

Tabla 20- Ensayo inhibidor (Figura 25)		
Patógeno: <i>Trichophyton mentagrophytes</i>		
Posición	Agente	Tamaño del aclaramiento (mm)
Superior	Crema con AMYCOT® al 12,5 %	8
Derecha	Crema con AMYCOT® al 12,5 % + terbinafina al 1 %	7
Inferior	Crema con AMYCOT® al 12,5 % tolnaftato al 10 %	5
Izquierda	Crema con AMYCOT® al 12,5 % + clotrimazol al 10 %	4

Tabla 21- Ensayo inhibidor (Figura 26)		
Patógeno: <i>Trichophyton mentagrophytes</i>		
Posición	Agente	Tamaño del aclaramiento (mm)
Superior	Crema con AMYCOT® al 12,5 %	9
Derecha	Crema con AMYCOT® al 12,5 % + terbinafina al 1 %	4
Inferior	Crema con AMYCOT® al 12,5 % tolnaftato al 10 %	5
Izquierda	Crema con AMYCOT® al 12,5 % + clotrimazol al 10 %	5

Tabla 22- Ensayo inhibidor (Figura 27)		
Patógeno: <i>Candida albicans</i>		
Posición	Agente	Tamaño del aclaramiento (mm)
Superior	Crema con AMYCOT® al 12,5 %	8
Derecha	Daktarin (miconazol al 2 %)	0
Inferior	Canesten (clotrimazol al 1 %)	0
Izquierda	AMYCOT® al 12 % + clotrimazol al 1 %	5

Tabla 23- Ensayo inhibidor (Figura 28)		
Patógeno: <i>Trichophyton rubrum</i>		
Posición	Agente	Tamaño del aclaramiento (mm)
Superior	Crema con AMYCOT® al 12,5 %	6
Derecha	Clotrimazol al 10 %	0
Inferior	Tolnaftato al 10 %	0
Izquierda	Miconazol al 2%	0

Los principios activos homologados de la Figura 28 están en una base de crema acuosa en contraposición a la base alcohólica que se usa normalmente.

- 5 Los resultados apoyan que los presentes antifúngicos sin receta y principios activos homologados son agentes fungiestáticos y no fungicidas. Las Figuras 22-28 y las Tablas 17-23 demuestran que AMYCOT® es un fungicida eficaz, incluso cuando se combina con principios activos homologados.

10 La combinación de AMYCOT® con miconazol o clotrimazol no reducía en gran medida las eficacias de ninguno. La combinación aumentaba el efecto inhibidor (véanse las Figuras 17-21). Esto creaba un producto de espectro amplio muy eficaz.

La combinación de AMYCOT® con clotrimazol inhibía ligeramente la actividad antifúngica de AMYCOT® (véanse las Figuras 22-28), pero la combinación de AMYCOT® con miconazol no tenía grandes efectos perjudiciales sobre la actividad inhibidora o fungicida de la crema de combinación (véanse las Figuras 17-26).

15 La crema de combinación de AMYCOT® y miconazol era más eficaz como producto de amplio espectro que cualquiera de ellos debido a la naturaleza inhibidora de miconazol y las actividades tanto inhibidora como fungicida de AMYCOT®.

La crema de combinación actuaba como inhibidor y “se mantenía firme”, mientras que los aclaramientos conseguidos con miconazol solo resultaban invadidos por el recrecimiento como en el caso del patógeno *T. mentagrophytes* (véase la Figura 20).

20 Se encontró también que la crema de combinación de AMYCOT® y miconazol al 2 % limitaba el recrecimiento del patógeno después realizar el aclaramiento alrededor de los pocillos.

Ejemplo 11- Ensayos de *Arthrospira* sobre diversas afecciones cutáneas

25 Un sujeto tenía pie de atleta avanzado, con lesiones profundas entre los dedos. El sujeto reseñó que el picor causado por el hongo paró al cabo de 15 minutos de la primera aplicación de crema con AMYCOT® al 12,5 % p/p. La inflamación se redujo, y en algunos casos desapareció completamente en 12 horas. Las lesiones empezaron a cerrarse al cabo de 24 horas y curaron completamente al cabo de 4-5 días.

Se repitieron estas observaciones en el caso de acné, con sujetos que registraron que la inflamación desaparecía y su piel volvía al color normal y se volvía suave y flexible como piel nueva. Las pústulas se secaban también.

30 Es creencia de los inventores que uno o más agentes biocidas (por ejemplo, quitinasa, quitosanasa, quitina desacetilasa) interaccionan sinérgicamente con otros componentes de *Arthrospira*, dando lugar a los efectos

terapéuticos. El picor en las infecciones fúngicas es una indicación de la liberación de enzimas digestivas o metabolitos de los hongos. Una vez se desestabiliza el metabolismo fúngico normal a medida que se desestabiliza la pared celular, cesa el picor.

5 Se obtuvieron resultados similares cuando se usó la crema para afecciones no relacionadas con hongos, en talones y codos secos y agrietados, rosácea, eccema, piel dañada por el sol y psoriasis. Los sujetos reseñaron un alivio casi inmediato del picor en la dermatitis.

Ejemplo 12- Actividad antifúngica de *Arthrospira* estresada usando polvo “no procesado”

10 El ejemplo 5 apoyaba que las preparaciones comerciales de *Arthrospira* secada era probable que tuvieran cierto nivel de actividad antifúngica sin requerir una etapa de estrés adicional o etapa de procesamiento después de la recogida tal como desestabilización de filamento. El ejemplo 12 apoya adicionalmente este hallazgo.

Se consiguió una preparación secada de *Arthrospira maxima* de un cultivador comercial. Se mezcló la preparación con una crema acuosa sin receta a una concentración de 12,5 % p/p sin procesamiento adicional, y se ensayó la actividad antifúngica contra *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* y *M. fructicola* (como se describe en el ejemplo 5).

15 Como se observa en la Figura 31, la crema producía un aclaramiento contra *T. mentagrophytes* en las posiciones superior, derecha, inferior e izquierda.

Como se observa en la Figura 32, la crema producía un aclaramiento contra *T. rubrum* en la posición inferior.

Como se observa en la Figura 33, la crema producía un aclaramiento contra *M. fructicola* en la posición inferior.

Estos hallazgos apoyan que las etapas después de la recogida tales como descompresión explosiva, liofilización, decoloración y molido no tienen que llevarse a cabo para producir *Arthrospira* con actividad fungicida.

20 **Ejemplo 13- Actividad antifúngica de *Arthrospira* no descomprimida explosivamente**

Este ejemplo apoya adicionalmente que no se requiere la etapa después de la recogida de descompresión explosiva (potenciación) para producir *Arthrospira* con actividad fungicida.

25 Se consiguió una preparación seca de *Arthrospira maxima* de un cultivador comercial. En un caso, se desestabilizó la *Arthrospira* secada por descompresión explosiva (se potenció) usando el método descrito en las patentes de Nueva Zelanda nº 328013 y nº 328740. Se rehidrató *Arthrospira*, se decoloró y se molió, formando un “polvo de premezcla” seco. Se suspendió entonces el polvo de premezcla en un portador adecuado (al 12,5 %) y se hará referencia como “AMYCOT® potenciado”.

En otro caso, la preparación excluía el método de descompresión explosiva descrito en las patentes de Nueva Zelanda nº 328013 y nº 328740, y se hará referencia a esta preparación como “AMYCOT® original”.

30 Como se observa en la Figura 34, tanto “AMYCOT® original” como “AMYCOT® potenciado” producían aclaramientos casi iguales contra *Alternaria sp.* en las posiciones superior e inferior, respectivamente. Por ello, la descompresión explosiva no es una etapa después de la recogida esencial para producir *Arthrospira* con actividad fungicida.

35 Se apreciará adicionalmente que pueden hacerse muchos cambios a las composiciones, métodos de uso y preparaciones ejemplificados anteriormente sin apartarse del alcance de la invención.

El término “comprender” y variantes del término tales como “comprende” o “comprendiendo” se usan en la presente memoria para designar la inclusión de un entero indicado o enteros indicados pero no para excluir cualquier otro entero o cualesquiera otros enteros, a menos que el contexto o el uso requieran una interpretación exclusiva del término.

40 Cualquier referencia a publicaciones citadas en la presente memoria no es una admisión de que las divulgaciones constituyan conocimiento general común en Australia.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición antifúngica para uso tópico en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 1) estresar fisiológicamente *Arthrospira*, por falta de nutrientes o luz, por deshidratación o retirando hasta un 80% del líquido en el que se está cultivando la *Arthrospira*; y
- 2) combinar una cantidad fungicida eficaz de la *Arthrospira* estresada de (1) con un portador, disolvente, base o excipiente adecuado para administración tópica al sujeto, en el que la cantidad fungicida eficaz es eficaz frente a hongos, y en el que la *Arthrospira* no se ha liofilizado.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de estresado fisiológico de *Arthrospira* comprende retirar hasta un 80% del líquido en el que está creciendo la *Arthrospira* y la etapa (2) está precedida por las etapas (1a) y (1b) como sigue:
- (1a) lavado de la *Arthrospira* estresada para retirar contaminantes;
- (1b) secado de la *Arthrospira* lavada.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa (2) comprende adicionalmente combinar al menos un agente fungiestático con la cantidad fungicida eficaz de *Arthrospira* estresada y el portador, disolvente, base o excipiente.
4. El método de la reivindicación 3, en el que el agente fungiestático se selecciona del grupo consistente en terbinafina, bifonazol, clotrimazol, miconazol, econazol, ketoconazol y tolnaftato.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la *Arthrospira* es *A. maxima*.
- 20 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sujeto es un ser humano, un animal, un producto agrícola u hortícola, suelo o una estructura artificial.
7. Una composición antifúngica tópica que comprende una cantidad fungicida eficaz de *Arthrospira* fisiológicamente estresada no liofilizada, en la que el estresado fisiológico se consigue por falta de nutrientes o luz por deshidratación, o retirando hasta un 80% del líquido en el que está creciendo la *Arthrospira*, y un portador, disolvente, base o excipiente adecuado para administración tópica a un sujeto.
- 25 8. La composición antifúngica tópica de la reivindicación 7, en la que el sujeto es un ser humano, un animal, un producto agrícola u hortícola, suelo o una estructura artificial.
9. La composición antifúngica tópica de la reivindicación 7 u 8, en la que la composición comprende adicionalmente al menos un agente fungiestático.
- 30 10. La composición antifúngica tópica de la reivindicación 9, en la que el agente fungiestático se selecciona del grupo consistente en terbinafina, bifonazol, clotrimazol, miconazol, econazol, ketoconazol y tolnaftato.
11. Una cantidad fungicida eficaz de *Arthrospira* fisiológicamente estresada no liofilizada, en la que el estresado fisiológico se consigue por falta de nutrientes o luz por deshidratación, o retirando hasta un 80% del líquido en el que está creciendo la *Arthrospira*, y un portador, disolvente, base o excipiente para administración tópica a un sujeto,
- 35 para uso en la prevención o el tratamiento de una infección o infestación fúngica del sujeto.
12. La cantidad fungicida eficaz de *Arthrospira* fisiológicamente estresada no liofilizada de la reivindicación 11, para uso en la prevención o el tratamiento de una infección fúngica de un sujeto, en la que el sujeto es un ser humano, un animal, un producto agrícola u hortícola, suelo o una estructura artificial.
- 40 13. La cantidad fungicida eficaz de *Arthrospira* fisiológicamente estresada no liofilizada de la reivindicación 11 o 12, más al menos un agente fungiestático, para administración tópica a un sujeto, para uso en la prevención o el tratamiento de infección o infestación fúngica del sujeto.
14. La cantidad fungicida eficaz de *Arthrospira* fisiológicamente estresada no liofilizada de la reivindicación 13, en la que el agente fungiestático se selecciona del grupo consistente en terbinafina, bifonazol, clotrimazol, miconazol, econazol, ketoconazol y tolnaftato.

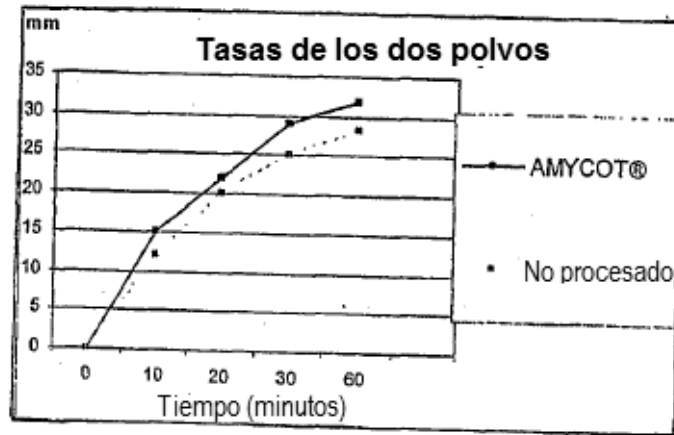


FIG. 1

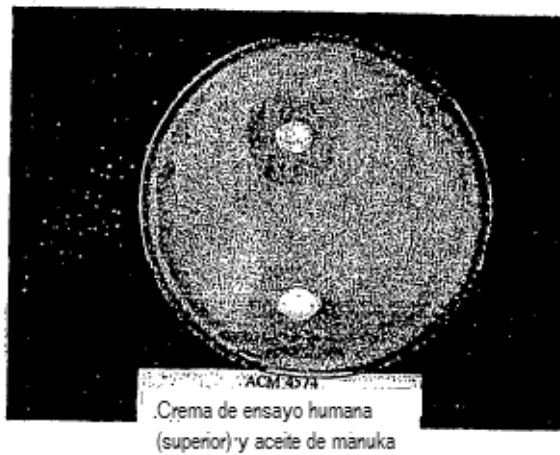


FIG. 2

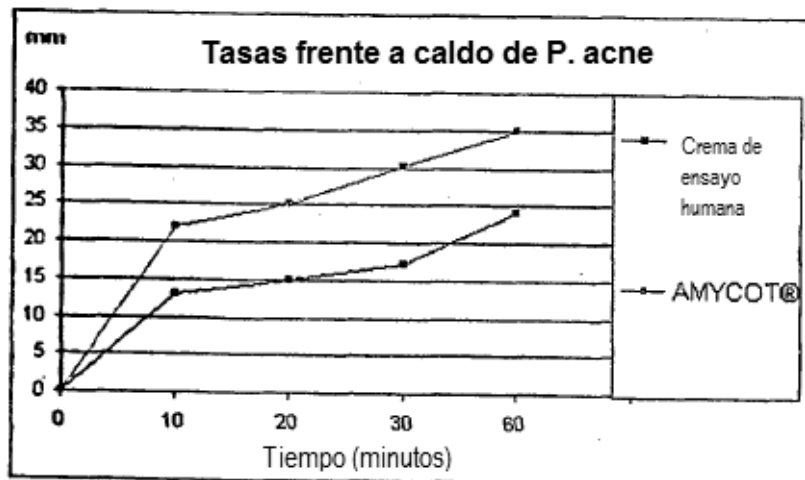


FIG. 3

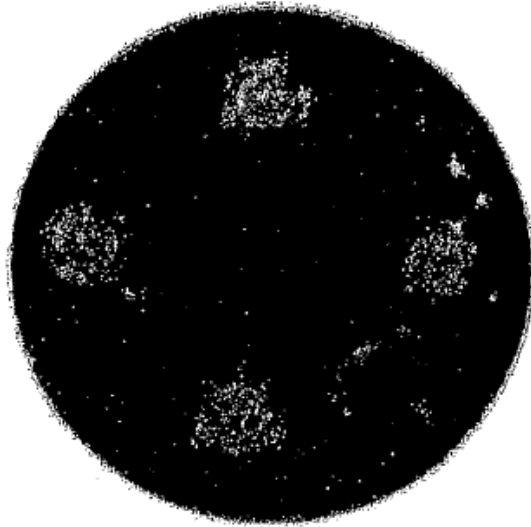


FIG. 5.

Aspergillus niger

Polvo original Life Stream al 12,5 %

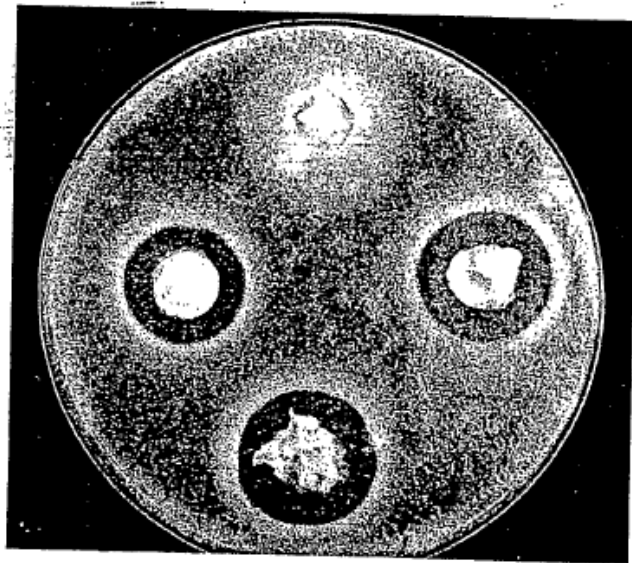


FIG. 4

T. rubrum

Derecha - Siam algae Co (12,5%)

Inferior - Life Stream (12,5%)

Izquierda - China Spirulina (12,5%)

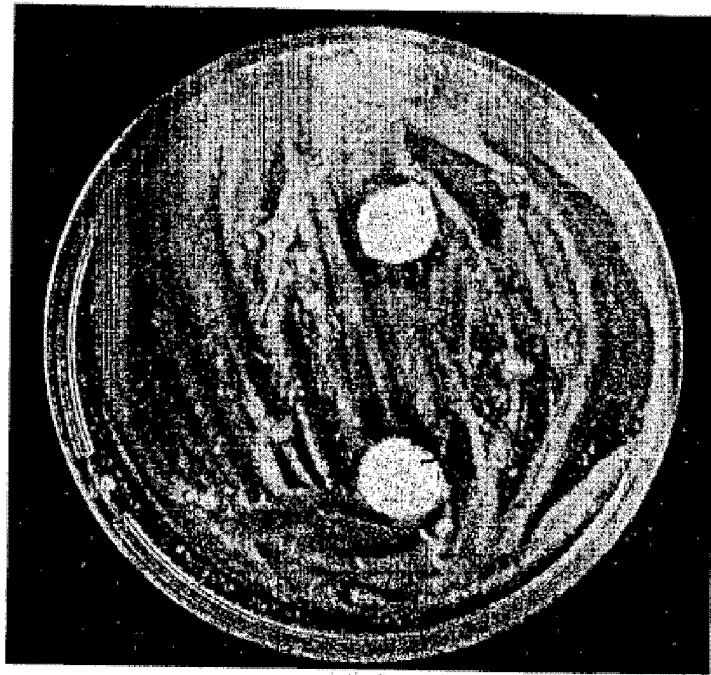


FIG. 8

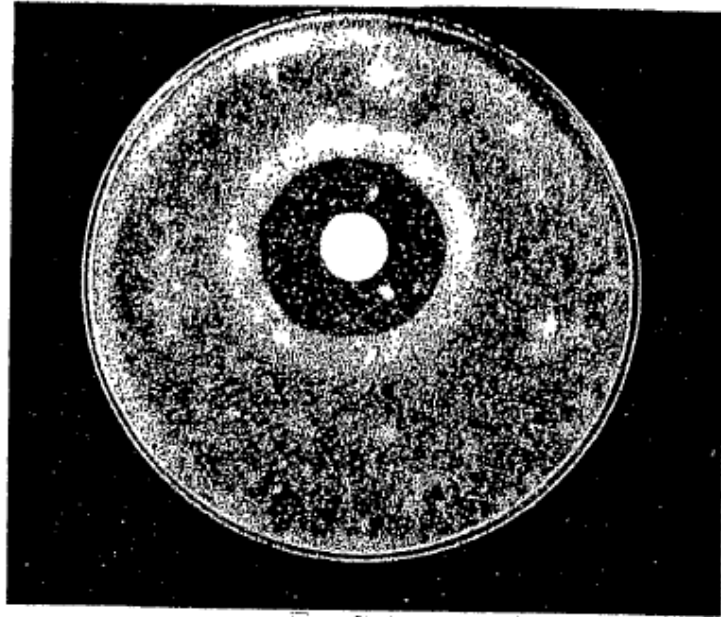


FIG. 7

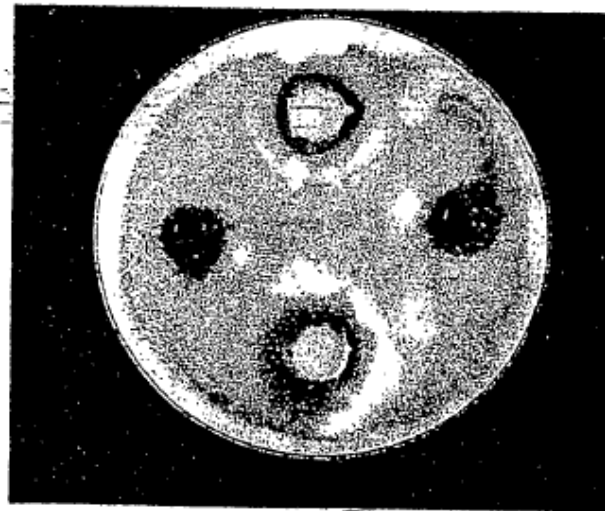


FIG. 9a

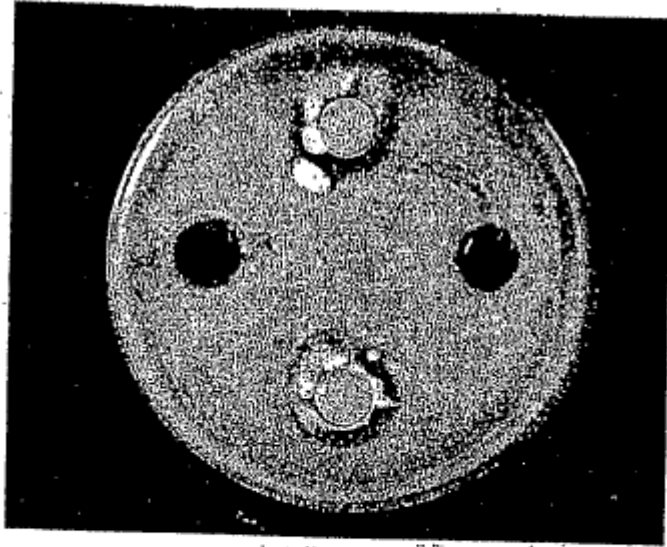


FIG. 9b

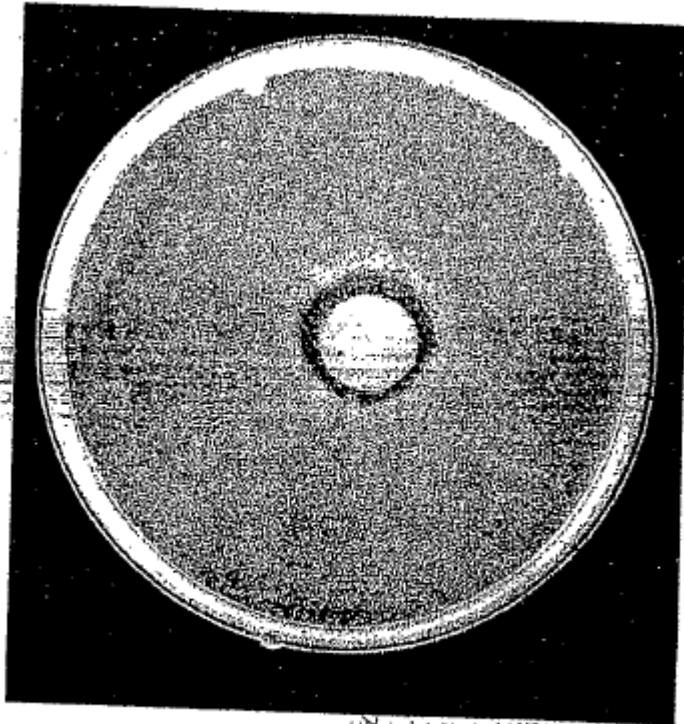


FIG. 6

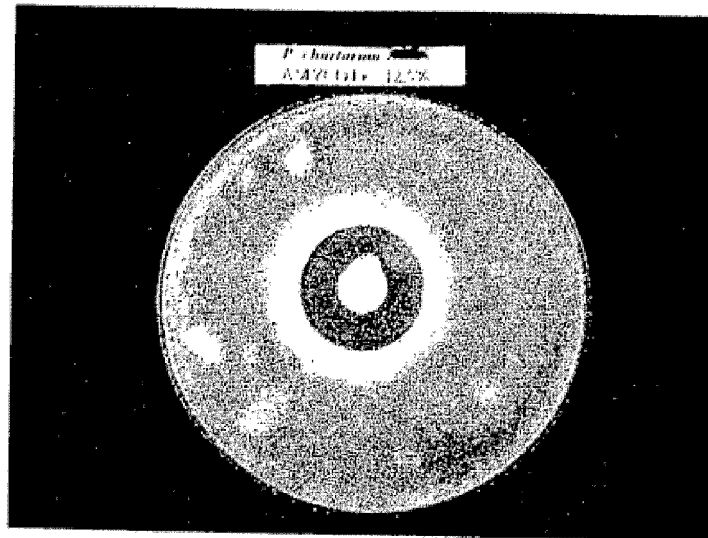


FIG. 10

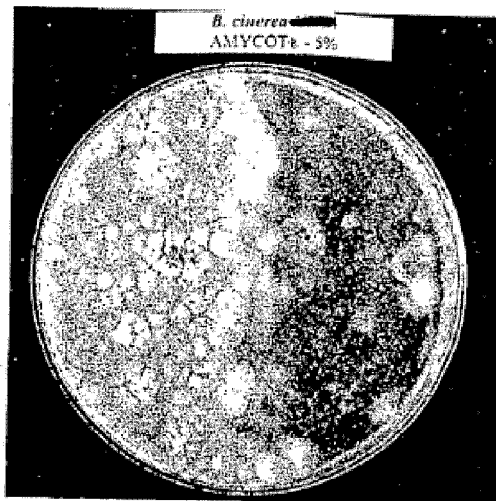


FIG. 11

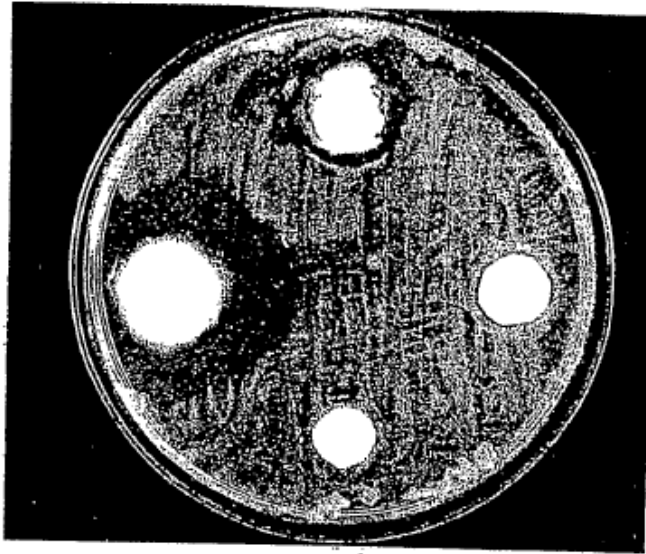


FIG. 13

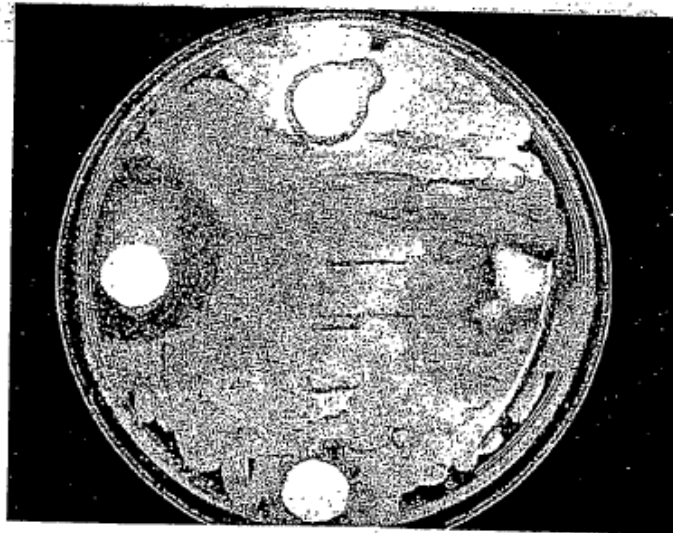


FIG. 14

Ensayo inhibidor
(Patógeno: *Candida albicans*)

Superior - Crema con AMYCOT® al 12,5 %- 2 mm

Derecha: Tinaderm (tolnaftato al 2%)- 3 mm

Inferior: Placebo- 0 mm

Izquierda: Daktarin (miconazol al 2 %)- 15 mm



FIG. 15

Ensayo inhibidor

(Patógeno: *Candida albicans*)

Crema Tripod Lab (clotrimazol al 1 % +
aceite de árbol del té)- 10 mm

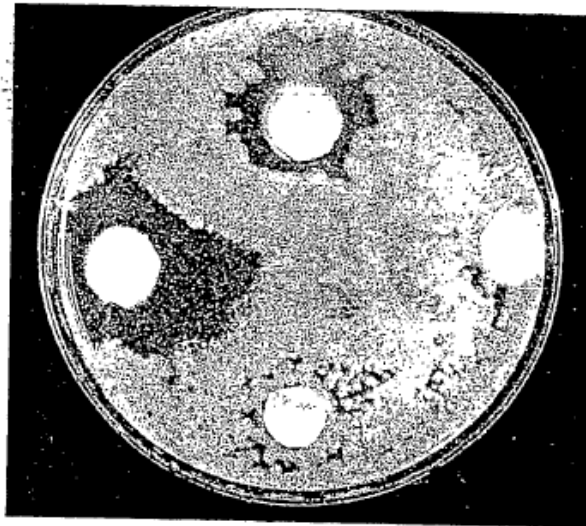


FIG. 12

Ensayo inhibidor

(Patógeno: *Trichophyton rubrum*)

Superior- crema AMYCOT® al 12,5 %- 8 mm

Derecha- Tinaderm (tolnaftato al 2 %)- 0 mm

Inferior- placebo- 0 mm

Izquierda- Daktarin (miconazol al 2 %)- 15 mm

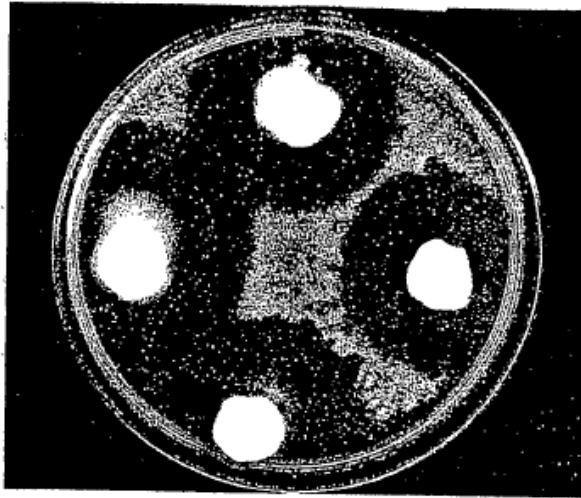


FIG. 16

Ensayo inhibidor

(Patógeno: *Trichophyton mentagrophytes*)

50 % de crema con AMYCOT® al 12,5 % +
50 % de Daktarin (miconazol al 2 %) 10 mm

Resolve Tinea (miconazol al 2 %)- 10 mm

Resolve Balm (miconazol al 2 %)- 7 mm

Resolve Plus (miconazol al 2 %)- 11 mm

(NOTA: la crema combinada es eficazmente AMYCOT® al 6 % +
miconazol al 1 %)

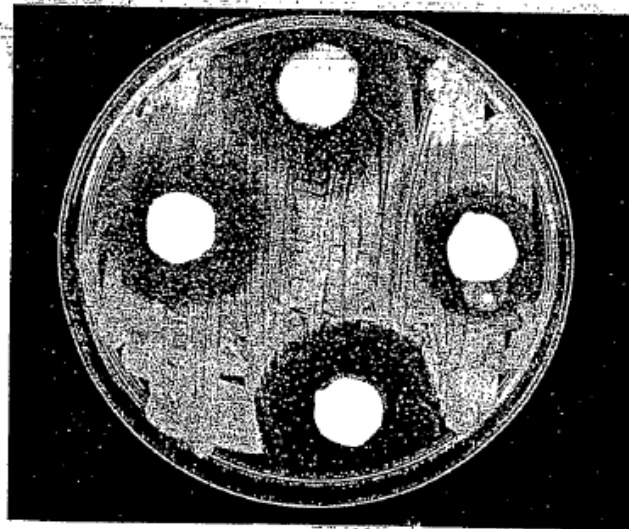


FIG. 17

(Patógeno: *Candida albicans*)

Superior- AMYCOT®+ Daktarin- 10 mm

Resolve Tinea (miconazol al 2 %)- 6 mm

Resolve Balm (miconazol al 2 %)- 7 mm

Resolve Plus (miconazol al 2 %)- 11 mm

(NOTA: la crema combinada es eficazmente AMYCOT® al 6 % +
miconazol al 1 %)

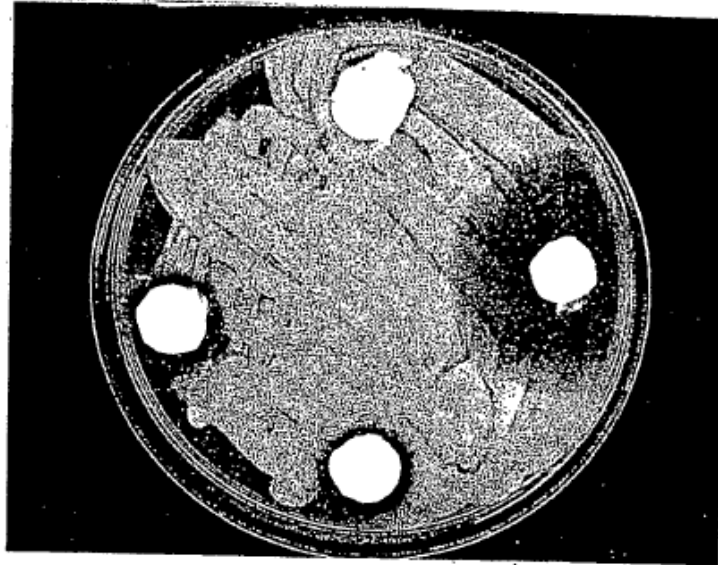


FIG. 18

Ensayo inhibidor

(Patógeno: *Trichophyton mentagrophytes*)

Superior- crema con AMYCOT® al 12,5 % - 1 mm
Derecha- AMYCOT al 12,5 % + clotrimazol al 10 %- 13 mm
Inferior- AMYCOT al 12 % + terbinafina al 1 %- 1 mm
Izquierda- AMYCOT al 12 % + tolnaftato al 10 %- 1 mm

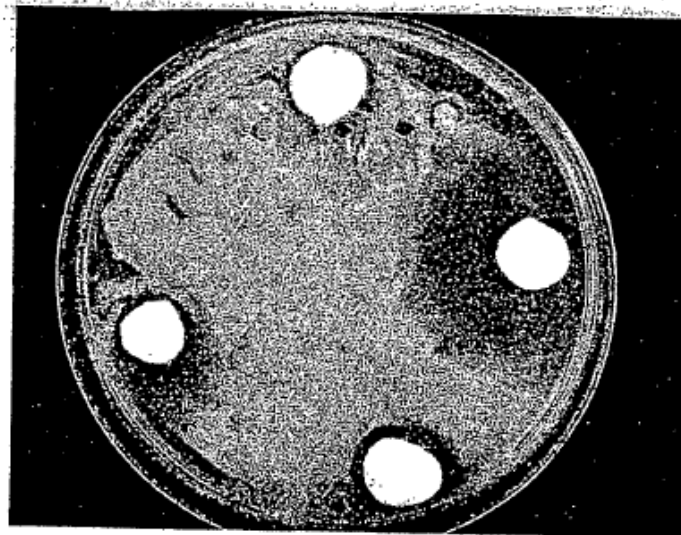


FIG. 19

Ensayo inhibidor

(Patógeno: *Trichophyton mentagrophytes*)

Superior- crema con AMYCOT® al 12,5 % - 1 mm
Derecha- AMYCOT al 12,5 % + clotrimazol al 10 %- 11 mm
Inferior- AMYCOT al 12 % + terbinafina al 1 %- 2 mm
Izquierda- AMYCOT al 12 % + tolnaftato al 10 %- 4 mm

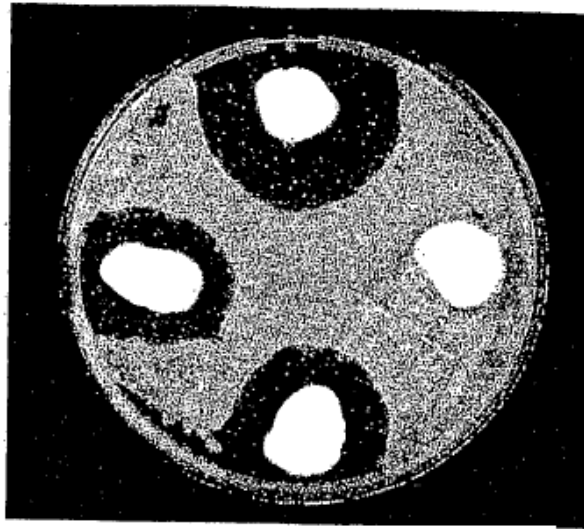


FIG. 20

Ensayo inhibidor

(Patógeno: *Trichophyton mentagrophytes*)

Superior- crema con AMYCOT® al 12,5 % + miconazol al 2 %- 11 mm

Derecha- placebo- 0 mm

Inferior- Resolve Balm (miconazol al 2 %)- 7 mm

Izquierda- Resolve Plus (miconazol al 2 %)- 7 mm

(NOTA: la crema combinada es eficazmente AMYCOT® al 6 % + miconazol al 1 %)

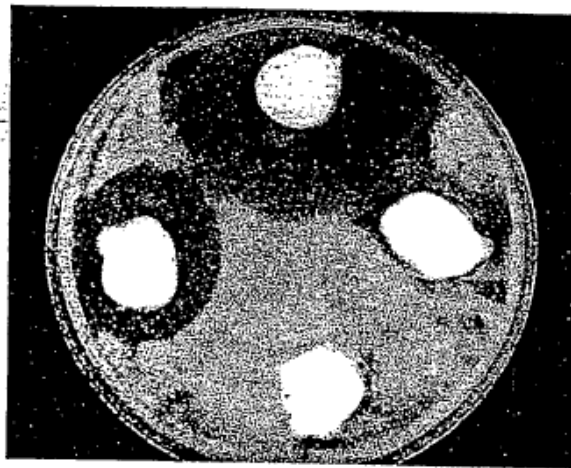


FIG. 21

Ensayo inhibidor

(Patógeno: *Candida albicans*)

Superior- 50 % de crema con AMYCOT® al 12,5 % +
50 % de Daktarin (miconazol al 2 %)- 14 mm

Derecha- clotrimazol al 1 %- 4 mm

Inferior- tolnaftato al 10 %- 0 mm

Izquierda- miconazol al 2 %- 9 mm

(NOTA: la crema combinada es eficazmente AMYCOT® al 6 % + miconazol al 1 %)

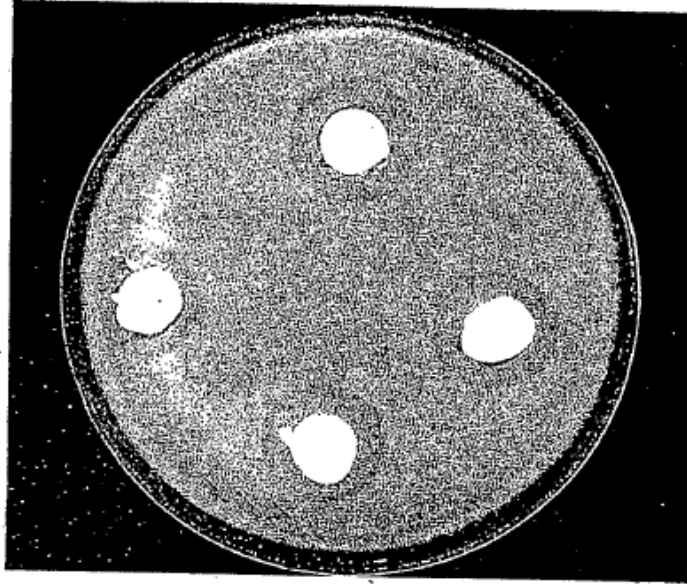


FIG. 22

Ensayo fungicida

(Patógeno: *Trichophyton mentagrophytes*)

Superior- crema con AMYCOT® al 12,5 %- 6 mm
Derecha- crema con AMYCOT® al 12,5 % + terbinafina al 1 %- 6 mm
Inferior- crema con AMYCOT® al 12,5 % + tolnaftato al 10 %- 6 mm
Izquierda- crema con AMYCOT® al 12,5 % + clotrimazol al 10 %-
5 mm

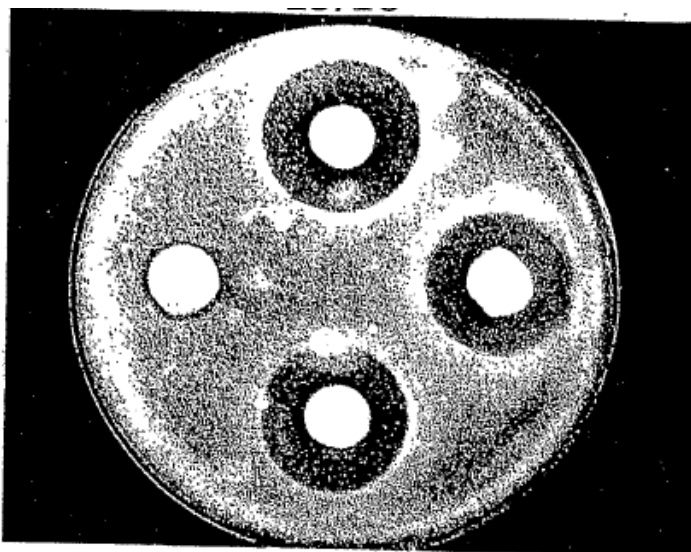


FIG. 23

Ensayo fungicida
(Patógeno: *Trichophyton rubrum*)

Superior- crema con AMYCOT® al 12,5 %- 9 mm
Derecha- crema con AMYCOT® al 12,5 % + clotrimazol al 10 %- 7 mm
Inferior- crema con AMYCOT® al 12,5 % + miconazol al 1 %- 8 mm
Izquierda- placebo- 0 mm

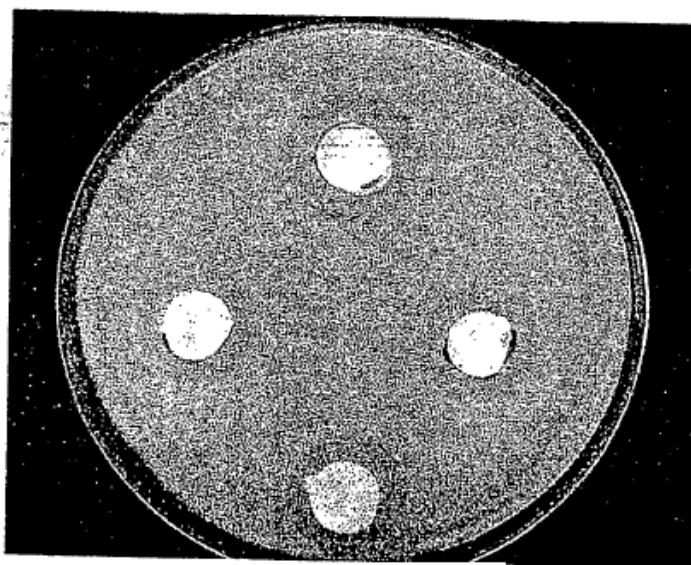


FIG. 24

Ensayo fungicida
(Patógeno: *Trichophyton mentagrophytes*)

Superior: crema con AMYCOT® al 12,5 %- 6 mm
Derecha- crema con AMYCOT® al 12,5 % + terbinafina al 1 %- 5 mm
Inferior- crema con AMYCOT® al 12,5 % + tolnaftato al 10 %- 5 mm
Izquierda- crema con AMYCOT® al 12,5 % + clotrimazol al 10 %- 4 mm

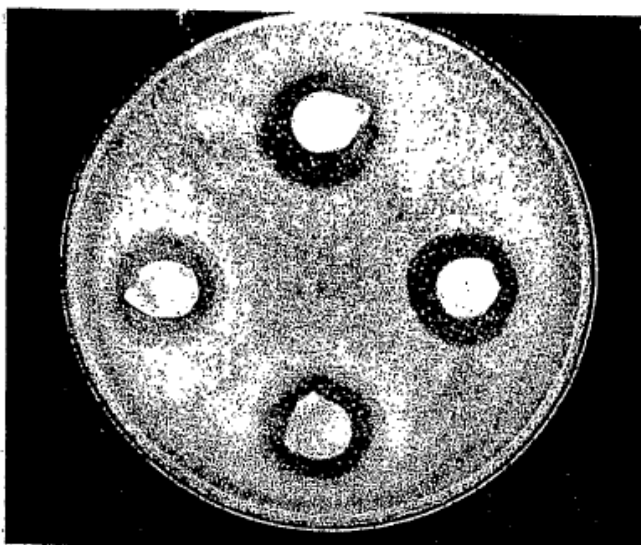


FIG. 25

Ensayo fungicida

(Patógeno: *Trichophyton mentagrophytes*)

Superior- crema con AMYCOT® al 12,5 % - 8 mm,
Derecha- crema con AMYCOT® al 12,5 % + terbinafina al 1 % - 7 mm
Inferior- crema con AMYCOT® al 12,5 % + tolnaftato al 10 % - 5 mm
Izquierda- crema con AMYCOT® al 12,5 % + clotrimazol al 10 % - 4 mm

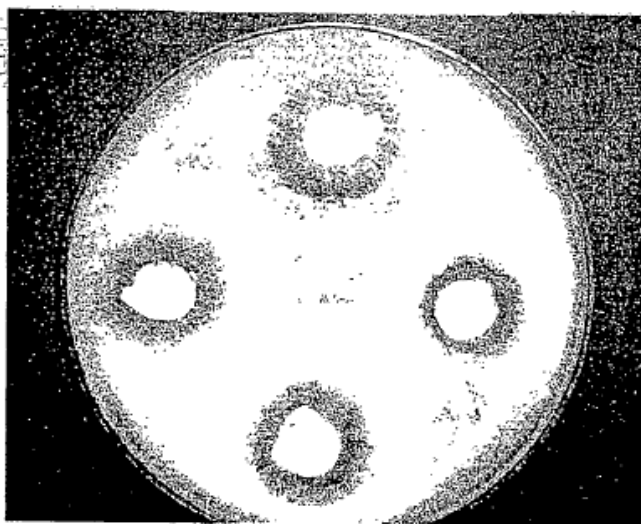


FIG. 26

Ensayo fungicida

(Patógeno: *Trichophyton mentagrophytes*)

Superior- crema con AMYCOT® al 12,5 % - 9 mm
Derecha- crema con AMYCOT® al 12,5 % + terbinafina al 1 % - 4 mm
Inferior- crema con AMYCOT® al 12,5 % + tolnaftato al 10 % - 5 mm
Izquierda- crema con AMYCOT® al 12,5 % + clotrimazol al 10 % - 5 mm

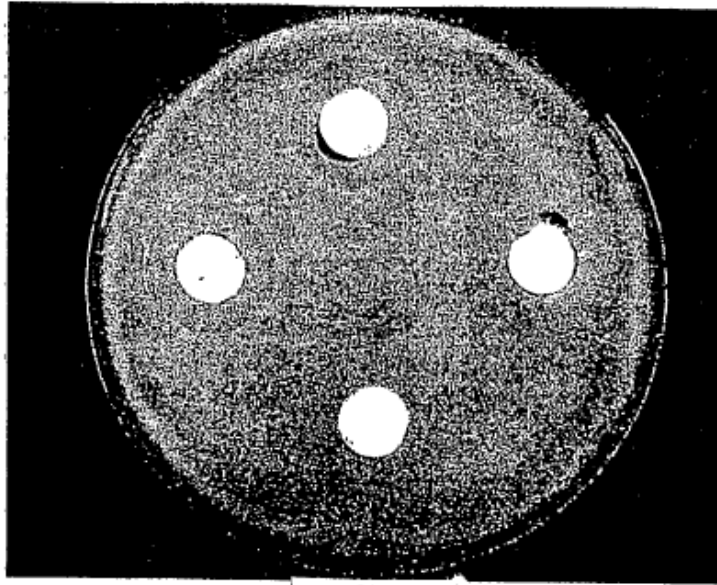


FIG. 27

Ensayo fungicida
(Patógeno: *Candida albicans*)

Superior- crema con AMYCOT® al 12,5 %- 8 mm
Derecha- Daktarin (miconazol al 2 %)- 0 mm
Inferior- Canesten (clotrimazol al 1 %)- 0 mm
Izquierda- crema con AMYCOT® al 12 % + clotrimazol al 1 %- 5 mm

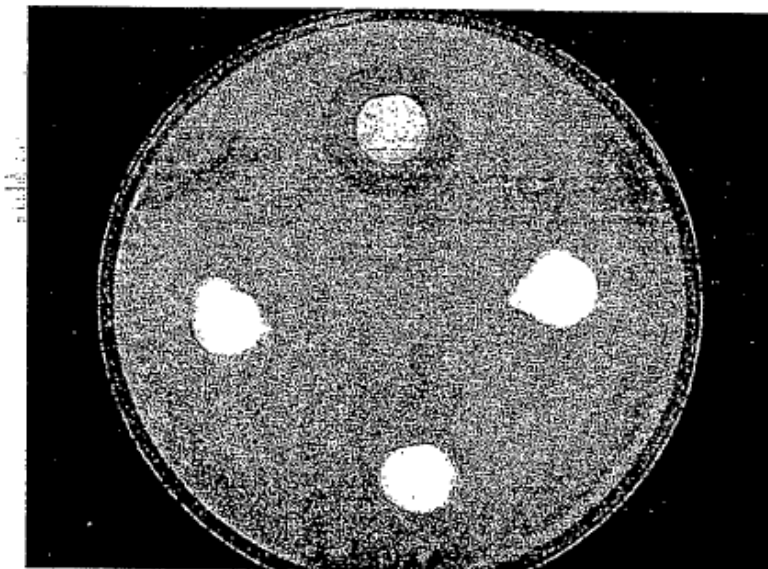


FIG. 28

Ensayo fungicida
(Patógeno: *Trichophyton rubrum*)

Superior- crema con AMYCOT® al 12,5 %- 6 mm
Derecha- clotrimazol al 10 %- 0 mm
Inferior- tolnaftato al 10 %- 0 mm
Izquierda- miconazol al 2 %- 0 mm

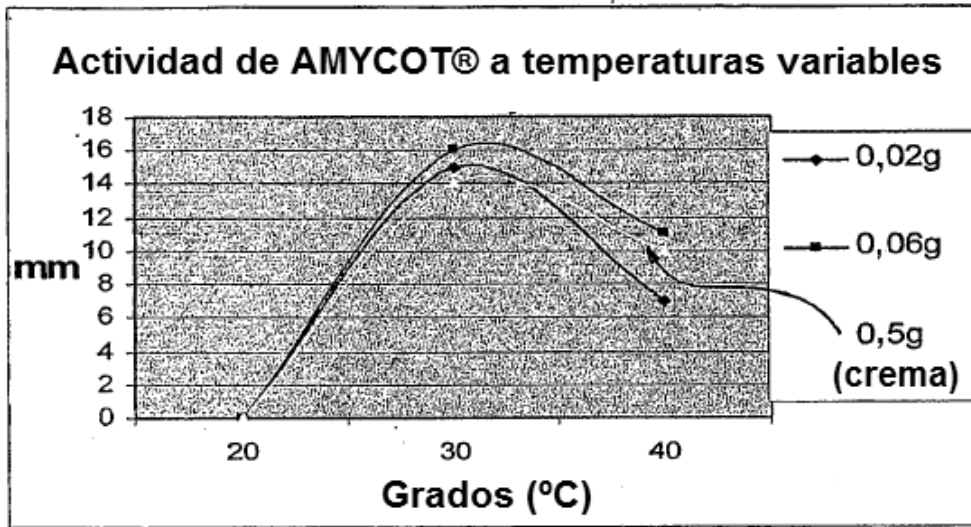


FIG. 29

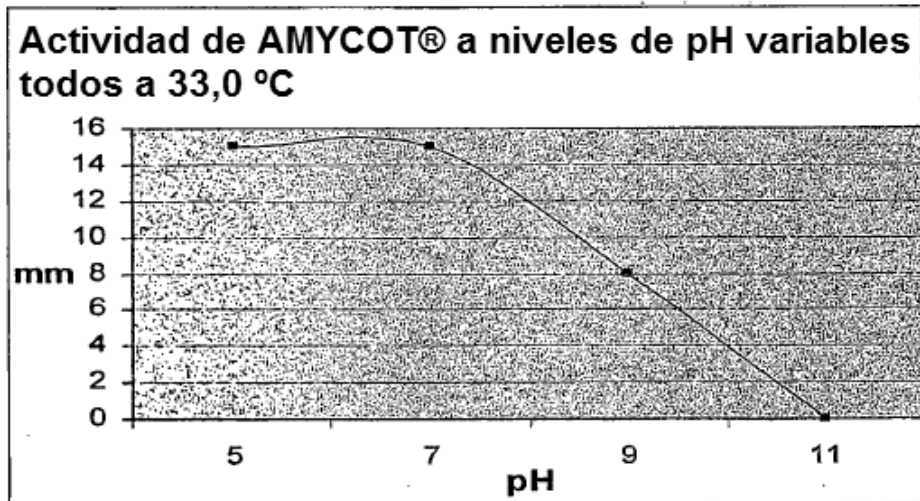


FIG. 30

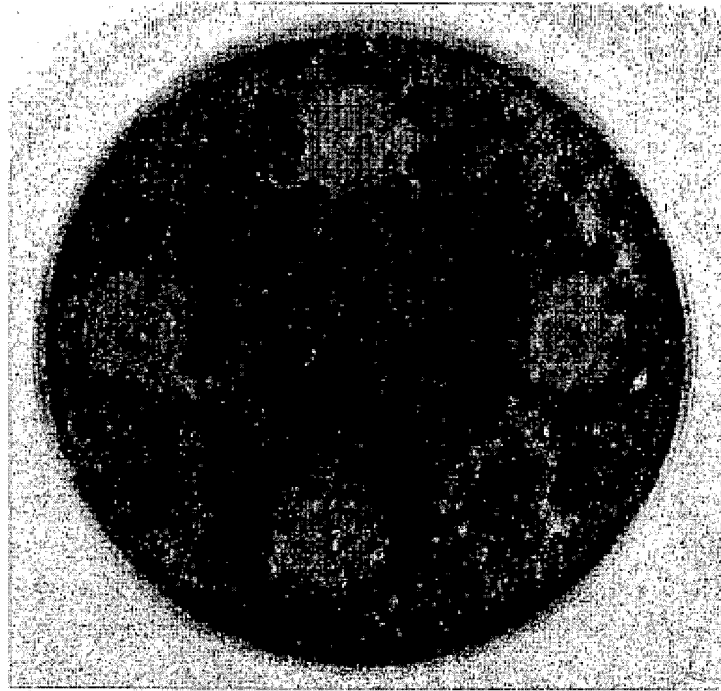


FIG. 31

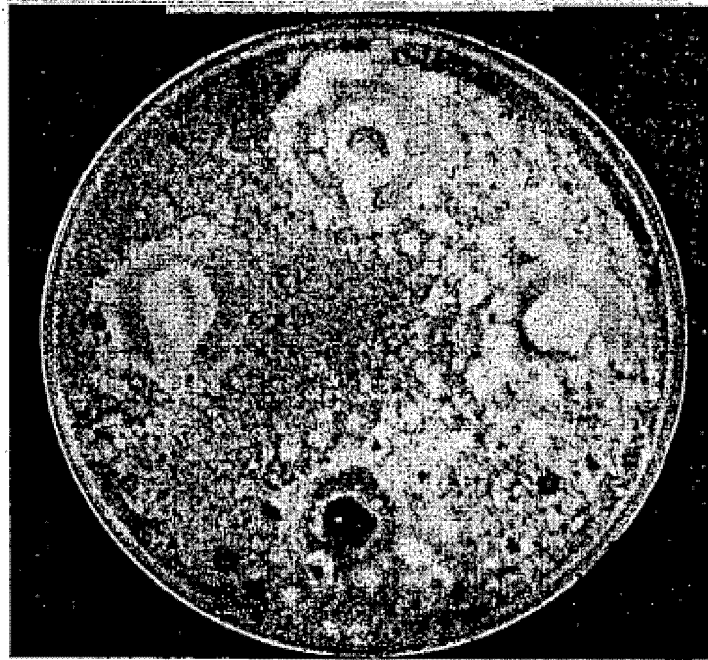


FIG. 32

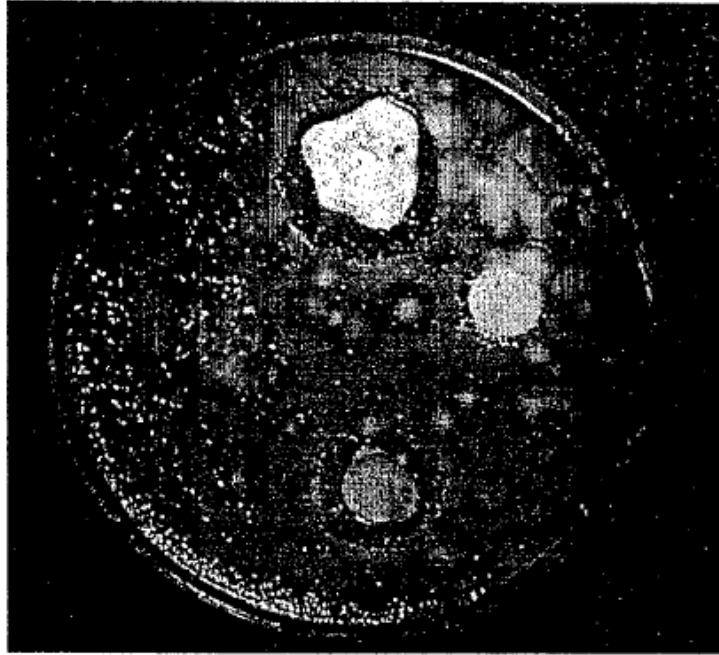


FIG. 33 |



FIG. 34