(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 537 841**

(21) Número de solicitud: 201301181

(51) Int. CI.:

A61K 31/355 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

11.12.2013

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

12.06.2015

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE (100.0%)
Avda. de la Universidad s/n Edif. Rectorado y Consejo Social
03202 Elche (Alicante) ES

(72) Inventor/es:

TOMÁS MENOR, Laura;
BARRAJÓN CATALÁN, Enrique;
RODRÍGUEZ DÍAZ, Juan Carlos;
AZNAR CERDÁN, María;
MARTÍ BRUÑÁ, Nuria;
SAURA LÓPEZ , Domingo y
MICOL MOLINA, Vicente

(54) Título: **Preparado hecho a base de una combinación sinérgica de polifenoles con actividad antibiótica**

(57) Resumen:

La presente invención recoge el uso los siguientes compuestos puros: ácido elágico, punicalina, punicalagina, punicalagina galato, quercetina, miricetina y kemferol, glicosilados o en forma aglicona y que, mezclados de manera y en proporciones concretas, proporcionan una actividad sinérgica como nuevos antibióticos frente a microorganismos bacterianos, o bien son capaces de reducir la resistencia de microorganismos resistentes a los tratamientos actuales. Los preparados basados en las citadas combinaciones poseen actividad antimicrobiana y pueden ser usados como ingredientes en productos farmacéuticos, cosméticos y de higiene. Los preparados a partir de extractos de plantas obtenidos mediante extracción con disolventes orgánicos, tal y como se describe en esta invención, también pueden ser usados como ingredientes capaces de reducir la resistencia a antibióticos.

ES 2 537 841 A1

DESCRIPCIÓN

Preparado hecho a base de una combinación sinérgica de polifenoles con actividad antibiótica

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra en el sector de los compuestos de origen vegetal con actividad antibiótica frente a cepas de bacterias, especialmente frente a cepas resistentes a antibióticos. Más concretamente recoge la combinación de compuestos puros con actividad sinérgica como nuevos antibióticos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

A lo largo de las últimas décadas, la aparición de nuevos compuestos o combinaciones de compuestos con actividad antibiótica que finalmente llegan a la clínica ha sufrido un claro estancamiento. En paralelo, la aparición de cepas de bacterias resistentes a los tratamientos antibióticos convencionales ha sufrido un claro y continuo repunte, tanto para las bacterias Gram positivas como para las Gram negativas. Esta situación constituye por lo tanto una problemática de difícil solución y de especial relevancia clínica, que sólo puede ser resuelta con la aparición de nuevas terapias basadas en el uso de compuestos nuevos o bien en la combinación inteligente de los ya existentes, bien entre sí, bien con otros de nueva aparición.

Los datos en Europa según el informe "Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012" [1], dentro del aumento general de las cepas resistentes a antibióticos, éste es especialmente importante en el caso de las bacterias Gram negativas.

Pseudomonas aeruginosa es un ejemplo de microorganismo Gram negativo, intrínsecamente resistente a la mayoría de agentes antibióticos, debido a su habilidad de excluir/expulsar los fármacos desde su interior, evitando así que se acumulen y ejerzan su efecto farmacológico. Entre los antibióticos que siguen siendo activos frente a este microorganismo, están las fluoroquinolonas (ej: ciprofloxacino y levofloxacino), pero aun así, el porcentaje de resistencias a éstas, está en claro crecimiento [1].

La situación es similar con los microorganismos Gram positivos. Si tomamos como ejemplo el *Staphylococcus aureus*, podemos ver como las estadísticas también muestran un claro aumento en el número de aislados clínicos resistentes a los antibióticos comúnmente usado en clínica [1]. El caso del *S. aureus* es especialmente relevante, ya que su forma resistente a meticilina,

conocida como MRSA (meticillin resistant *S. aureus*) es el principal causante de infecciones resistentes a antibióticos en todo el mundo y uno de los principales agentes infecciosos nosocomiales. La aparición de cepas MRSA en hospitales está asociada serios problemas de salud pública en los mismos, obligando a medidas excepcionales que provocan un aumento del gasto sanitario muy importante. Según informes de la Agencia Europea del Medicamento (EMA), el gasto sanitario adicional provocado por los microorganismos resistentes a antibióticos excede el billón y medio de euros en Europa (Unión Europea más Noruega e Islandia), [2]. Así mismo, la infección de pacientes por MRSA está asociado con un aumento de la estancia hospitalaria y de la mortalidad estadísticamente significativo [1].

Existen informes técnicos de la EMA y del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) que reconocen este claro problema relacionado con las resistencias y alientan a aumentar el esfuerzo para disminuir la distancia entre la actividad de los nuevos antibióticos y la supervivencia/resistencia de estas cepas bacterianas [2].

Por lo tanto, la situación actual precisa de nuevas formulaciones que permitan mejorar los tratamientos existentes hoy por hoy. Es aquí en donde ahonda la presente invención.

El campo de investigación de nuevos agentes antibióticos, a pesar del problema anteriormente presentado, está sin embargo en una situación de escasa productividad. Si se observa la aparición de las diferentes familias de antibióticos en el tiempo (figura 1, extraída de [2]). Se puede ver como la gran mayoría de familias fueron descubiertas en el siglo pasado y que aunque a comienzos del siglo XXI hubo un nuevo empuje con la aparición de los lipopéptidos y las oxazolidinonas, hay un hueco de casi 30 años vacío, sin resultados. En aquel momento, el problema de las resistencias no estaba tan candente como en la actualidad y no había necesidad de seguir investigando en este campo, lo que había funcionaba y por lo tanto la industria y la investigación tomaron otros rumbos de trabajo. Ese tiempo sin resultados, junto con la evolución de las diferentes cepas bacterianas y el mal uso de los antibióticos existentes es lo que nos ha llevado a la situación actual de necesidad de nuevos antibióticos que palien el problema de las resistencias.

Llegados a este punto, surge la necesidad perentoria de encontrar nuevos compuestos y/o estrategias de trabajo que permitan mejorar los tratamientos actuales. Para la búsqueda de nuevos compuestos, el reino vegetal constituye una fuente casi ilimitada de nuevas moléculas bioactivas. Las plantas tienen un metabolismo secundario muy desarrollado y muchas de las moléculas que sintetizan tienen actividades biológicas diversas, entre ellas la antimicrobiana. Muchos son los ejemplo de moléculas de origen vegetal que han demostrado su actividad

antimicrobiana, valgan estas revisiones como mero ejemplo de la cantidad de estudios científicos que versan sobre este tema [3-5]. Sin embargo, aunque la bibliografía es muy extensa, el uso de plantas como agentes antibacterianos, todavía queda muy distante de la clínica y está más relacionado con la etnofarmacología y la etnomedicina. Este hecho es debido fundamentalmente a la falta de estudios clínicos con humanos de los preparados obtenidos, a la escasa actividad *in vivo* de los productos, o a la falta de estrategias de uso, bien desde un punto de vista galénico o bien desde un punto de vista meramente farmacológico.

Sin embargo, no cabe duda de que las plantas son hoy por hoy la principal fuente de moléculas bioactivas de que disponemos y que por lo tanto, la clave es encontrar aquellas moléculas más interesantes y saber combinarlas de la manera adecuada. En este sentido, el uso de compuestos que tengan una actividad antibiótica sinérgica entre sí o con otros antibióticos ya existentes, es sin duda alguna una de las estrategias más prometedoras [6, 7]. La sinergia es la propiedad que poseen determinadas mezclas en las cuales, la actividad de la mezcla es mayor que la suma de las actividades de sus componentes por separado. Las mezclas sinérgicas no son nuevas en el campo del desarrollo de nuevos antibióticos, de hecho, una de las mezclas de fármacos con actividad sinérgica más famosa es la combinación de betalactámicos (penicilinas) con ácido clavulánico (un inhibidor de las betalactamasas). Otro ejemplo de mezclas de antibióticos sinérgicas es el clotrimoxazol, que es el nombre con el que se conoce la mezcla de sulfametoxazol con la trimetroprima, ambos pertenecientes a los inhibidores de la síntesis del folato. La clave por lo tanto, es la elección de las moléculas correctas y de la proporción adecuada para maximizar la actividad a la vez que se minimizan los efectos secundarios que del tratamiento se pudieran derivar. La sinergia entre compuestos de origen natural ha demostrado su relevancia en otros campos de estudio como la prevención de la obesidad y enfermedades relacionadas [8] y en la lucha contra el cáncer [9]

Para el estudio de la sinergia entre compuestos, existen diferentes técnicas, desde el estudio de los halos de inhibición del crecimiento (figura 2) en cultivos de bacterias en placas con el medio de crecimiento adecuado, al uso del método del isobolol (figura 3, descrito en [7] y [10]) . La gran mayoría de estos métodos son cualitativos o semicuantitativos, pero existe uno que es totalmente cuantitativo y que permite la comparación entre las diferentes mezclas que es el FICI (Fractional Inhibitory Concentration Index), descrito por el European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) de la European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) [10]. Este método, además de otorgar un valor numérico que puede compararse con las tabla al uso reconocidas por organismos oficiales (tabla 1, extraída de [10]), tal y como se ha dicho, permite comparar la actividad sinérgica de diferentes

muestras. En este sentido, cuando dos mezclas se comparan, la sinergia entre sus componentes es tanto mayor cuanto menor es el valor de FICI, y eso se puede conseguir de dos maneras:

1. Mezclando diferentes compuestos.

2. Mezclando compuestos en diferentes proporciones.

En cualquiera de los dos casos, se puede llegar a una condición ideal en la cual dos o más compuestos concretos, mezclados en unas proporciones concretas, tengan una actividad sinérgica máxima y por lo tanto, la actividad antibiótica sea máxima para una dosis dada.

Índice	**Sinergia**	**Aditividad**	**Indiferencia**	**Antagonismo**
FICI	≤ 0.5	$> 0.5\text{-}1$	> 1 a < 2	≥ 2

Tabla 1: valores proporcionados por EUCAST para el índice FICI en función del tipo de interacción existente entre los componentes de una mezcla concreta.

Existen datos previos de la actividad individual de los compuestos recogidos en la presente invención como antibióticos/antimicrobianos, pudiéndose encontrar referencias sobre el ácido elágico [11-14], la quercetina [5, 14-16], la miricetina [14, 17, 18], el kaempferol [14, 19-21] y las punicalaginas [14, 22-25], siendo éstas una selección las referencias más significativas para cada compuesto.

Dentro del campo de las patentes, existen ejemplos de patentes basadas en compuestos puros y/o extractos vegetales que reivindican una actividad antibiótica. Algunos ejemplos relevantes son los siguientes:

- Dentro de las patentes que reivindican la actividad antibiótica/antimicrobiana de extractos vegetales encontramos muchos géneros, como por ejemplo, el género *Cistus* (patentes WO2011032707, WO2010125171, DE102009011152, DE202006004872, US2011244041, RU2138279 y **ES2373184(B1)**) y el género *Citrus* (patentes KR101106053(B1), WO2012US71451 20121221, JP20080302618 20081127, KR20080082257 20080822). Ya hablando de especies concretas, podemos encontrar mucha información sobre la hoja de loto y *Eriobotrya japónica* (patente KR20110108483 20111024), la uva (patentes US201213348751 20120112, KR20030006028 20030123 y KR20110015712 20110222), el pino (KR20110133187 20111212), la *Scutellariae radix* (patentes KR20110061274 20110623 y KR20090082241 20090902), la *Indigofera tinctoria* (patente KR20110025466

20110322), la hoja de té (patentes KR20090015249 20090224, JP20080302618 20081127, KR20030024658 20030418, KR20020028116 20020521), el romero y el ajo (patentes JP20050262021, WO2012US7145 y US201113197131).

- De manera complementaria a la actividad antibiótica/antimicrobiana, hay que destacar que existen numerosas patentes que reclaman la actividad antimicrobiana como conservante de alimentos y alimentos funcionales, algunos ejemplos son el extracto de *Rosa rugosa* (patente KR20110131931 20111209), de hoja de arce y *Pinus thunbergii*, (patente KR20110104330 20111012) y *Siegesbeckia glabrescens* (patente KR20100080575 20100820).

- En cuanto a los compuestos puros, podemos destacar las que recogen la actividad antimicrobiana de kaempferol (patente KR20070095740 20070920) y quercetina (patentes KR20050022885 20050318, CN20091162376 20090814 y KR20090111021 20091117)

Existen trabajos que muestran actividad antimicrobiana/antibiótica sinérgica de compuestos entre sí (terpenos, flavonoides y ácidos fenólicos) frente a diferentes cepas bacterianas [5, 26-28]. También hay datos previos de la sinergia entre diferentes extractos, o lo que es lo mismo, entre extractos de diferente origen vegetal. Entre dichas fuentes vegetales se encuentran el granado (*Punica granatum),* el tomillo (*Thymus vulgaris*), la mirra (*Commiphora molmol*) y otras menos conocidas como *Achillea fragrantissima, Salvia chamelaeagnea y Leonotis. leonurus* [29, 30].

Sin embargo, los trabajos sobre la actividad antibiótica/antimicrobiana en los que las mezclas estén basadas en dos o más compuestos de origen exclusivamente polifenólico son casi inexistentes [28]. La gran mayoría de trabajos versan sobre mezclas de un polifenol con otro tipo de compuestos [5, 26, 27], o entre varios extractos de origen vegetal. También hay ejemplos de combinaciones sinérgicas entre extractos de origen vegetal y antibióticos obteniendo como resultado, bien un aumento de la actividad, o bien la disminución de la resistencia a dichos antibióticos en el caso de que ésta existiera. [29, 31-37]. Pero, en ningún caso, existe constancia previa de la mezcla de los compuestos previstos en la presente invención ni entre ellos, ni entre sus mezclas y ningún antibiótico conocido. No existe, ningún trabajo científico ni patente que hable de la mezcla de los compuestos que en esta invención se proponen, y menos aún, de que esa mezcla sea hecha con el fin de producirse una interacción sinérgica entre los mismos integrantes de la mezcla.

Además, hay que concluir de la revisión del estado del arte que a pesar de los resultados obtenidos, hasta el momento, ninguno de los compuestos de origen vegetal (ni ningún extracto) ha llegado a la práctica clínica diaria y los resultados han quedado en etapas que, como mucho, llegan a la fase preclínica o a pequeños ensayos piloto. Por ello, la necesidad de nuevos enfoques y/o compuestos sigue plenamente vigente y el problema clínico del aumento de la resistencias no hace sino crecer de manera continua.

Por lo tanto, la novedad de la presente invención radica en la elección de unos compuestos concretos, y en su mezcla en unas proporciones determinadas, que son capaces de proporcionar una actividad antibiótica/antimicrobiana sinérgica o bien son capaces de reducir la resistencia a los tratamientos antibióticos conocidos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención resuelve los problemas planteados mediante el uso de compuestos puros, combinados de manera específica y en las proporciones adecuadas, presentan actividad antibiótica sinérgica. Se seleccionan los compuestos entre una amplia batería de compuestos de origen natural y la mezcla de los mismos en las proporciones que dan como resultado una actividad sinérgica máxima como antibióticos.

La selección de los compuestos se ha llevado teniendo en cuenta tres aspectos primordiales:

1.- Los datos previos de actividad antibiótica de los compuestos

2.- La actividad sinérgica entre ellos.

3.- La fuente de obtención de los mismos, es decir la materia prima vegetal de la cual pueden aislarse de manera pura o bien la posibilidad de obtenerlos mediante síntesis química

Teniendo en cuenta estos preceptos, los compuestos seleccionados dentro de la presente invención son los siguientes:

1.- Ácido elágico.

2.- Elagitaninos, en concreto, la punicalina, la punicalagina y la punicalagina galato.

3.- Flavonoles, en concreto la quercetina, miricetina y kaempferol, tanto en su forma glicosilada, independientemente del azúcar que forme parte de la estructura final, como en su forma aglicona.

La presente invención recoge la combinación de dos o más de los compuestos, mezclados en proporciones en las que al menos uno de ellos esté entre el 10 y el 90% en peso. Estas proporciones aseguran que ninguno de los compuestos estará presente en forma pura.

Las mezclas así obtenidas tienen una actividad antimicrobiana/antibiótica sinérgica, es decir, mayor que la suma de la actividad de sus compuestos por separado. Los autores han comprobado que dichas mezclas presentan actividad antibiótica sinérgica, mediante el cálculo del índice FIC o FICI, descrito anteriormente.

El origen o fuente de la los compuestos puros puede ser de origen vegetal, pudiendo ser ésta muy variable, ya que son compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal por ser metabolitos secundarios comunes en las plantas. Pero también pueden ser obtenidos mediante síntesis química. A modo de ejemplo, se recoge a continuación una lista de las principales fuentes vegetales de dichos compuestos:

1.- Ácido elágico: granado (*Punica granatum*) y plantas del género *Cistus.*

2.- Elagitaninos (punicalagina y punicalagina galato): plantas del género *Cistus* y granado (*Punica granatum).*

3.- Flavonoles y flavonoles glicosilados:

a).- Miricetina y sus derivados glicosilados: plantas de los géneros *Cistus*, uva (*Vitis vinífera)* y arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon).*

b).- Quercetina, kemferol y sus derivados glicosilados: cebolla (*Allium cepa*), lechuga (*Lactuca sativa*), endivia (*Cichorum endivia*), manzana (*Malus domestica*), brócoli (*Brassica oleracea*) y almendra (*Prunus dulcis*).

Así mismo, y dado que los compuestos de origen natural presentan en muchos casos sinergia con los antibióticos ya disponibles, la presente invención también recoge la posible combinación de dichos compuestos en las proporciones sinérgicas citadas, con antibióticos de cualquier familia con el fin de:

1.- Aumentar la actividad de la mezcla mediante la sinergia entre los compuestos y el antibiótico y por consiguiente reducir la dosificación de la mezcla.

2.- Disminuir, a través de la acción sinérgica de los compuestos naturales, la resistencia al antibiótico por parte del microorganismo.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Muestra la fecha de descubrimiento de las diferentes familias de antibióticos teniendo los acrónimos los siguientes significados: SUL (sulfamidas), AMI (aminoglucósidos), BET (betalactámicos), CLO (cloranfenicol), TET (tetraciclinas), MAC (macrólidos), GLI (glicopéptidos), STR (estreptomicina), QUI (quinolonas), LIN (lincosamidas), TRI (trimetropín), LIP (lipopéptidos) y OXA (oxazolidndionas).

Figura 2: muestra imágenes de placas de cultivo bacteriano en el que se aprecian los diferentes comportamientos de interacción entre compuestos con actividad antibiótica, incluyendo la sinergia (S), la indiferencia (I) y el antagonismo (A).

Figura 3: muestra una representación gráfica del método del isobololm para determinar el comportamiento antagonista (Ant), el comportamiento aditivo (Adi) y el comportamiento sinérgico (Sin).

Figura 4: muestra la estructura química de los principales compuestos químicos fenólicos que son objeto de esta invención: quercetina glucósido (A), miricetina (B), punicalagina (C) y ácido elágico (D).

MODO DE REALIZACIÓN PREFERENTE

A continuación se muestran algunos ejemplos sobre cómo se lleva concretamente a la práctica la invención, describiendo la actividad sinérgica de los compuestos fenólicos en el control de cepas de Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa, que ilustran la descripción de la invención aunque no pretenden ser limitativos de su alcance:

EJEMPLO 1: actividad antimicrobiana sinérgica de una mezcla de ácido elágico y quercetina glucósido

Se partió de la mezcla de dos compuestos puros, en este caso ácido elágico y la quercetina glucósido, mezclados en una proporción en la que el ácido elágico supone el 12,5% en peso de la mezcla y la quercetina glucósido el 87,5%. La actividad antimicrobiana de dicha mezcla fue probada utilizando el método descrito por Tomás-Menor, L., et al., (2013) en el artículo " Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish Cistus species". Se utilizó una cepa control de *S. aureus* (cepa CECT) obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo de la Universitat de Valencia. Se determinó el valor de MIC50 tanto para la mezcla como para los compuestos puros, y a partir de los mismos se calculó el valor del FICI. Dichos resultados se muestran a continuación:

- MIC50 (ácido elágico puro)= 12.35±4.29 µg/mL
- MIC50 (quercetina glucósido pura)= 14.37±4.10 µg/mL
- MIC50 (mezcla)= 2.71±0.73 µg/mL
- FICI (mezcla)= 0.21 → sinergia (según tabla 1).

Por lo tanto, la mezcla de los compuestos en las citadas proporciones, reduce el valor del MIC50 en un orden de magnitud cuando se compara con el de los compuestos puros y proporciona un valor de FICI que entra dentro de los valores que, según EUCAST, se considera como interacción sinérgica.

EJEMPLO 2: actividad antimicrobiana sinérgica de una mezcla de ácido elágico y punicalagina

Se partió de la mezcla de dos compuestos puros, en este caso ácido elágico y la punicalagina, mezclados en una proporción en la que el ácido elágico supone el 25% en peso de la mezcla y la punicalagina el 75%. La actividad antimicrobiana de dicha mezcla fue probada utilizando el método descrito en el ejemplo anterior frente a la misma cepa control de *S. aureus* (cepa CECT). Se determinó el valor de MIC50 tanto para la mezcla como para los compuestos puros, y a partir de los mismos se calculó el valor del FICI. Dichos resultados se muestran a continuación:

- MIC50 (ácido elágico puro)= 12.35±4.29 µg/mL
- MIC50 (punicalagina pura)= 42.11±9.33 µg/mL
- MIC50 (mezcla)= 1.16±0.49 µg/mL
- FICI (mezcla)= 0.08 → sinergia (según tabla 1).

Por lo tanto, la mezcla de los compuestos en las citadas proporciones, reduce el valor del MIC50 en más de un orden de magnitud cuando se compara con el de los compuestos puros y proporciona un valor de FICI que entra dentro de los valores que, según EUCAST, se considera como interacción sinérgica.

EJEMPLO 3: actividad antimicrobiana sinérgica de una mezcla de quercetina y miricetina

Se partió de la mezcla de dos compuestos puros, en este caso quercetina glucósido y la miricetina, mezclados en una proporción en la que la quercetina glucósido supone el 75% en peso de la mezcla y la miricetina el 25%. La actividad antimicrobiana de dicha mezcla fue probada utilizando el método descrito en los dos ejemplos anteriores y con la misma cepa control de *S. aureus* obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo de la Universitat de Valencia. Se determinó el valor de MIC50 tanto para la mezcla como para los compuestos puros, y a partir de los mismos se calculó el valor del FICI. Dichos resultados se muestran a continuación:

- MIC50 (querceina glucósido pura)= 14.37±4.10 µg/mL
- MIC50 (miricetina pura)= 15.76±3.41 µg/mL
- MIC50 (mezcla)= 6.03±4.14 µg/mL
- FICI (mezcla)= 0.41 → sinergia (según tabla 1).

Por lo tanto, la mezcla de los compuestos en las citadas proporciones, reduce el valor del MIC50 en un orden de magnitud cuando se compara con el de los compuestos puros y proporciona un valor de FICI que entra dentro de los valores que, según EUCAST, se considera como interacción sinérgica.

EJEMPLO 4

Se partió de la mezcla de dos compuestos puros, en este caso miricetina y la punicalagina, mezclados en una proporción en la que la miricetina supone el 25% en peso de la mezcla y la punicalagina el 75%. La actividad antimicrobiana de dicha mezcla fue probada usando el mismo procedimiento descrito en los ejemplos anteriores y con la misma cepa *S. aureus* (cepa CECT). Se determinó el valor de MIC50 tanto para la mezcla como para los compuestos puros,y a partir de los mismos se calculó el valor del FICI. Dichos resultados se muestran a continuación:

- MIC50 (miricetina pura)= 15.76±3.41 µg/mL
- MIC50 (punicalagina pura)= 42.11±9.33 µg/mL
- MIC50 (mezcla)= 6.06±0.58 µg/mL

- FICI (mezcla)= 0.17 → sinergia.

Por lo tanto, la mezcla de los compuestos en las citadas proporciones, reduce el valor del MIC50 en un orden de magnitud cuando se compara con el de los compuestos puros y proporciona un valor de FICI que entra dentro de los valores que, según EUCAST (tabla 1), se considera como interacción sinérgica.

EJEMPLO 5

Se partió de una mezcla de los compuestos ácido elágico con punicalagina mezclados en una proporción en la que el ácido elágico supone el 25% en peso de la mezcla y la punicalagina el 75%. Dicha mezcla se probó a tres concentraciones diferentes (100, 500 y 1000 µg/mL) en un panel de cepas microbianas obtenidas de pacientes hospitalarios humanos infectados: Dicho panel consistió en 52 cepas de *S. aureus,* de las cuales 29 (56% del total) resultaron ser resistentes a meticilina (SAMR) y 61 cepas de *P. aeruginosa*, de las cuales 20 (33% del total) eran resistentes a carbapemenes y 12 resistentes a quinolonas (20% del total). Los resultados de este ensayo de actividad *in vivo* de la mezcla se muestran en la siguiente tabla, en donde S indica que el 100% de las cepas fueron sensibles al tratamiento, I que el tratamiento tuvo un efecto intermedio y R que el 100% de las cepas probadas fueron resistentes al tratamiento.

:Concentración de la mezcla	*S. aureus*	*P. aeruginosa*
1000 µg/mL	S	S
500 µg/mL	I	I
100 µg/mL	R	R

De este ejemplo se deduce que las mezclas descritas en la presente invención son capaces de funcionar *in vivo* frente a microorganismos Gram positivos y negativos, tanto sensibles como resistentes a los tratamientos antibióticos convencionales.

EJEMPLO 6

Se partió de la mezcla descrita en el ejemplo 5 y se realizó un ensayo en el cual, dicha mezcla se añadió a diferentes concentraciones a un tratamiento basado en cloxacilina (CLOX). La combinación de la mezcla de compuestos y el antibiótico, se probó en un panel de 15 cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina obteniéndose los siguientes resultados:

Concentración CLOX (µg/mL)	CLOX. (sin mezcla)	CLOX + mezcla (50 µg/mL)	CLOX + mezcla 200 µg/mL	CLOX + mezcla 300 µg/mL	CLOX + mezcla 400 µg/mL
128	100 % S	100 % S	100 % S	100 % S	100 % S
64	100 % S	100 % S	100 % S	100 % S	100 % S
32	60%S 40%R	100 % S	100 % S	100 % S	100 % S
16	60%S 40%R	20% R 40% I 40% S	100 % S	100 % S	100 % S
8	30%S 70% R	40% R 20% I 40% S	100 % S	100 % S	100 % S
4	30%S 70% R	60% R 20% I 20% S	60% R 20% I 20% S	100 % S	100 % S
2	30% I 70% R	75% R 25% I	75% R 25% I	100 % S	100 % S
1	30% I 70% R	80% R 20% I	70% R 30% I	100 % S	100 % S
0.5	100% R	86% R 14% I	86% R 14% I	25% R 75% S	100 % S
0.25	100% R	100% R	100% R	25% R 75% S	100 % S
0.125	100% R	100% R	100% R	25% R 75% S	100 % S
0.06	100% R	100% R	100% R	75% R 25% S	100 % S

En la tabla anterior se puede apreciar como en ausencia del extracto, todas las cepas probadas son resistentes al antibiótico hasta llegar a una concentración del mismo de 64 µg/mL. Cuando se añade al ensayo una concentración de la mezcla de 50 µg/mL, las bacterias que antes eran resistentes hasta 64, ahora lo son sólo hasta 32 µg/mL. Se puede observar en la tabla como conforme la concentración de la mezcla aumenta, la resistencia de las bacterias disminuye hasta prácticamente desaparecer en presencia de 400 µg/mL de la mezcla, concentración en la cual, la presencia conjunta de 0,06 µg/mL de cloxacilina es suficiente para matar el 100% de las cepas resistentes probadas.

Además, de conseguir esta disminución de la resistencia, este ensayo pone de manifiesto la sinergia entre la propia mezcla y el antibiótico ya que la unión de ambos componentes, proporciona un resultado mejor que cualquiera de los dos por separado.

EJEMPLO 7

Se partió de un kg de la planta *Cistus salviifolius* de la cual se descartaron las partes más leñosas quedándose finalmente con 700 g de la misma. Dicha cantidad fue sometida a una extracción hidroalcohólica con una cantidad de 3,6L de una mezcla agua:etanol (15% agua y 85% etanol). Se incubó durante 4 horas a una temperatura de 40ºC y posteriormente se tamizó y filtró para eliminar los restos de planta. El producto líquido final filtrado se secó mediante el uso de un secador por nebulación obteniéndose un extracto en seco cuyos componentes mayoritarios fueron la punicalagina y la miricetina. La cuantificación por HPLC de los mismos demostró que ambos compuestos estaban presentes en una proporción en peso que suponía un 35% en peso de punicalaginas y un 25% en peso de miricetina (proporciones incluidas y descritas en la presente invención). Dicho extracto se probó en un ensayo como el descrito en los ejemplos del 1 al 4 obteniéndose los siguientes valores:

- MIC50 (miricetina pura)= 15.76±3.41 µg/mL
- MIC50 (punicalagina pura)= 42.11±9.33 µg/mL
- MIC50 (extracto)= 5.83±1.79 µg/mL
- FICI (mezcla)= 0.19 → sinergia (según tabla 1).

De nuevo se demostró que las mezclas descritas, independientemente de si son obtenidas como mezcla de compuestos puros, u obtenidas mediante la mezcla de uno o más extractos, tienen actividad antimicrobiana/antibiótica sinérgica.

Para facilitar la compresión de la invención y el alcance de la misma, a continuación se describen una serie de ejemplos que describen las diversas combinaciones sinérgicas y su utilización. Se describen las aplicaciones prácticas de la presente invención,sin prejuicio del desarrollo de otros ejemplos diferentes de los aquí presentados pero que quedarían recogidos/protegidos dentro de las reivindicaciones de la presente invención.

EJEMPLO 8: prevención de la colonización de quemaduras por S. aureus y P. aeruginosa en grandes quemados.

Uno de los principales problemas asociados a los grandes quemados es la infección por estos dos tipos de microorganismos. Esta infección agrava significativamente su pronóstico y es una de las principales causas de muerte en este tipo de enfermos, especialmente cuando la infección es por cepas resistentes a los antibióticos. Dada la actividad antibiótica sinérgica de las mezclas recogidas en la presente invención la utilización de una mezcla de los compuestos quercetina 3-glucósido y punicalagina, en

una proporción en peso del 12,5% de la primera y 87,5% de la segunda y con una concentración final en el gel de 1 mg/mL, incluida en un gel hidrófilo de carbopol como forma farmacéutica, evita la infección al ser administradas de manera tópica a los pacientes.

EJEMPLO 9: prevención de infecciones en pacientes entubados en UCIs.

Uno de los principales problemas de los enfermos ingresados en la Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs), es la infección por microorganismos resistentes a antibióticos. A modo de ejemplo sirva que la mortalidad en pacientes ingresados en una UCI si son infectados por *P. aeruginosa* resistente a antibióticos, es del 50% debido a dicha infección. Una de las vías de entrada de la infección es la a través de tubos usados para la respiración asistida y/o catéteres que se utilizan para la administración de la medicación. Esta vía de entrada se podría minimizar mediante la impregnación y/o lavado de los tubos y catéteres con una solución de la mezcla miricetina y punicalagina en una proporción en peso del 25% de la primera y 75% de la segunda a una concentración de 1 mg/mL, la cual ha demostrado inhibir el 100% de las cepas de *P. aeruginosa* probadas, independientemente de si son o no resistentes a los antibióticos habituales.

EJEMPLO 10: prevención de infección de pacientes tras recibir una prótesis o cualquier otro dispositivo plástico.

Otro ejemplo con gran relevancia clínica es la prevención de la infección por *S. aureus y P. aeruginosa* de enfermos a los que les ha sido implantada una prótesis. El lavado y/o impregnación de la misma con una solución de la mezcla entre ácido elágico y la quercetina 3-glucósido en una proporción en peso del 12,5% del primero y un 87,5% de la segunda a una concentración de 1 mg/mL, la cual ha demostrado inhibir el 100% de las cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* probadas, independientemente de si son o no resistentes a los antibióticos habituales, conseguiría evitar el 100% de estas infecciones según los datos obtenidos por los autores en cepas de dichos microorganismos obtenidos de pacientes infectados como se detalla en apartados anteriores.

EJEMPLO 11: prevención de la infección por s. Aureus y p. Aeruginosa en pacientes con fibrosis quística.

La fibrosis quística es una grave enfermedad respiratoria relacionada con factores genéticos y que es especialmente relevante en la población infantil. En la actualidad no existe tratamiento curativo para la enfermedad, pero además de los síntomas respiratorios, ésta está asociada con la infección oportunista de microorganismos, especialmente de los géneros *Pseudomonas* o *Staphylococcus*. Para evitar dicha infección oportunista, una de las posibles aplicaciones de la presente invención es un spray de aplicación nasal y/o bucal con una solución de la mezcla ácido elágico con punicalagina en una proporción en peso del 75 % del primero y 25% de la segunda a a una concentración final de 1 mg/mL. Dicha concentración conseguiría prevenir la infección oportunista de estos microorganismos, mejorando significativamente el pronóstico y calidad de vida de los enfermos con esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. European_Centre_for_Disease_Prevention_and_Control, Antimicrobial resistance surveillance in Europe. 2012.

2. EuropeanCentreforDiseasePreventionandControl, The bacterial challenge: time to react: a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. 2009. .

3. Ríos, J.L. and M.C. Recio, Medicinal plants and antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology, 2005. 100(1-2): p. 80-84.

4. Cowan, M.M., Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 1999. 12(4): p. 564-582.

5. Cushnie, T.P.T. and A.J. Lamb, Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents, 2005. 26(5): p. 343-356.

6. Berenbaum, M.C., What is synergy? Pharmacological Reviews, 1989. 41(2): p. 93-141.

7. Wagner, H., Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. Fitoterapia, 2011. 82(1): p. 34-37.

8. Herranz-Lopez, M., et al., Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: perspectives and implications. Phytomedicine, 2012. 19(3-4): p. 253-61.

9. Liu, R.H., Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. Journal of Nutrition, 2004. 134(12 SUPPL.): p. 3479S-3485S.

10. EUCAST, European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID).Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST definitive document, 2000.

11. Akiyama, H., et al., Antibacterial action of several tannins against Staphylococcus aureus. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001. 48(4): p. 487-491.

12. Lu, H.F., et al., Ellagic acid inhibits growth and arylamine N-acetyltransferase activity and gene expression in Staphylococcus aureus. In Vivo, 2005. 19(1): p. 195-200.

13. Quave, C.L., et al., Ellagic acid derivatives from Rubus ulmifolius inhibit Staphylococcus aureus biofilm formation and improve response to antibiotics. PLoS ONE. 7(1).

14. Tomás-Menor, L., et al., Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish Cistus species. Food Chem Toxicol, 2013. 55: p. 313-322.

15. Ã–zÃ§elik, B., I. Orhan, and G. Toker, Antiviral and antimicrobial assessment of some selected flavonoids. Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences, 2006. 61(9-10): p. 632-638.

16. Hirai, I., et al., Characterisation of anti-Staphylococcus aureus activity of quercetin. International Journal of Food Science and Technology. 45(6): p. 1250-1254.

17. Demetzos, C., et al., Structure elucidation, conformational analysis and thermal effects on membrane bilayers of an antimicrobial myricetin ether derivative. Journal of Heterocyclic Chemistry, 2001. 38(3): p. 703-710.

18. Griep, M.A., et al., Myricetin inhibits Escherichia coli DnaB helicase but not primase. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2007. 15(22): p. 7203-7208.

19. Falcão-Silva, V.S., et al., Modulation of drug resistance in Staphylococcus aureus by a kaempferol glycoside from Herissantia tiubae (Malvaceae). Phytotherapy Research, 2009. 23(10): p. 1367-1370.

20. Holler, J.G., et al., Novel inhibitory activity of the Staphylococcus aureus NorA efflux pump by a kaempferol rhamnoside isolated from Persea lingue Nees. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012. 67(5): p. 1138-1144.

21. Lim, Y.H., I.H. Kim, and J.J. Seo, In vitro activity of kaempferol isolated from the Impatiens balsamina alone and in combination with erythromycin or clindamycin against Propionibacterium acnes. Journal of Microbiology, 2007. 45(5): p. 473-477.

22. Barrajon-Catalan, E., et al., Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. Food Chem Toxicol, 2010. 48(8-9): p. 2273-82.

23. Machado, T.D.B., et al., Antimicrobial ellagitannin of Punica granatum fruits. J Braz Chem Soc, 2002. 13(5): p. 606-610.

24. Taguri, T., T. Tanaka, and I. Kouno, Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2004. 27(12): p. 1965-1969.

25. Taguri, T., T. Tanaka, and I. Kouno, Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2006. 29(11): p. 2226-2235.

26. Qin, C., et al., What does it take to synergistically combine sub-potent natural products into drug-level potent combinations? PLoS ONE, 2012. 7(11): p. e49969.

27. de Oliveira, C.E.V., et al., Inhibition of Staphylococcus aureus in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. International Journal of Food Microbiology, 2010. 137(2-3): p. 312-316.

28. Betts, J.W., S.M. Kelly, and S.J. Haswell, Antibacterial effects of theaflavin and synergy with epicatechin against clinical isolates of Acinetobacter baumannii and Stenotrophomonas maltophilia. International Journal of Antimicrobial Agents, 2011. 38(5): p. 421-425.

29. Hussin, W.A. and W.M. El-Sayed, Synergic interactions between selected botanical extracts and tetracycline against gram positive and gram negative bacteria. Journal of Biological Sciences, 2011. 11(7): p. 433-441.

30. Kamatou, G.P.P., et al., In vitro evidence of antimicrobial synergy between Salvia chamelaeagnea and Leonotis leonurus. South African Journal of Botany, 2006. 72(4): p. 634-636.

31. Rosato, A., et al., Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. Phytomedicine, 2007. 14(11): p. 727-732.

32. Brehm-Stecher, B.F. and E.A. Johnson, Sensitization of Staphylococcus aureus and Escherichia coli to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003. 47(10): p. 3357-3360.

33. Mandalari, G., et al., Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins. Letters in Applied Microbiology, 2010. 51(1): p. 83-89.

34. Taylor, P.W., Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. Int J Antimicrob Agents, 2013.

35. Aiyegoro, O.A. and A.I. Okoh, Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics: Implications in antimicrobial chemotherapy. Journal of Medicinal Plants Research, 2009. 3(13): p. 1147-1152.

36. Karpanen, T.J., et al., Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of Staphylococcus epidermidis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008. 62(5): p. 1031-1036.

37. Zhou, X., et al., In vitro synergistic interaction of 5-O-methylglovanon and ampicillin against ampicillin resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis isolates. Archives of Pharmacal Research, 2011. 34(10): p. 1751-1757.

REIVINDICACIONES

1. Composición hecha a base de una combinación sinérgica de polifenoles con actividad antibiótica eficaz frente a cepas de bacterias resistentes a antibióticos **caracterizada porque** comprende al menos 2 los siguientes compuestos puros: ácido elágico, punicalagina, quercetina y miricetina, mezclados en las proporciones, en las que al menos uno de ellos, esté en un porcentaje de entre el 10 y el 90% en peso.

2. Composición según la reivindicación 1 **caracterizada porque** las combinaciones binarias comprenden preferiblemente: quercetina 3-glucósido y punicalagina o punicalina; miricetina y punicalagina o punicalina; ácido elágico y quercetina 3-glucósido.

3. Composición según la reivindicaciones 1 y 2 **caracterizada porque** las combinaciones comprenden alguno de los compuestos descritos y el otro es un elagitanino.

4. Composición según las reivindicaciones 1, 2 y 3 **caracterizada porque** los compuestos pueden estar en forma glicosilada o no.

5. Composición según las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizada porque** la preparación además comprende un antibiótico eficaz frente a los microorganismos sobre los que se aplique, disminuyendo su resistencia e incrementado su eficacia.

6. Composición hecha a base de una combinación sinérgica de polifenoles con actividad antibiótica, según la reivindicación 1, **caracterizado por** estar compuesto de quercetina 3-glucósido y punicalagina, en una proporción en peso del 12,5% de la primera y 87,5% de la segunda.

7. Uso de la composición según la reivindicación 6 **caracterizada por** ser eficaz para el tratamiento tópico en grandes quemados para prevención de la colonización de quemaduras por *S. aureus y P. aeruginosa.*

8. Preparado hecho a base de una combinación sinérgica de polifenoles con actividad antibiótica, según la reivindicación 1, **caracterizado por**, estar compuesto de

una solución de la mezcla miricetina y punicalagina en una proporción en peso del 25% de la primera y 75% de la segunda.

9. Uso de una composición según la reivindicación 8 **caracterizada por** ser eficaz para la inhibición de *P. aeruginosa* para su empleo en tubos usados para la respiración asistida y/o catéteres en pacientes ingresados en UCIs.

10. Preparado hecho a base de una combinación sinérgica de polifenoles con actividad antibiótica, según la reivindicación 1, **caracterizado por**, estar compuesto de una solución de la mezcla de ácido elágico y la quercetina 3-glucósido en una proporción en peso del 12,5% del primero y un 87,5% de la segunda.

11. Uso de una composición según la reivindicación 10 **caracterizada por** ser eficaz para inhibir cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* evitando la infección de pacientes tras recibir una prótesis o cualquier otro dispositivo plástico.

12. Uso del preparado que comprende una composición según las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado por** estar destinado a fines de higiene y/o limpieza.

13. Uso del preparado que comprende una composición según las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado por** estar destinado a su uso con fines cosméticos.

14. Uso del preparado que comprende una composición según las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado por** estar destinado a su uso como antiséptico.

15. Uso del preparado que comprende una composición según las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado por** estar destinado a su uso como antibiótico.

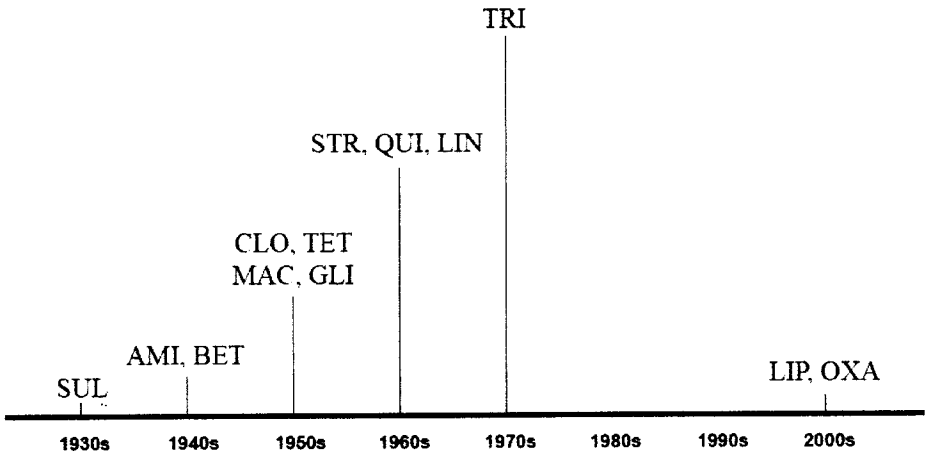

Figura 1

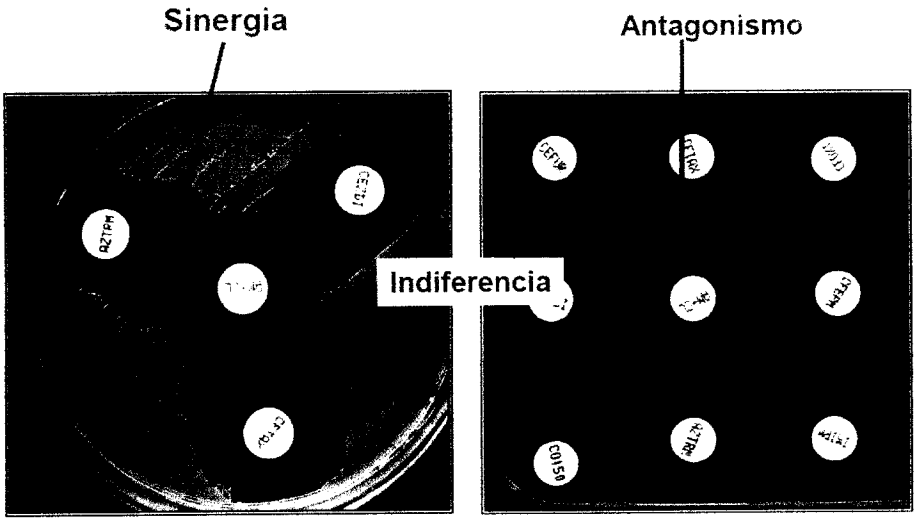

Figura 2

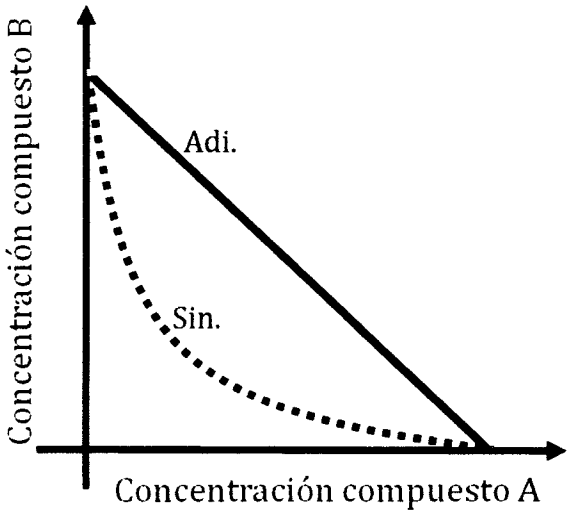

Figura 3

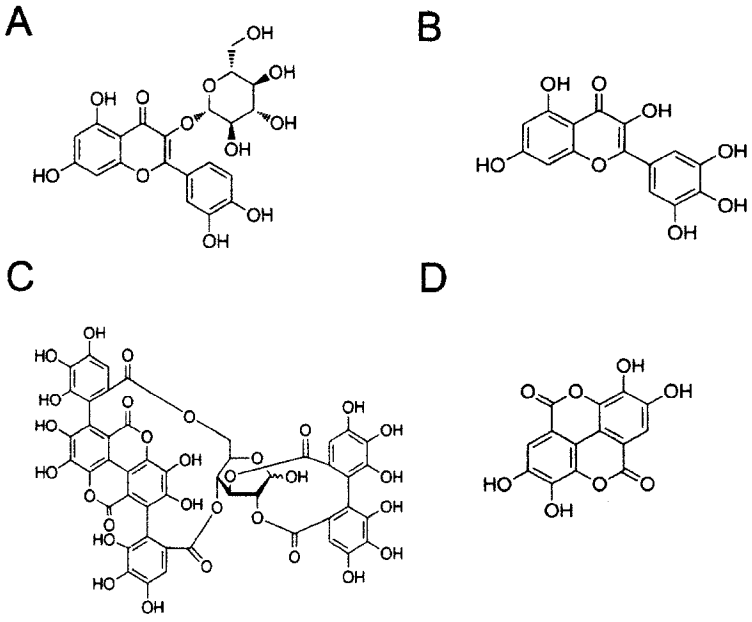

Figura 4

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201301181

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 11.12.2013

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
A	DAGLIA M "Polyphenols as antimicrobial agents" Current Opinion in Biotechnology Abril 2012 Elsevier Ltd gbr (04.2012) VOL: 23 No: 2 Págs: 174-181 ISSN 0958-1669 (print) ISSN 1879-0429 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.copbio.2011.08.007; todo el documento.	1-15
A	TOMÁS-MENOR LAURA et al. "Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species" FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, 20130116 PERGAMON, GB 16.01.2013 VOL: 55 Pags: 313 - 322 ISSN 0278-6915 Doi: doi:10.1016/j.fct.2013.01.006; Verhagen Hans; Leino Olli; todo el documento.	1-15
A	HAIDARI M et al. "Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir" PHYTOMEDICINE, 20091201 GUSTAV FISCHER VERLAG, STUTTGART, DE 01.12.2009 VOL: 16 No: 12 Págs: 1127-1136 ISSN 0944-7113 Doi: doi:10.1016/j.phymed.2009.06.002; todo el documento.	1-15
A	HUSSIN W A et al. "Synergic interactions between selected botanical extracts and tetracycline against gram positive and gram negative bacteria" Journal of Biological Sciences 2011 Asian Network for Scientific Information pak (2011) VOL: 11 No: 7 Págs: 433-441 ISSN 1727-3048 (print) ISSN 1812-5719 (electronic) Doi: doi:10.3923/jbs.2011.433.441; todo el documento.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
29.05.2015	M. Á. García Coca	1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/355 (2006.01)
A61P17/02 (2006.01)
A61P31/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE/ELSEVIER, MEDLINE/NLM, XPESP y bases de datos de texto completo TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.05.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-15	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-15	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DAGLIA M "Polyphenols as antimicrobial agents" Current Opinion in Biotechnology April 2012 Elsevier Ltd gbr (04.2012) VOL: 23 No: 2 Págs: 174-181 ISSN 0958-1669 (print) ISSN 1879-0429 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.copbio.2011.08.007.	31.03.2012
D02	TOMÁS-MENOR LAURA et al. "Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish Cistus species" FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, 20130116 PERGAMON, GB 16.01.2013 VOL: 55 Págs: 313-322 ISSN 0278-6915 Doi: doi:10.1016/j.fct.2013.01.006 Verhagen Hans; Leino Olli.	16.01.2013
D03	HAIDARI M et al. "Pomegranate (Punica granatum) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir" PHYTOMEDICINE, 20091201 GUSTAV FISCHER VERLAG, STUTTGART, DE 01.12.2009 VOL: 16 No: 12 Págs: 1127-1136 ISSN 0944-7113 Doi: doi:10.1016/j.phymed.2009.06.002.	01.12.2009
D04	HUSSIN W A et al. "Synergic interactions between selected botanical extracts and tetracycline against gram positive and gram negative bacteria" Journal of Biological Sciences 2011 Asian Network for Scientific Information pak (2011) VOL: 11 No: 7 Págs: 433-441 ISSN 1727-3048 (print) ISSN 1812-5719 (electronic) Doi: doi:10.3923/jbs.2011.433.441.	30.11.2010

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-15, es una composición sinérgica de polifenoles con actividad antibiótica que comprende al menos 2 de los compuestos: ácido elágico, punicalagina, quercetina y miricetina (reiv. 1-6). Es también objeto de la invención un preparado hecho a base de dicha composición, y el uso del preparado y de la composición (reiv. 7-15).

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga las propiedades de los polifenoles como antioxidantes, antialérgicas, antiinflamatorias y antimicrobianas. Algunos polifenoles presentan una elevada actividad antibacteriana, antiviral y antifúngica. Algunos flavonoides presentan una actividad sinérgica con varios antibióticos frente a microorganismos multi-resistentes.

El documento D02 divulga los compuestos encontrados en extractos del género *Cistus*, y su relación con la actividad antibacteriana (frente a *S. aureus*) que presentan dichos extractos. En este documento se indica que el extracto que mayor actividad antibacteriana presentó fue el de *C. salviifolius*, cuyos componentes incluyen, quercetina glucósido, ácido elágico, punicalagina y miricetina, entre otros.

El documento D03 divulga las propiedades antigripales del extracto de granado (*Punica granatum*), en concreto de la fracción fenólica de dicho extracto. En este documento se indica que la punicalagina es el componente que otorga la propiedad antigripal al extracto, y que además, la combinación del extracto de granado con el antibiótico oseltamivir incrementa de forma sinérgica el efecto antigripal del antibiótico.

El documento D04 divulga la acción sinérgica de distintos extractos vegetales (de *Punica granatum*, *Thymus vulgaris*, *Commiphora molmol* y *Achillea fragantissima*) con tetraciclina frente a bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus*, y *Bacillus megaterium*) y gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumonia*).

No se ha encontrado en el estado de la técnica una composición como la reivindicada, aunque sí es conocida la actividad antimicrobiana de los componentes que forman parte de la misma. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos componentes se encuentran divulgados no como compuestos aislados, sino formando parte de extractos vegetales donde, junto con otros compuestos, ejercen su función o actividad antimicrobiana. Para un experto en la materia no resultaría obvio que algunos de los componentes de un extracto, aislados del mismo y mezclados posteriormente en una composición mantengan las propiedades que posee el extracto completo.

Por lo tanto, ninguno de los documentos citados del estado de la técnica, tomados solos o en combinación revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-15. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-15. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-15 es con referencia a los documentos D01-D04 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).