

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 745**

51 Int. Cl.:

A61K 35/644 (2015.01)

A23L 29/275 (2006.01)

A61K 36/45 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2010 PCT/FR2010/050627**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.02.2011 WO11020957**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2010 E 10723183 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2467151**

54 Título: **Composición alimentaria antibacteriana**

30 Prioridad:

21.08.2009 FR 0955738

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.03.2017

73 Titular/es:

**NUTRIVERCELL (100.0%)
Pepiniere Genopole Entreprises 4 rue Pierre
Fontaine, Campus 1
91000 Evry, FR**

72 Inventor/es:

RENARD, LOÏC

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 603 745 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

Composición alimentaria antibacteriana.

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a una composición alimentaria antibacteriana que comprende un extracto de propóleo y un extracto de *Vaccinium macrocarpon*. La invención se refiere más particularmente a una composición alimentaria antibacteriana destinada al tratamiento de infecciones bacterianas agudas o crónicas. La invención se refiere también a la combinación de un extracto de propóleo o de una composición que comprende un extracto de propóleo y un extracto de *Vaccinium macrocarpon*, con algunas clases de antibióticos.
- 10 **[0002]** Las infecciones del tracto urinario son extremadamente frecuentes. Van después de las infecciones respiratorias, siendo el segundo motivo principal de consulta y prescripción de antibióticos. Dichas infecciones son altamente recurrentes, sobre todo en mujeres y portadores de vejiga neurogénica. El agente microbiano responsable de más del 90% de estas infecciones del tracto urinario es *Escherichia coli*, una bacteria comensal del tracto
- 15 digestivo que puede llegar a ser patógena por la adquisición de las islas de patogenicidad.
- [0003]** Su tratamiento mediante terapia convencional y, en particular, mediante el uso de antibióticos, está muy extendido pero sin embargo resulta cada vez menos satisfactorio, dado el aumento de la resistencia de las bacterias a estos agentes antibióticos.
- 20 **[0004]** Para resolver este problema, una solución es reducir la población bacteriana por mecanismos muy diferentes de los antibióticos y que, por lo tanto, actúan independientemente de la resistencia y la virulencia de las bacterias.
- 25 **[0005]** El *Vaccinium macrocarpon* es una planta frutal de la familia del arándano rojo. El extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* es conocido por sus propiedades antiadherentes bacterianas que han sido explotadas en el tratamiento de muchas infecciones del tracto urinario para combatir el crecimiento de bacterias. El consumo del zumo del arándano *Vaccinium macrocarpon* evitaría infecciones del tracto urinario (JP Lavigne, Clin. Microbiol. Infect. 2007, p1-5). La empresa Tournay comercializa bajo el nombre de Exocyan® extractos que se
- 30 caracterizan por su contenido en proantocianidinas (PAC) normalizado a valores del 10% a 50%, dependiendo del método de medición de la Vainillina.
- [0006]** La solicitud de patente EP1902721 describe la combinación de un extracto de *Vaccinium macrocarpon* y un agente antibacteriano urinario contra las bacterias Gram+ y Gram- en una composición destinada a combatir las
- 35 infecciones urinarias y a ser selectiva para no hacer desaparecer la flora bacteriana que normalmente está presente en la uretra.
- [0007]** También se conocen las propiedades bacteriostáticas y bactericidas del propóleo sobre muchas cepas microbianas, y en concreto son conocidas en el caso de *Escherichia coli*.
- 40 **[0008]** Tres suplementos nutricionales para el tratamiento de infecciones del tracto urinario son comercializados bajo los nombres Urimel -por la empresa Famille Marie-, "Biophyto.com Infection Urinaire gênes fréquentes récidivantes" -por la empresa Biophyto.com- y Uriprop -la empresa Laboratoire Lax- y todos ellos incluyen un extracto de arándano asociado al extracto de propóleo, sin dar más detalles.
- 45 **[0009]** Los facultativos carecen hoy en día de información esencial, en primer lugar, sobre el origen de los extractos y de su tratamiento o transformación, que determinan en gran medida la actividad de un suplemento dietético, y, en segundo lugar, sobre el contenido de principios activos esenciales de cada uno de estos extractos. Los facultativos también carecen de información sobre las consecuencias de la asociación de estos extractos. Esta
- 50 falta de información limita el uso que se puede hacer de estos extractos, limitando a su vez el uso de productos mal caracterizados que no concuerden con la regulación de los suplementos alimenticios en vigor.
- [0010]** La invención tiene por objeto proponer suplementos alimenticios caracterizados y reproducibles, para su uso en la práctica diaria, proporcionando al facultativo, al médico, la posibilidad de prescribir un tratamiento de
- 55 tipo suplemento alimenticio, solo o en combinación con un tratamiento terapéutico convencional con el fin de aumentar su eficiencia o de dar con una eficiencia inicial.
- [0011]** Por lo tanto, un primer objeto de la invención es proporcionar una composición que evite los inconvenientes conocidos de la técnica anteriormente mencionada.

[0012] Otro objeto de la invención es proporcionar una composición antibacteriana que mejore la eficacia en el tratamiento y/o la prevención de infecciones bacterianas agudas o crónicas, en particular el tratamiento de infecciones del tracto urinario.

5

[0013] Otro objeto de la invención es proporcionar una composición que permita paliar cualquier déficit de zinc y hierro que puede ocurrir, respectivamente, en hombres y mujeres.

[0014] Otro objeto de la invención es proporcionar una composición que permita mejorar la biodisponibilidad de la vitamina C en las dosis nutricionales evitando así un consumo excesivo de vitamina C.

10

[0015] La presente invención se refiere a una composición alimentaria antibacteriana que comprende un extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* y un extracto de propóleo donde:

15 - El extracto de propóleo comprende ácido cafeico, ácido ferúlico, galangina y pinocebrina,

- El extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* contiene una proporción en peso de proantocianidinas (PAC) mayor que o igual al 10%, preferiblemente mayor que el 10%, ventajosamente entre el 20% y el 50%, dicho porcentaje se mide por el método de dosificación por vainillina,

20

la composición se caracteriza por una relación en peso de extracto de propóleo: extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* de entre 1:2 y 2:1.

[0016] El Propóleo se refiere a una serie de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas, con una consistencia viscosa, recogidas en ciertas partes, incluidos los brotes y la corteza de las plantas, por las abejas, que las llevan a la colmena y las modifican, en parte, añadiendo sus propias secreciones salivales y cera. Estas plantas son principalmente árboles como el pino, el abeto, la píce, el álamo, el aliso, el sauce, el castaño de indias, el abedul, el ciruelo, el fresno, el roble o el olmo.

25

[0017] Por extracto de propóleo, se entiende una forma de propóleo que puede ser implementada. Por lo tanto, puede estar sin transformar o tratar, o bien transformado mediante un excipiente adecuado, por ejemplo la goma de algarrobo, el almidón o un derivado del almidón, como la maltodextrina, por ejemplo. El propóleo puede tener forma de polvo. Para ello, el propóleo se puede mezclar con una solución hidroalcohólica a la cual se añadirá un excipiente, como la maltodextrina o el polvo de algarrobo, como vehículo. La mezcla resultante se evapora y después se seca. El extracto de propóleo que comprende un 18% de propóleo y un 82% de polvo de algarrobo es comercializado bajo el nombre de propóleo PPM 18 por la sociedad LUSTREL. Otro ejemplo de extracto de propóleo que comprende un 60% de propóleo y un 40% de algarrobo es comercializado por Claudine Vallée.

30

35

[0018] En una forma de realización preferida, el contenido en peso de extracto de propóleo en la composición de acuerdo con la invención es de entre el 10% y el 80%, preferiblemente de entre el 30% y el 70%.

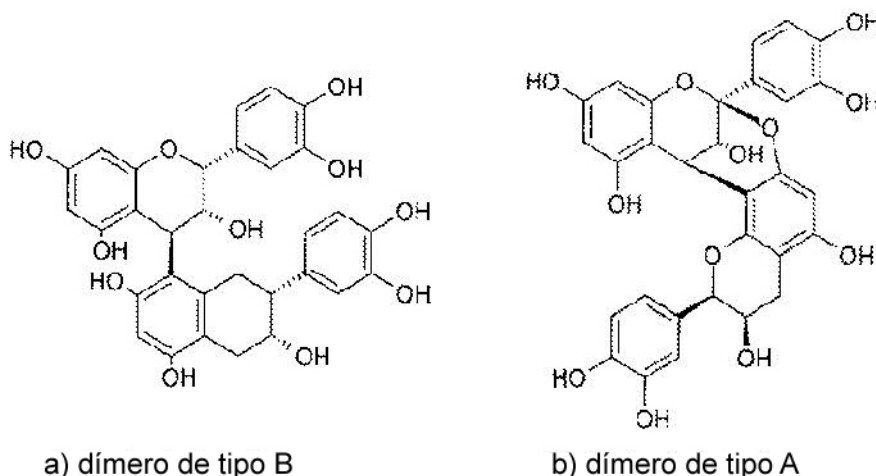
40

[0019] El extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* se obtiene preferentemente mediante un procedimiento de concentración del total de las fracciones polifenólicas del zumo de arándano *Vaccinium macrocarpon*.

45

[0020] El zumo de arándano *Vaccinium macrocarpon* se obtiene de un fruto que se cultiva principalmente en el norte de Estados Unidos y Canadá. Este zumo de color rojo oscuro y sabor astringente es rico en polifenoles y sobre todo en proantocianidinas en forma libre glicosilada (galactósido, ramnósido, glucósido) o esterificada (galato) como por ejemplo la prodelphinidina, la propetunidina, la promalvidina o la procianidina. Estos compuestos existen, en general, en forma polimerizada (dímeros a hexámeros) y tienen una secuencia de tipo A o tipo B según los dos siguientes diagramas, correspondientes a las estructuras de un dímero de tipo B y de un dímero de tipo A:

50



[0021] El proceso de concentración y aislamiento de fracciones polifenólicas del zumo del arándano *Vaccinium macrocarpon* consiste, en particular, en eliminar las sustancias inertes tales como fibra, azúcares y ácidos de frutas del zumo del arándano *Vaccinium macrocarpon* por cromatografía en resina de intercambio iónico. Este método fija los polifenoles y por lo tanto deja sin adsorber todas las sustancias inertes presentes en el zumo.

[0022] La resina de intercambio iónico es preferentemente una resina polimérica no iónica tal como la resina vendida bajo el nombre HP Amberlite® XAD 16 por Rohm & Haas. Esta última consiste en un copolímero de estireno/divinilbenceno reticulado alifático y se presenta en forma de bolas blancas translúcidas que retienen la humedad (62%-70%). Tiene una superficie específica de 800 m²/g, y una porosidad de ≤ 0,55 ml/ml. Este tipo de resina es neutral y es adecuado para cualquier rango de pH. El tamaño del volumen de poro es de aproximadamente 1.082 ml/g y el tamaño medio de los poros es de aproximadamente 100 Å.

[0023] También se pueden utilizar otras resinas tales como Amberlite XAD 4 de resina, Amberlite XAD 16 o Amberlite XAD 2 comercializadas por la empresa Rohm & Haas.

[0024] A continuación se procede a una elución de los polifenoles. El etanol permite eluir los polifenoles progresivamente sin alterarlos y se recupera el eluato hasta la desaparición del color violeta en el eluato. Preferiblemente se lleva a cabo una dosificación de polifenoles en el eluato para garantizar que todos los polifenoles se han eluido.

[0025] Según una forma de realización particular del procedimiento, el enjuague de la columna se lleva a cabo con agua para eliminar los compuestos no retenidos por la resina. El enjuague de la columna se detiene cuando el contenido de materia seca en el eluato es inferior al 1%.

[0026] El eluato puede someterse a liofilización o atomización obteniendo de este modo un extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* en forma de polvo.

[0027] La proporción de proantocianidinas (PAC) del extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* se mide por el método de ensayo por la vainillina.

[0028] El principio de este ensayo se basa en la unión del aldehído de la vainillina al carbono 6 del anillo A de la catequina para formar un complejo cromóforo rojo que absorbe a 500 nm. La vainillina reacciona con los monómeros de catequina y las unidades terminales PAC pero no reacciona con las unidades intermedias PAC dado que su carbono 6 sitio de unión de la vainillina está en la unión monómero-monómero (C4 C6).

[0029] Se pesan x mg de extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* (alrededor de 20 mg para un polvo o 50 mg para un líquido) que se diluyen en 100 ml de agua de pH 2 (el pH se ajusta con ácido clorhídrico (HCl) al 37% usando un medidor de pH). 1 ml de solución de extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* se introduce en un tubo de 15 ml con tapón de prueba esmerilado. Para este volumen se añaden sucesivamente entre 3 y 12 ml de

reactivo vaníllico que comprenden un 4% de vainillina en metanol y entre 3 y 12 ml de ácido clorhídrico concentrado al 37% (HCl) (Burns 1971). La solución obtenida se agita durante 20 min a 30 °C al baño María. Después de 20 min, la absorbancia A a 500 nm de la solución, utilizando como líquido de compensación una solución idéntica a la solución cuya una absorbancia A se mide y en la que el reactivo vaníllico se sustituye por metanol puro. Se prepara una gama estándar utilizando catequina. Para ello, se preparan 3 soluciones de catequina pesando, respectivamente, 5 mg, 10 mg y 15 mg que se introducen en un matraz graduado de 100 ml de metanol, cada una de estas tres soluciones es estable durante un día. La dosificación estándar se lleva a cabo en 1 ml de cada solución en el rango estándar procediendo de la misma manera que para la muestra. El contenido total de proantocianidinas expresadas en catequina equivalente a 100 g de extracto en polvo de arándano *Vaccinium macrocarpon* se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{proantocianidinas}] \% = \frac{100 \times [\text{eq. catequina}]}{\frac{x}{0,1}}$$

Siendo:

- 15
- [proantocianidinas] el contenido en proantocianidinas,
 - [eq.catequina] obtenido mediante la determinación de la ecuación de la curva de absorción a 500 nm de la solución que comprende el extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* por regresión lineal,
 - x: masa del extracto del arándano *Vaccinium macrocarpon*

20 **[0030]** Un extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* con un 20% de CAP también se comercializa bajo el nombre Exocyan CRAN 20S por la empresa Tournay Biotechnologies.

25 **[0031]** En una forma de realización particular, el contenido en peso del extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* en la composición según la invención es de entre 10% y 80%, preferiblemente de entre 25% y 70%.

[0032] En otra forma de realización, la composición según la invención también comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en agentes farmacéuticos, ingredientes alimentarios y nutrientes.

30 **[0033]** En una forma de realización preferida, el ingrediente alimenticio se selecciona del grupo que consiste de zinc y sus derivados.

[0034] En una forma de realización preferida, los derivados de zinc se seleccionan de sales de zinc tales como citrato de zinc, óxido de zinc, sulfato de zinc, acetato de zinc o gluconato de zinc.

35 **[0035]** En una forma de realización preferida, el contenido de zinc en peso o de uno de los derivados del mismo en la composición según la invención es de entre 0,01% y 2%, preferiblemente de entre 0,1% y 1,5%.

40 **[0036]** En otra forma de realización preferida, el ingrediente alimenticio se selecciona de entre el grupo que consiste en hierro y sus derivados.

[0037] En una forma de realización preferida, los compuestos de hierro se seleccionan de sales de hierro tales como sulfato de hierro, lactato de hierro, gluconato de hierro, cloruro de hierro o fumarato de hierro.

45 **[0038]** En una forma de realización preferida, el contenido en peso de hierro o de un derivado del mismo en la composición según la invención es de entre 0,05% y 3%, preferiblemente de entre 0,5% y 2,5%.

[0039] En otra forma de realización, el ingrediente alimenticio se selecciona del grupo que consiste en ácido ascórbico comúnmente denominado vitamina C y sus derivados.

50 **[0040]** En una forma de realización preferida, los derivados de la vitamina C se seleccionan de sales de ácido ascórbico, tales como ascorbato de calcio, ascorbato de magnesio, ascorbato de potasio o ascorbato de sodio.

[0041] En una forma de realización preferida, la sal de ácido ascórbico es ascorbato de calcio.

55 **[0042]** En una forma de realización preferida, el contenido en peso de vitamina C o de un derivado de la

misma en la composición según la invención es de entre 1% y 10%, preferiblemente de entre 2% y 8%.

[0043] Los contenidos en peso en la composición según la invención de zinc y sus derivados, de hierro y sus derivados y de vitamina C y sus derivados respetan las cantidades diarias recomendadas para cada uno de ellos. La 5 composición según la invención caracterizada por estos contenidos en peso puede representar entre el 50% y el 85% de la cantidad diaria recomendada de zinc, de hierro o de vitamina C.

[0044] La composición según la invención puede comprender además un excipiente o un vehículo inerte, no tóxico. Se pueden citar como excipientes inertes azúcares tales como lactosa o fructosa, celulosa, carbonato de 10 calcio, fosfato tricálcico, fosfato de magnesio, estearato de calcio, estearato de magnesio, talco o sílice coloidal (Aerosil (R) 100 o Aerosil (R) 200 comercializada por Degussa). Como vehículos, también se pueden citar compuestos que favorecen la excreción urinaria como, por ejemplo, extracto de Fumaria o extracto de Orthosiphon.

[0045] La composición de acuerdo con la invención también puede comprender un compuesto seleccionado 15 del grupo que consta de polioles tales como glicerina o sorbitol, colorantes, edulcorantes, tales como la sucralosa o activos aromáticos tales como los aromas de frutas.

[0046] La composición según la invención se presenta en forma sólida o líquida.

20 **[0047]** En una forma de realización particular, la composición según la invención se presenta en forma de polvo, cápsulas de gel, cápsulas, goma de mascar, gránulos, grajeas, píldoras, pastillas, comprimidos o tabletas. La implementación de dosificación se lleva a cabo en condiciones de temperatura y presión que mantienen la integridad de los ingredientes utilizados y la bioactividad de los ingredientes activos.

25 **[0048]** Las composiciones de la invención están destinadas principalmente a desarrollar un efecto fisiológico beneficioso en personas que padecen o son propensas a las infecciones bacterianas, así como en aquellos con bacteriuria asintomática o que presentan riesgo de bacteriuria asintomática, particularmente las mujeres embarazadas, las mujeres de edad avanzada, los hombres con adenoma de próstata, las personas con 30 discapacidad o las personas que han pasado por un procedimiento de diagnóstico médico o por una intervención quirúrgica. Este efecto fisiológico tiene un efecto favorable, previniendo y/o limitando estas infecciones o estas bacteriurias. Los efectos fisiológicos más importantes son la inhibición del crecimiento bacteriano, un efecto bactericida o efecto bacteriostático, una disminución de la adhesión de bacterias, particularmente enterobacterias.

[0049] En una forma de realización de la invención, la composición tiene un efecto llamado "bacterioflush". 35 Efecto "bacterioflush" o efecto "flush" es aquel en virtud del cual las bacterias son eliminadas del cuerpo por vías naturales.

[0050] Las composiciones de la invención son particularmente útiles en personas con infecciones de la vejiga o del tracto urinario, por ejemplo, las mujeres en situación de riesgo o que hayan padecido cistitis, especialmente las 40 embarazadas, los hombres que padecen adenoma benigno de próstata, en particular los mayores de 50 años, y las personas con infecciones bucales, gástricas y/o respiratorias o personas que padecen estasis urinaria, especialmente los ancianos o los discapacitados.

[0051] El efecto antiadherente es particularmente interesante para intervenir a tiempo durante la infección y 45 reducir la carga bacteriana mediante la eliminación de las bacterias, o para reducir el riesgo de desarrollo de infecciones en el sujeto sensible. La composición también puede tener un efecto de reducción de la virulencia de las bacterias en *P. pili*, por la reducción de la expresión de estos *pili*.

[0052] En una forma de realización particular, la composición según la invención reduce la expresión de 50 genes de virulencia de cepas bacterianas uropatógenas y por lo tanto reducir la virulencia de estas cepas. Por ejemplo, la composición según la invención reduce la expresión del gen *papG3*.

[0053] Un segundo objeto de la presente solicitud por lo tanto se refiere al uso de una composición según la 55 invención para reducir la expresión de genes de virulencia bacteriana en *P pili*, en particular bacterias uropatógenas, especialmente *Escherichia Coli*.

[0054] La composición de acuerdo con la invención se caracteriza especialmente por un efecto antiadherente que se mantiene con el tiempo, hasta 24 horas. Una explicación de este efecto es la potenciación del efecto antiadherente de los PAC presentes en el extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* con el extracto de extracto

de propóleo.

- [0055]** La descripción también se refiere a una composición que comprende un extracto de propóleo y un extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon*, para uso simultáneo, separado o extendido en el tiempo, para el tratamiento y/o la prevención de infecciones bacterianas agudas o crónicas o de bacteriuria asintomática, sobre todo las infecciones de vejiga o las infecciones del tracto urinario
- [0056]** La descripción también se refiere al uso en un método de tratamiento que comprende la administración separada, simultánea o escalonada en el tiempo, por vía oral en un mamífero, concretamente un ser humano, una composición que comprende un extracto de propóleo y una composición que comprende un extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon*, para el tratamiento y/o la prevención de infecciones bacterianas agudas o crónicas o de bacteriuria asintomática, sobre todo las infecciones de vejiga o las infecciones del tracto urinario.
- [0057]** La divulgación prevé también el uso de una composición que comprende un extracto de propóleo que precede, complementa y/o sigue al uso de una composición que comprende un extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon*.
- [0058]** Dependiendo de la dosis, las composiciones también pueden tener un efecto farmacológico.
- [0059]** Un tercer objeto de la presente solicitud se refiere a un suplemento dietético o un medicamento que comprende una composición de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones bacterianas agudas o crónicas o de bacteriuria asintomática.
- [0060]** En una forma de realización preferida, el suplemento alimenticio o medicamento de acuerdo con la invención está destinado al tratamiento y/o la prevención de infecciones de vejiga y de infecciones del tracto urinario.
- [0061]** En otra forma de realización preferida, el suplemento alimenticio o medicamento de acuerdo con la invención está destinado al tratamiento y/o la prevención de infecciones bucales, gástricas o respiratorias.
- [0062]** En otra forma de realización preferida, el suplemento alimenticio o el medicamento de la invención está destinado al tratamiento y/o la prevención de infecciones de vejiga o infecciones del tracto urinario asociadas a una posible deficiencia de zinc en el hombre, especialmente en el hombre de más de cincuenta años, sobre todo en los hombres que padecen adenoma benigno de próstata.
- [0063]** En otra forma de realización preferida, el suplemento alimenticio o el medicamento de la invención está destinado al tratamiento y/o la prevención de infecciones de vejiga o infecciones del tracto urinario asociadas a una posible deficiencia de hierro en las mujeres, en particular en mujeres en situación de riesgo o que hayan padecido cistitis, especialmente en mujeres embarazadas.
- [0064]** En otra forma de realización preferida, el suplemento alimenticio o el medicamento de la invención está destinado al tratamiento y/o la prevención de estasis urinaria en las personas mayores o discapacitadas.
- [0065]** En otra forma de realización preferida, el suplemento alimenticio o el medicamento de la invención está destinado al tratamiento y/o la prevención de infecciones bacterianas agudas o crónicas y el fortalecimiento del sistema inmunitario.
- [0066]** Un cuarto objeto de la presente descripción se refiere a métodos de tratamiento que comprenden la administración oral a un mamífero, en particular un ser humano, de una composición de acuerdo con la invención para el tratamiento y/o la prevención de infecciones bacterianas agudas o crónicas o de bacteriuria asintomática.
- [0067]** El método de tratamiento comprende la administración por vía oral de una composición de acuerdo con la invención para el tratamiento y/o la prevención de infecciones de vejiga y de infecciones del tracto urinario.
- [0068]** El método de tratamiento comprende la administración por vía oral de una composición de acuerdo con la invención para el tratamiento y/o la prevención de infecciones bucales, gástricas o respiratorias.
- [0069]** El método de tratamiento comprende la administración oral de una composición según la invención para el tratamiento y/o la prevención de infecciones urinarias o de la vejiga asociadas a una posible deficiencia de zinc en hombres, en particular en hombres más de cincuenta años, sobre todo en los que padecen adenoma

benigno de próstata.

5 **[0070]** El método de tratamiento comprende la administración oral de una composición según la invención para el tratamiento y/o la prevención de infecciones urinarias o de la vejiga asociadas a una posible deficiencia de hierro en mujeres, especialmente en mujeres en riesgo o que hayan padecido cistitis, especialmente en mujeres embarazadas.

10 **[0071]** El método de tratamiento comprende la administración oral de una composición según la invención para el tratamiento y/o la prevención de estasis urinaria en las personas mayores o discapacitadas.

[0072] El método de tratamiento comprende la administración por vía oral de una composición de acuerdo con la invención para el tratamiento y/o la prevención de infecciones bacterianas agudas o crónicas y el fortalecimiento del sistema inmunitario.

15 **[0073]** Este tratamiento se puede asociar con un tratamiento terapéutico antibacteriano, incluyendo la administración de un antibiótico, tal como la ofloxacina (fluoroquinolona), ceftriaxona y cefixima (cefalosporina), la β -lactama y la nitrofurantina. Por tanto, la descripción se refiere a la utilización de la composición según la invención para preceder, complementar y/o seguir un tratamiento terapéutico antibacteriano. Esto significa que el médico prescribe al paciente que necesita consumir el suplemento dietético o el medicamento de la invención el tratamiento
20 antes, durante y/o después de un tratamiento antibacteriano, por ejemplo antibiótico.

[0074] La invención también se refiere a un flash de dicho tratamiento que consiste en participar en la eliminación de gérmenes resistentes a los ATB (antibióticos) y en reducir significativamente la población bacteriana por un efecto Flush (efecto de lavado). Las bacterias se eliminan por vías naturales y la expresión filogenética del
25 sistema de adhesión y, más particularmente, la expresión de la virulencia de las Pili de tipo P se reduce.

[0075] Se administra una dosis diaria eficaz de la composición según la invención. Por dosis diaria eficaz se entiende una dosis de la composición según la invención consumida durante un período de 24 horas.

30 **[0076]** Para la dosis diaria eficaz se entiende una cantidad de composición según la invención que comprende entre 300 y 1.200 mg de extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* y entre 400 y 2.000 mg de extracto de propóleo.

35 **[0077]** La invención se refiere además a una composición que comprende un extracto de propóleo y un extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* y un ingrediente activo farmacéutico, por ejemplo antibacteriano, antibiótico, antioxidante tal como vitamina C y sus derivados, o un ingrediente alimentario, tal como zinc, hierro y sus derivados, o un nutriente, para uso simultáneo, separado o extendido en el tiempo.

40 **[0078]** Otro objeto de la presente solicitud se refiere a un kit que comprende

- una primera composición que comprende un extracto propóleo y un extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon*, de acuerdo con la invención
- una segunda composición que comprende un ingrediente farmacéutico activo, por ejemplo, antibacteriano, antibiótico, antioxidante tal como vitamina C y sus derivados, o un ingrediente alimentario, tal como zinc, hierro y sus
45 derivados, o un nutriente.

[0079] Las diversas características presentadas para el extracto de propóleo y el extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* se aplican también al kit de la invención mencionado anteriormente.

50 **[0080]** Las diversas características que se presentan para el zinc y sus derivados, el hierro y sus derivados y la vitamina C y sus derivados se aplican también al kit de acuerdo con la invención mencionado anteriormente.

[0081] En el contexto de la asociación de la composición de acuerdo con la invención con diferentes antibióticos, se ha encontrado un efecto sinérgico del propóleo en ausencia de arándano *Vaccinium macrocarpon*
55 con ciertas clases de antibióticos, y en particular con los utilizados en la patología urinaria. Esta sinergia mejora la actividad antibacteriana del antibiótico, sin tener que aumentar la cantidad administrada.

[0082] Esta sinergia permite limitar o reducir, en el caso de un tratamiento terapéutico antibacteriano y, en particular, en el caso de tratamiento de infecciones del tracto urinario, la dosis de antibiótico administrada y la

frecuencia de administración al paciente. Reduce el riesgo de desarrollo de resistencia a los antibióticos en el paciente.

5 [0083] En el sentido de la invención, "simultáneo" significa que los dos activos son administrados por la misma ruta al mismo tiempo (por ejemplo, que son mixtos), "independiente" significa que se administran por vías diferentes o en diferentes lugares y "extendido en el tiempo" significa que se administran por separado en diferentes momentos.

10 [0084] Las diversas características presentadas por el extracto de propóleo también se aplican a la invención mencionada anteriormente.

[0085] En la presente invención, siempre que se habla de antibiótico esto significa cualquier agente antibiótico que puede seleccionarse de entre todas las clases conocidas de antibióticos, especialmente de entre las clases de antibióticos que se usan en la patología urinaria, y para los cuales la asociación al propóleo y al arándano 15 *Vaccinium macrocarpon* es útil. Ventajosamente se incluyen las cefalosporinas y en particular las cefalosporinas de tercera generación como ceftriaxona o cefixima y las fluoroquinolonas tales como ofloxacina. También podemos mencionar las β -lactaminas y la nitrofuradantina.

20 [0086] Las diversas características presentadas en lo tocante a las formas que pueden tomar la composición y los compuestos adicionales también se aplican a la divulgación.

[0087] Otro objeto de la divulgación es una composición de este tipo para el tratamiento y/o la prevención de infecciones bacterianas agudas o crónicas o de bacteriuria asintomática, incluyendo las infecciones de vejiga o las infecciones del tracto urinario.

25 [0088] Otro objeto de la descripción es un método de tratamiento antibacteriano que comprende administrar a un mamífero, incluyendo un ser humano, una composición de este tipo para el tratamiento y/o la prevención de infecciones bacterianas agudas o crónicas o de bacteriuria asintomática, y en particular infecciones de vejiga o infecciones del tracto urinario.

30 [0089] Por tanto, la divulgación se refiere al uso de una composición que comprende un extracto de propóleo que precede, complementa y/o sigue al tratamiento con antibióticos. Esto significa que el médico prescribe el paciente que necesita consumir la composición que comprende el extracto de propóleo el tratamiento antes, durante y/o después del tratamiento con antibióticos.

35 [0090] Las diversas características presentes para el extracto de propóleo y el agente antibiótico y las relativas a las posibles formas de la composición también se aplican a la descripción antes citada.

[0091] Las presentes invenciones y sus diversas formas de realización se comprenderán mejor con la lectura 40 de los ejemplos que siguen. Estos ejemplos son indicativos, sin carácter limitativo.

La figura 1 muestra la cantidad de pinocembrina y galangina presente en el extracto de propóleo medidos en la orina humana tras un régimen de 6 y 8 cápsulas que comprenden una composición de acuerdo con la invención.

45 La figura 2 muestra el efecto de una composición de acuerdo con la invención sobre la expresión del gen *papG3* de una cepa uropatógena de *E.coli*.

La figura 3 muestra una curva de letalidad del propóleo y la ceftriaxona.

50 La figura 4 muestra una curva de letalidad del propóleo y la cefixima.

Ejemplo 1: Producción de un extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon*:

[0092] Un extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* que comprende al menos un 20% de CAP se 55 obtiene de acuerdo con el Ejemplo 1 de la solicitud de patente EP 1.913.951.

Ejemplo 2: Producción de un extracto de propóleo:

[0093] Después de recoger el propóleo en bruto, este se somete a un tratamiento para eliminar la cera, la

madera o los restos de insectos. Esta etapa de purificación se lleva a cabo en particular mediante la limpieza con disolventes apropiados, tales como el alcohol. Entonces, el propóleo purificado de este modo se pone en solución acuosa-alcohólica, se filtra y se evapora y seca a continuación. A continuación, se muelen y se mezclan con polvo de algarroba como vehículo. El extracto de propóleo así obtenido tiene forma de un polvo micronizado de color beige que contiene un 18% de material activo.

Ejemplo 3: cápsulas de gel

[0094]

10

- Extracto de arándano <i>Vaccinium macrocarpon</i> ⁽¹⁾	0,150 g
- Extracto de propóleo ⁽²⁾	0,250 g
<hr/>	
(1) Exocyan CRAN 20S comercializado por Tournay Biotechnologies	
(2) propóleo 18 PPM vendido por Lustrel	

[0095] La composición de acuerdo con el Ejemplo 3 se encuentra en forma de polvo y se envasa en cápsulas de gel.

15 **Ejemplo 4: bolsita de polvo.**

[0096]

- Extracto de arándano <i>Vaccinium macrocarpon</i> ⁽¹⁾	0,3 g
- Extracto de propóleo ⁽²⁾	0,5 g
- Vitamina C	0,060 g
<hr/>	
(1) Exocyan CRAN 20S comercializado por Tournay Biotechnologies	
(2) propóleo 18 PPM vendido por Lustrel	

20 [0097] El polvo se envasa en bolsitas y la dosis de uso es de 2 a 4 bolsitas diarias durante 2 a 7 días.

[0098] El polvo también puede envasarse en cápsulas y la dosis de uso es de 2 a 4 cápsulas al día durante 2 a 7 días, que puede repetirse si fuera necesario.

25 **Ejemplo 5: cápsulas de gel.**

[0099]

- Extracto de arándano <i>Vaccinium macrocarpon</i> ⁽¹⁾	0,150 g
- Extracto de propóleo ⁽²⁾	0,250 g
- Vitamina C	0,030g
<hr/>	
(1) Exocyan CRAN 20S comercializado por Tournay Biotechnologies	
(2) propóleo 18 PPM vendido por Lustrel	

30 [0100] La composición de acuerdo con el Ejemplo 5 se presenta en forma de polvo y se envasa en cápsulas de gel y la dosis de uso es de 2 a 4 cápsulas al día durante el periodo de riesgo, y se puede repetir si fuera necesario.

35 **Ejemplos 6 y 7: las composiciones para el tratamiento y/o la prevención de infecciones de vejiga y de la deficiencia de zinc en el hombre**

[0101]

	Ejemplo 6	Ejemplo 7
Extracto de arándano <i>Vaccinium macrocarpon</i> ⁽¹⁾	0,3 g	0,150 g
Extracto de propóleo ⁽²⁾	0,5 g	0,250 g
Glicerina	cs	cs
Fructosa	cs	cs
Lactosa	cs	cs

Sulfato de zinc	0,0055 g	0,0055 g
Aroma de frutos rojos	cs	cs
(1) Exocyan CRAN 20S comercializado por Tournay Biotechnologies		
(2) propóleo 18 PPM vendido por Lustrel		

[0102] La composición según el Ejemplo 6 tiene forma de polvo y se envasa en bolsitas o cápsulas de gel.

[0103] La dosificación para su uso en bolsitas es de 2 a 4 bolsitas diarias durante 2 a 7 días.

5

[0104] El uso de dosis en cápsulas de gel es de 2 a 4 cápsulas al día, se puede repetir si fuera necesario.

[0105] La composición de acuerdo con el Ejemplo 7 se encuentra en forma de polvo y se envasa en cápsulas de gel.

10

[0106] La posología de utilización en tratamiento flash es de 4 a 8 cápsulas de gel durante un período máximo de una semana.

[0107] La dosis de uso en tratamiento preventivo es de 2 a 4 cápsulas durante un período de 15 días, que se puede repetir si fuera necesario.

15

Ejemplos 8 y 9: composiciones para el tratamiento y/o la prevención de infecciones del tracto urinario y la deficiencia de hierro en mujeres

20 **[0108]**

	Ejemplo 8	Ejemplo 9
Extracto de arándano <i>Vaccinium macrocarpon</i> ⁽¹⁾	0,3 g	0,150 g
Extracto de propóleo ⁽²⁾	0,5 g	0,250 g
Glicerina	cs	cs
Fructosa	cs	cs
Lactosa	cs	cs
Sulfato de hierro	0,00914g	0,00914 g
Aroma de frutos rojos	cs	cs
(1) Exocyan CRAN 20S comercializado por Tournay Biotechnologies		
(2) propóleo 18 PPM vendido por Lustrel		

[0109] La composición según el Ejemplo 8 tiene forma de polvo y se envasa en bolsitas o cápsulas de gel.

25 **[0110]** La dosificación para su uso en bolsitas es de 2 a 4 bolsitas diarias durante 2 a 7 días.

[0111] El uso de dosis en cápsulas de gel es de 2 a 4 cápsulas al día, se puede repetir si fuera necesario.

[0112] La composición de acuerdo con el Ejemplo 9 se encuentra en forma de polvo y se envasa en cápsulas de gel.

30

[0113] La posología de utilización en tratamiento flash es de 4 a 8 cápsulas de gel durante un período máximo de una semana.

35 **[0114]** La dosis de uso en tratamiento preventivo es de 2 a 4 cápsulas durante un período de 15 días, que se puede repetir si fuera necesario.

Ejemplos 10 y 11: cápsulas de gel

40 **[0115]**

	Ejemplo 10	Ejemplo 11
Extracto de arándano <i>Vaccinium macrocarpon</i> ⁽¹⁾	0,150 g	0,150 g
Extracto de propóleo ⁽²⁾	0,100 g	0,100 g

Celulosa (sobre)	CS	CS
Carbonato de calcio	CS	CS
Estearato de magnesio	CS	CS
Etil-vainillina	CS	CS
Sulfato de zinc	0,00125 g	
Sulfato de hierro		0,00125 g
Aromas de mentol	CS	CS
(1) Exocyan CRAN 20S comercializado por Tournay Biotechnologies		
(2) Extracto de propóleo al 60% de propóleo puros vendido por Claudine Valle		

[0116] La dosis de uso de la composición según el ejemplo 10 es de 4 cápsulas de gel por día durante 5 a 10 días de uso de ataque y 2 cápsulas por día durante 10 días en el mantenimiento que debe repetirse con regularidad.

5 [0117] La dosis de uso de la composición según el ejemplo 11 es de 4 cápsulas de gel por día durante 5 a 10 días de uso de ataque y 2 cápsulas por día durante 10 días en el mantenimiento que debe repetirse con regularidad.

Ejemplo 12: cuantificación de polifenoles propóleo en la orina humana después de la ingestión de una composición de acuerdo con la invención

10

[0118] Dos voluntarios sanos mayores de 18 años, con una anticoncepción eficaz y una dieta normal han seguido un régimen con ingestión de las cápsulas de acuerdo con la composición del Ejemplo 3.

[0119] Se siguieron dos regímenes:

15

- toma de 6 cápsulas,
- toma de 8 cápsulas.

[0120] La toma de las cápsulas se llevó a cabo por la mañana a las 8 am y la orina se recogió por micción en un frasco estéril antes de la ingestión, entre 1 y 6 horas después de la ingestión, 12 horas después de la ingestión y 24 horas después de la ingestión.

[0121] La orina recogida se hidrolizó mediante hidrólisis enzimática (glucuronidasa y sulfatasa) y los polifenoles se extrajeron y se purificaron en Sep-Pack.

25

[0122] A continuación se procedió a caracterizar y dosificar los polifenoles del propóleo como la pinocembrina y la galangina.

[0123] Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación y en la Figura 1.

30

Tabla 1

	1h-6h (6 cápsulas)	12h (6 cápsulas)	24h (6 cápsulas)	24h (8 cápsulas)
Pinocembrina (P) en mg/l	3,344	1,141	0,407	1,368
Galangina (G) en mg/l	0,555	0,291	0,157	0,311

[0124] Estos resultados muestran que la acción del propóleo presente en la composición según la invención tiene realmente lugar en el sistema urinario humano, lo que demuestra la importancia de la utilización de la composición según la invención para dirigir el tratamiento de enfermedades urinarias.

35

Ejemplo 13: estudio del efecto antiadherente de una composición de acuerdo con la invención

[0125] Cuatro voluntarios sanos mayores de 18 años, con un método anticonceptivo eficaz, después de haber seguido una dieta normal y que no habían recibido tratamiento con antibióticos en las dos semanas anteriores y durante todo el estudio siguieron una dieta que incluía cápsulas que ingirieron de acuerdo con la composición del ejemplo 3.

[0126] Se siguieron dos regímenes:

45

- toma de 4 cápsulas por 2 voluntarios,

- toma de 6 cápsulas por otros 2 voluntarios.

[0127] La toma de cápsulas se llevó a cabo por la mañana a las 8 y la orina se recogió por micción en un frasco estéril antes de su ingestión, de 1h a 6h después de la ingestión, 12 horas después de la ingestión por parte de los dos voluntarios que habían ingerido 6 cápsulas y 24 horas después de la ingestión.

[0128] Por lo tanto, los 2 voluntarios que habían tomado cuatro cápsulas tenían 3 muestras de orina (H0, H1-6 y H24) o 6 para analizar la orina para este régimen. Si había diferentes muestras de orina (entre 1 y 6 horas después de la toma de la dosificación), estas se mezclaban en el mismo vial.

10

[0129] Los dos voluntarios que tomaron 6 cápsulas por lo tanto tenían cuatro muestras de orina (H0, H1-6, H12 y H24), u 8 muestras para analizar para este régimen. Si había diferentes muestras de orina (entre 1 y 6 horas después de la toma de la dosificación), estas se mezclaban en el mismo vial.

15 **[0130]** Se determinaron diferentes parámetros biológicos y físico-químicas de las muestras de orina utilizando el sistema de Multistix. Una gran cantidad de leucocitos y/o glóbulos rojos y/o nitritos positivos habrían impulsado la exclusión de la muestra de orina. Estas muestras se refrigeraron a continuación a +4 °C, luego se centrifugaron a 4000g durante 15 minutos a +4 °C y después se almacenaron inmediatamente a 20 °C.

20 **[0131]** Se seleccionó una cepa de *E. coli* uropatógena previamente aislada de la orina de un paciente con una infección del tracto urinario: NECS19923 con fimbrias tipo P (*papG*) y pili de tipo 1. Esta cepa se modificó previamente genéticamente mediante la inserción de un plásmido que lleva el gen que codifica GFP (proteína de fluorescencia verde).

25 **[0132]** los estudios de adhesión se realizaron en líneas de células uroteliales de tipo T24 de origen humano (ATCC HTB-4) adaptadas de Di Martino et al. Las bacterias se pusieron en presencia de la orina de los voluntarios sanos en un medio de cultivo que contenía un 5% de *Luria Bertani* (5% (v/v)) durante la noche a 37 °C con agitación. Las bacterias se centrifugaron después y se resuspendieron en una concentración de 108 UFC/ml en un medio de McCoy y luego se pusieron en contacto con una monocapa de células uroteliales T24 y se incubaron durante 30 horas a 37 ° C. Tras 6 lavados con PBS (Tampón fosfato salino), las células se fijaron con metanol. Los portaobjetos se examinaron bajo un microscopio de fluorescencia, las bacterias se visualizaron después en verde. El número medio de bacterias adheridas por célula se determinó mediante el examen de 100 células uroteliales y representa un índice de adhesión. Este índice se expresa como la media de 4 pruebas independientes.

35 **[0133]** Los resultados se resumen en la tabla 2 que aparece a continuación

Tabla 2

	Al mediana [intervalo]			
	1 voluntario (4 cápsulas)	2 voluntarios (4 cápsulas)	3 voluntarios (6 cápsulas)	4 voluntarios (6 cápsulas)
0h	20,4 [16-26]	18,6 [15-28]	23,0 [14-28]	21,2 [15-25]
1h-6h	3,7 [2-10]	2,1 [1-9]	3,0 [0-5]	3,1 [0-4]
12h			2,1 [0-5]	2,2 [0-5]
24h	17,7 [14-22]	15,8 [11-18]	16,9 [12-21]	19,1 [10-25]

40 **[0134]** Estos resultados muestran que la composición de la invención tiene una actividad antiadherente contra *E.Coli* "inmediata", pero esta actividad se mantiene con el tiempo, hasta 24 horas.

Ejemplo 14: estudio ex vivo del efecto de una composición de acuerdo con la invención sobre la virulencia de una cepa de *E.coli* uropatógena

45 **[0135]** Dos voluntarios sanos mayores de 18 años, con un método anticonceptivo eficaz, después de haber seguido una dieta normal y que no habían recibido tratamiento con antibióticos en las dos semanas anteriores y durante todo el estudio siguieron un régimen que incluye cápsulas que ingirieron de acuerdo con la composición del ejemplo 3.

50 **[0136]** Se siguieron tres regímenes:

- toma de 4 cápsulas,

- toma de 6 cápsulas,
- toma de 8 cápsulas.

[0137] La toma de las cápsulas se llevó a cabo por la mañana a las 8 am y la orina se recogió por micción en un frasco estéril antes de la ingestión, entre 1 y 6 horas después de la ingestión, 12 horas después de la ingestión y 24 horas después de la ingestión.

[0138] Los 2 voluntarios tenían por lo tanto 4 muestras de orina (H0, H1-6, H12 y H24), u 8 muestras de orina para analizar por este régimen. Si había diferentes muestras de orina (entre 1 y 6 horas después de la toma de la dosificación), estas se mezclaban en el mismo vial.

[0139] Se determinaron diferentes parámetros biológicos y físico-químicas de las muestras de orina utilizando el sistema de Multistix. Una gran cantidad de leucocitos y/o glóbulos rojos y/o nitritos positivos habrían impulsado la exclusión de la muestra de orina. Estas muestras se enfriaron a continuación a +4 °C, luego se centrifugaron a 4000g durante 15 minutos a +4 °C y después se almacenaron inmediatamente a 20 °C. Se respetó un periodo de "wash-out" de una semana entre los cambios de régimen.

[0140] Se seleccionó una cepa de *E. coli* uropatógena previamente aislada de la orina de un paciente con una infección del tracto urinario: NECS19923 con fimbrias tipo P (*papG*) y pili de tipo 1. Esta cepa se modificó previamente genéticamente mediante la inserción de un plásmido que lleva el gen que codifica GFP (proteína de fluorescencia verde).

[0141] El estudio *in vivo* de la citotoxicidad de *E. coli* se llevó a cabo según el modelo *Caenorhabditis elegans* utilizando el método descrito por Kurz et al. con la excepción de los gusanos utilizados que son un linaje mutante Iron-15, cuya fertilidad depende de la temperatura ambiente. Los mutantes de hierro-15 son proporcionados por el *Caenorhabditis* Genetics Center (USA). Para sincronizar el crecimiento de los nematodos, se recogieron los huevos usando el método de hipoclorito. Las placas de Agar NGM (medio de crecimiento de nematodos) se inocularon con 10µl de un cultivo de 18h de *E. coli* y se colocaron en presencia de la composición de acuerdo con el Ejemplo 3. Estas placas de Agar se incubaron a continuación a 37 °C entre 8 y 10 horas, y luego se sembraron con nematodos en etapa L4 larvaria (20-30 por placa). Las placas se incubaron a 25 °C y se contó cada día el número de gusanos vivos bajo estereomicroscopio (Leica MS5). Estos experimentos han permitido establecer las curvas de supervivencia (DL50: tiempo de vida media y duración de la vida) y han demostrado la presencia, ausencia o reducción de la virulencia (citotoxicidad) de las cepas de *E. coli*. Para cada experimento, las cepas se ensayaron en 3 experimentos independientes y estos experimentos se repitieron 4 veces para cada prueba. Un nematodo se considera muerto cuando ya no responde al tacto de un asa de siembra de metal. Los gusanos que se pegaron a la pared de las placas de Petri y murieron quedaron excluidos del análisis. Para comparar los tiempos de vida del nematodo en los distintos regímenes, se aplicó el modelo de regresión de Cox. Para hacer comparaciones por parejas, se utilizó una prueba de log-rank. Los análisis se realizaron utilizando el software SAS®/ETS versión 9.1 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

[0142] Los resultados se resumen en la tabla 3 que aparece a continuación

Tabla 3

Pruebas	TL50 (días)	TL100 (días)
T0 orina	4.2 ±0.2	7.4 ±0.6
La orina de 4 cápsulas T1-6h	6.0 ±0.1	11.3 ±0.7
La orina de 4 cápsulas T12h	5.5 ±0.2	9.3 ±0.7
La orina de 4 cápsulas T24h	5.0 ±0.2	7.8 ±0.8
La orina de 6 cápsulas T1-6h	6.3 ±0.3	11.3 ±0.7
La orina de 6 cápsulas T12h	5.3 ±0.3	9.5 ±0.5
La orina de 6 cápsulas T24h	5.8 ±0.2	9.0 ±1.0
La orina de 8 cápsulas T1-6h	6.0 ±0.1	11.8 ±0.8
La orina de 8 cápsulas T24h	6.3 ±0.3	11.5 ±0.5
Control de cepa OP50	7.5 ±0.5	13.3 ±0.7

[0143] Los resultados muestran que la composición según la invención reduce la virulencia de una cepa de *E.coli* y también que esta actividad se mantiene en el tiempo.

Ejemplo 15: evaluación de la expresión del gen *papG3* bajo el efecto de una composición de acuerdo con la invención

[0144] Una cepa uropatógena de *Escherichia coli* aislada durante una infección urinaria fue seleccionada en el laboratorio del equipo INSERM Espri 6: se trata de una cepa sensible a los antibióticos: NECC853118, *papG3+*, filotipo B2.

[0145] Se recogió la orina de voluntarios sanos mayores de 18 años, con un método anticonceptivo eficaz, después de haber seguido una dieta normal y que no habían recibido tratamiento con antibióticos en las dos semanas anteriores ni durante el estudio según el siguiente régimen:

- placebo
- 4 cápsulas, 1h-6h después de la ingestión
- 4 cápsulas, 12 horas después de la ingestión,
- 15 - 8 cápsulas, 1h-6h después de la ingestión,
- 8 cápsulas, 24 horas después de la ingestión,

cada cápsula corresponde a la composición según el Ejemplo 3.

20 **[0146]** El cultivo de la cepa de *E. coli* en las distintas muestras de orina recogidas tras los distintos regímenes se llevó a cabo durante 18 horas a 37 °C con agitación.

[0147] El nivel de expresión del gen *papG3* se determinó por cuantitativa en tiempo real RT-PCR (Real Time - Reacción en Cadena de la Polimerasa). La expresión de los transcritos se normalizó con el gen de limpieza que codifica la GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), medido en cada muestra. Para evitar la degradación de ARNm extraído después de la lisis celular (que puede alterar la expresión del gen), el ARN total fue aislado en un entorno libre de RNasa utilizando el RNeasy Mini Kit Protect (Qiagen, Hilden, Alemania) en de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. La integridad, la pureza y la concentración de extractos de ARNm se midieron por espectrofotometría a 260 nm. El ARN purificado se almacenó en agua estéril libre de RNasa en tubos de congelación Eppendorf. La cuantificación de las muestras se realizó en un LC480 (Roche) utilizando el kit de QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). El gen de limpieza *gapdh* se utilizó como referencia del experimento y porque tiene un nivel constante de expresión en las condiciones utilizadas. La eficiencia de la amplificación del gen diana y el gen de referencia se determinó a partir de la amplificación de una serie de dilución de muestras y las condiciones de PCR se optimizaron para obtener una eficacia comparable entre las series (eficiencia = 2). Las amplificaciones del gen *gapdh* y del gen *papG3* se realizaron en tubos separados utilizando la misma cantidad de ARN total. Las cantidades de ARNm de cada gen se determinaron por comparación de los umbrales de amplificación (CT).

[0148] Los resultados se expresaron por sub/sobre-expresión de *papG3* con relación a la expresión de este gen en condiciones normales (*E. coli* en orina sin CAP) y se presentan en la Figura 2.

[0149] En comparación con la expresión del gen *papG3* detectado en la cepa de *E. coli* en contacto con la orina de control, este mismo gen está:

- 45 - casi un 70% (69%) menos expresado en la cepa de *E. coli* en contacto con la orina que contiene 8 cápsulas de composición de acuerdo con la invención tomada en 1h-6h,
- casi un 50% (47%) menos expresado en la cepa de *E. coli* en contacto con la orina que contiene 8 cápsulas de composición de acuerdo con la invención tomada en 24h,
- un 35% menos expresado en la cepa de *E. coli* en contacto con la orina que contiene 4 cápsulas de composición
- 50 de acuerdo con la invención tomada en 1h-6h,
- casi un 20% menos expresado (18%) en la cepa de *E. coli* en contacto con la orina que contiene 4 cápsulas de la composición de la invención tomadas a las 24 horas.

[0150] Estos resultados muestran que la composición según la invención reduce la expresión del gen *papG3* y que esta actividad se mantiene en el tiempo. Se confirman el efecto de la composición según la invención en la reducción de la virulencia de *E.coli*.

Ejemplo 16 (ilustrativo): estudio *in vitro* del efecto antibacteriano de una composición y la sinergia con los diferentes agentes antibióticos utilizados en la patología urinaria

[0151] Seis cepas de *Escherichia coli* de origen diferente (cistitis, pielonefritis aguda, portadores crónicos urinarios), de sensibilidad diferente a los principales antibióticos utilizados habitualmente en diversas infecciones del tracto urinario y tumores malignos fueron seleccionadas en el laboratorio del equipo INSERM Espri 26:

5

- 2 cepas sensibles al ATB: NECS892841 y NECS30090
- 2 cepas resistentes a las quinolonas: NECS858785 et NECS864598
- 2 cepas secretoras de BLSE: NEC892420 et NEC118564

10 **[0152]** Se evaluaron tres composiciones:

- una composición que comprende un polvo de propóleo sobre dextrina de maltosa
- una composición que comprende un polvo de propóleo sobre dextrina de maltosa y de PAC de tipo A
- una composición que comprende la dextrina de maltosa

15

[0153] Se estudiaron tres antibióticos:

- ofloxacina
- ceftriaxona

20

[0154] El estudio *in vitro* del efecto antibacteriano se divide en dos etapas:

- una etapa de determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada composición (rango de concentraciones estudiado: 0,5 a 5196 mg/L) y el método de dilución de antibiótico en un medio líquido tal como recomienda el CA-SFM (Comité del antibiograma de la Sociedad francesa de Microbiología).
- una etapa de determinación de la CMI del antibiótico en presencia de cada composición en la concentración sub-inhibitoria (120 o 250 mg/L dependiendo de la cepa) (rango de concentraciones estudiado: 0,5 a 512 mg/L) por el método de dilución en medio líquido de acuerdo con las recomendaciones del CA-SFM.

30

[0155] Todos los tubos se colocaron en un horno a 37 °C sin agitación durante una noche.

[0156] La CMI₅₀ es la concentración más baja de antibiótico que inhibe todo cultivo visible de una cepa bacteriana después de 18 horas de cultivo a 37 °C.

35

[0157] Para la ofloxacina, un MIC > 1 mg/l equivale a una cepa resistente.

[0158] Para la ceftriaxona, un MIC > 2 mg/L equivale a una cepa resistente.

40 **[0159]** Para la cefixima, un MIC > 2 mg/L equivale a una cepa resistente.

[0160] La susceptibilidad o resistencia a la ofloxacina, ceftriaxona o cefixima se interpreta de acuerdo a las recomendaciones del CA-SFM.

45 **[0161]** Los resultados se muestran en las Tablas 4, 5 y 6 a continuación:

Tabla 4

Cepas de <i>E.coli</i>	Ofloxacina	Ofloxacina + Dextrina de maltosa	Ofloxacina + propóleo	Ofloxacina + propóleo + PAC tipo A
S	1	1	0,5	0,5
S	0,25	0,25	0,06	0,06
OFX R	2	2	0,5	0,5
OFX R	32	32	8	8
BLSE	>32	>32	8	8
BLSE	>32	> 32	16	16

S: cepa susceptible a los antibióticos comúnmente sometidos al ensayo de *E. coli*; OFX R: cepa resistente a la ofloxacina; BLSE: cepa productora de b-lactamasas de espectro extendido

Tabla 5

Cepas de <i>E.coli</i>	Ceftriaxona	Ceftriaxona +Dextrina de maltosa	Ceftriaxona + propóleo	Ceftriaxona + propóleo + PAC tipo A
S	1	1	0,125	0,125
S	0,5	0,5	0,06	0,06
OFX R	0,25	0,25	<0,06	<0,06
OFX R	0,5	0,5	0,06	0,06
BLSE	>32	>32	2	2
BLSE	32	32	2	1

S: cepa susceptible a los antibióticos comúnmente sometidos al ensayo de *E. coli*; OFX R: cepa resistente a la ofloxacin; BLSE: cepa productora de b-lactamasas de espectro extendido

Tabla 6

Cepas de <i>E. coli</i>	Cefixima	Cefixima + Dextrina de maltosa	Cefixima + propóleo	Cefixima + propóleo + PAC tipo A
S	1	1	0,25	0,25
S	0,5	0,5	0,25	0,125
OFX R	0,5	0,5	0,125	0,125
OFX R	1	1	0,125	0,25
BLSE	16	16	8	8
BLSE	8	8	2	2

S: cepa susceptible a los antibióticos comúnmente sometidos al ensayo de *E. coli*; OFX R: cepa resistente a la ofloxacin; BLSE: cepa productora de b-lactamasas de espectro extendido

5 **[0162]** Los resultados muestran que el propóleo mejora la actividad de cada uno de los antibióticos evaluados y por lo tanto se demuestra un claro efecto sinérgico del propóleo con 2 clases de antibióticos (cefalosporina, fluoroquinolona) a las que pertenecen los antibióticos evaluados.

10 **[0163]** Por otra parte, estos resultados también muestran que los PAC de tipo A no dañan la sinergia de la actividad entre el propóleo y el antibiótico.

Ejemplo 17 (ilustrativo): estudio complementario de la sinergia entre el propóleo y distintos agentes antibióticos utilizados en patologías urinarias - curvas de bactericida

15 **[0164]** Una cepa de *Escherichia coli* aislada durante una infección urinaria fue seleccionada en el laboratorio del equipo del INSERM Espri 26: cepa sensible a los antibióticos NECS892841.

[0165] Se evaluaron dos composiciones:

- 20 - una composición que comprende un polvo de propóleo sobre dextrina de maltosa
- una composición que comprende la dextrina de maltosa (control)

[0166] Se evalúan 2 antibióticos:

- 25 - ceftriaxona (CRO)
- cefixima (CFM)

30 **[0167]** El establecimiento del efecto antibacteriano de cada composición asociada con la ceftriaxona se basa en los siguientes experimentos.

[0168] Los experimentos se realizaron en 20 ml de Mueller-Hinton con agitación a 37 °C. Cada composición se evaluó a 1x la MIC (256 mg/L), la ceftriaxona a 0,5x la MIC (0,5 mg/L) y las muestras se sembraron para recuento de colonias (CFU) a las 0, 1, 2, 3, 5, 6 y 24 horas. Una reducción \leq 3-log en comparación con el inóculo inicial a 24h se considerará bactericida.

35 **[0169]** El establecimiento del efecto antibacteriano de cada composición asociada con la cefixima se basa en los siguientes experimentos.

[0170] Los experimentos se realizaron en 20 ml de Mueller-Hinton con agitación a 37 °C. Cada composición se evaluó a 1x la (256 mg/L), la cefixima a 0,5x la MIC (0,5 mg/L) y las muestras se sembraron para recuento de colonias (CFU) a las 0, 1, 2, 3, 5, 6 y 24 horas. Una reducción ≤ 3 -log en comparación con el inóculo inicial a 24h se considerará bactericida.

5

[0171] La enumeración de colonias bacterianas (CFU) se realizó después de 18 horas de cultivo a 37 °C.

[0172] Las curvas bactericidas se muestran en las figuras 3 y 4.

10 **[0173]** Las curvas bactericidas de las figuras 3 y 4 sirven para confirmar la actividad sinérgica entre el propóleo y cada uno de los antibióticos evaluado.

REIVINDICACIONES

1. Composición alimentaria antibacteriana que comprende un extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* y un extracto de propóleo, donde:
- 5
- el extracto de propóleo comprende ácido cafeico, ácido ferúlico, galangina y pinocembrina,
 - el extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* contiene una proporción en peso de proantocianidinas (PAC) mayor que o igual a 10%, preferiblemente mayor que 10%, ventajosamente entre 20% y 50%, dicho porcentaje se mide por el método de ensayo por vainillina
- 10
- la composición **se caracteriza por** una relación en peso de extracto de propóleo: extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* de entre 1:2 y 2:1
2. Composición según la reivindicación anterior **caracterizada por que** el contenido en peso del extracto
- 15 propóleo es de entre 10% y 80%, preferiblemente de entre 30% y 70%.
3. Composición de acuerdo con cualquier reivindicación precedente **caracterizada por que** el extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* se obtiene por un proceso de concentración y aislamiento de las fracciones de polifenoles del zumo de arándano *Vaccinium macrocarpon*.
- 20
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizada por que** el contenido en peso del extracto de arándano *Vaccinium macrocarpon* es de entre 10% y 80%, preferiblemente de entre 25% y 70%.
- 25
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizada por que** comprende además un compuesto seleccionado del grupo que consiste en activos farmacéuticos, ingredientes alimentarios y nutrientes.
6. Composición según la reivindicación anterior **caracterizada por que** el ingrediente alimentario se
- 30 selecciona del grupo que consiste en zinc y sus derivados, preferiblemente sales de zinc.
7. Composición según la reivindicación 5 **caracterizada por que** el ingrediente alimentario se selecciona del grupo que consiste en hierro y sus derivados, preferiblemente sales de hierro.
- 35
8. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, **caracterizada por que**:
- el contenido en peso de zinc o de uno de sus derivados se encuentra entre el 0,01% y el 2%, preferentemente entre el 0,1% y el 1,5%, o
 - el contenido en peso de hierro o de uno de sus derivados se encuentra entre el 0,05% y el 3%, preferentemente
- 40 entre el 0,5% y el 2,5%.
9. Composición según la reivindicación 5 **caracterizada por que** el ingrediente alimentario se selecciona del grupo que consiste en vitamina C y sus derivados, preferiblemente sales de ácido ascórbico, preferiblemente ascorbato de sodio.
- 45
10. Composición según la reivindicación 9 **caracterizada por que** el contenido en peso de la vitamina C o un derivado de la misma es de entre 1% y 10%, preferiblemente de entre 2% y 8%.
11. Suplemento dietético que comprende una composición de acuerdo con cualquiera de las
- 50 reivindicaciones 1 a 10 para uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones bacterianas agudas o crónicas o de bacteriuria asintomática.
12. Un medicamento que comprende una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones
- 55 1 a 10 para uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones bacterianas agudas o crónicas o de bacteriuria asintomática.
13. Composición según la reivindicación 5, **caracterizada por que** el activo farmacéutico es un antibiótico.
14. Kit que comprende

- una primera composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10,
- una segunda composición que comprende un principio activo farmacéutico, en particular, un antibiótico o antioxidante, tal como la vitamina C y sus derivados, o un ingrediente alimentario, tal como el zinc, el hierro y sus derivados, o un nutriente.

15. Una composición que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un antibiótico para administración simultánea, separada o extendida en el tiempo, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de infecciones bacterianas agudas o crónicas o de bacteriuria asintomática.
- 10
16. kit o composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 14 y 15 que comprende un antibiótico que es una cefalosporina o una fluoroquinolona, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en ceftriaxona, cefixima y ofloxacina.

FIG 1

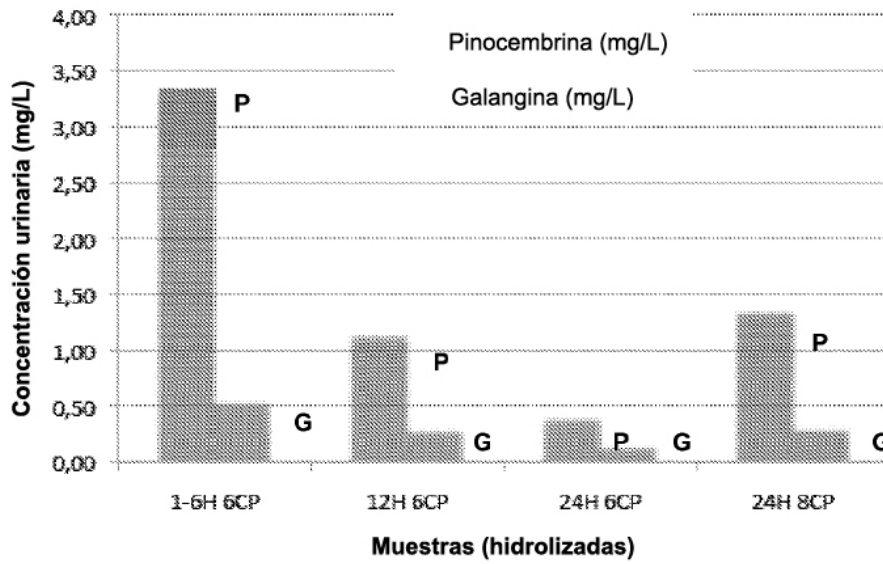


FIG 2

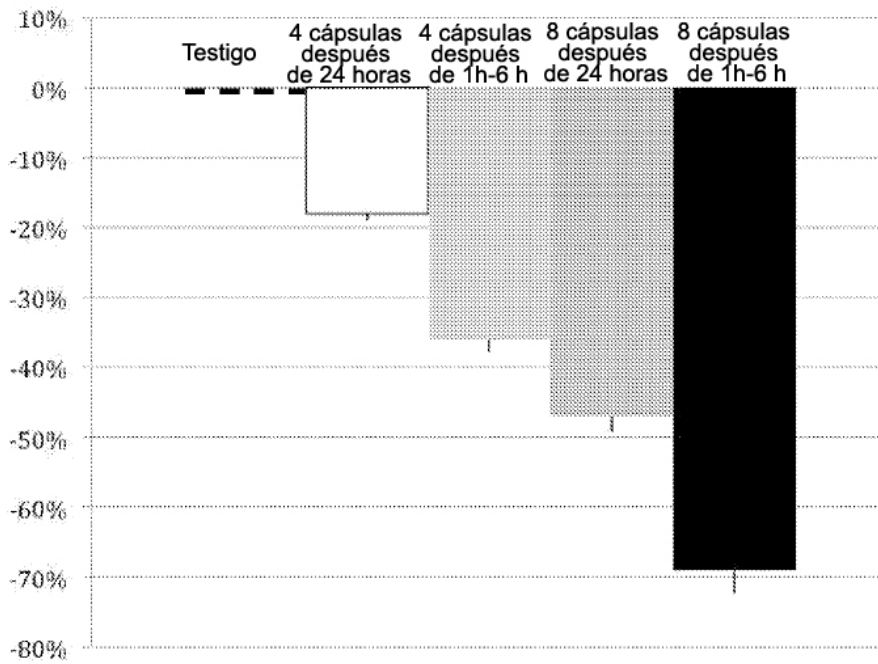


FIG 3

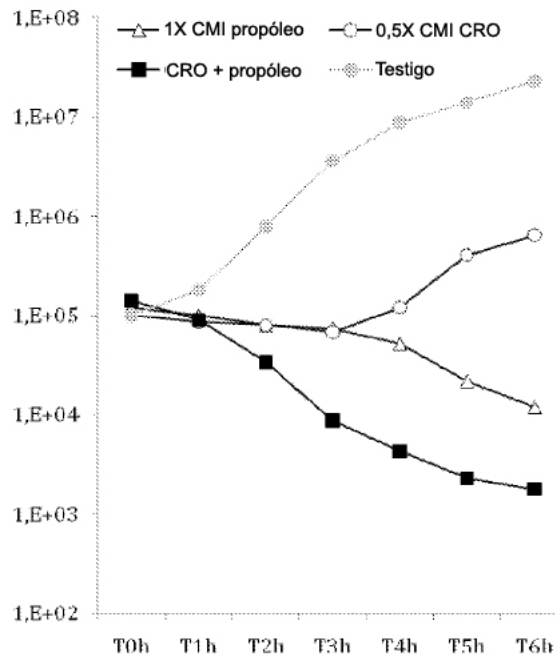


FIG 4

