

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 984**

51 Int. Cl.:

A61P 13/02 (2006.01)
A61K 36/185 (2006.01)
A61K 36/29 (2006.01)
A61K 36/756 (2006.01)
A61K 36/59 (2006.01)
A61K 36/53 (2006.01)
A61K 36/718 (2006.01)
A61K 36/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2012** **PCT/EP2012/068089**
87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014** **WO14040632**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012** **E 12772733 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017** **EP 2895180**

54 Título: **Composición para la prevención y el tratamiento de infecciones agudas y recurrentes del tracto urinario**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.08.2017

73 Titular/es:

CLARIDE PHARMA S.R.L. (100.0%)
Via Friuli, 25
20135 Milano, IT

72 Inventor/es:

SFERRA, DANIELA;
RUSSO, VALENTINA;
VERGALITO, FRANCA;
FRANCESCHINI, DEBORA;
MANGANO, KATIA;
SCAPAGNINI, GIOVANNI;
DI MARCO, ROBERTO y
LONGO, SONIA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 627 984 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 para la prevención y el tratamiento de infecciones agudas y recurrentes del tracto urinario

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una composición para la prevención y el tratamiento de infecciones agudas y recurrentes del tracto urinario.

La presente invención se origina en el campo de los suplementos dietéticos y los fármacos a base de hierbas. Específicamente, la presente invención se refiere a suplementos dietéticos o fármacos a base de hierbas para mejorar la salud del tracto urinario o prevenir o tratar infecciones urinarias agudas y recurrentes (ITU).

Técnica anterior

10 Una infección del tracto urinario (ITU) es una infección que afecta al riñón, el uréter, la vejiga o la uretra. La mayoría de las infecciones urinarias están causadas por bacterias gramnegativas y, entre ellas, el agente causal principal está representado por *Escherichia coli* (~90% de los casos).

Otras cepas bacterianas tales como *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Staphylococcus* y *Serratia*, también están emergiendo como agentes patógenos adicionales responsables de las infecciones del tracto urinario.

15 La infección del tracto urinario es una afección más común en las mujeres que en los hombres. La ITU puede ser asintomática, pero, por lo general, se asocia con síntomas específicos tales como la frecuencia urinaria, dolor urente con micción y, en el caso de infecciones graves, sangrado con posible presencia de pus en la orina.

20 Los episodios aislados de ITU que afectan al tracto urinario inferior son muy comunes en la población, especialmente en mujeres adultas, donde hay un predominio de 50 veces en comparación con los hombres adultos. Se ha comprobado que alrededor del 97% de la población femenina está afectada por al menos un caso de infección urinaria en algún momento de la vida.

25 Las ITU recurrentes son bastante comunes en la población femenina. Se estima que ocurre en hasta un tercio de las mujeres después del primer episodio de ITU. Las recurrencias que requieren intervención se definen generalmente como dos o más episodios en más de 6 meses o tres o más episodios en más de un año (esta definición se aplica sólo a mujeres jóvenes con ITU aguda no complicada.)

Numerosas investigaciones han llegado a la conclusión de que la mayoría de las infecciones urinarias están causadas por la capacidad de cepas bacterianas específicas, tales como *E. coli*, de adherirse firmemente al urotelio.

30 El urotelio es el revestimiento epitelial del tracto urinario entre la pelvis renal y la vejiga urinaria. El urotelio se compone de al menos tres capas: una capa de células basales unida a una membrana basal, una capa intermedia y una capa superficial o apical compuesta por grandes células hexagonales (diámetros de 25-250 μm) conocidas como "células paraguas". El tracto urinario es uno de los principales sitios mucosos para la colonización microbiana. El éxito de *E. coli* como uropatógeno está relacionado con la expresión de las fimbrias de tipo 1. Estos apéndices filamentosos permiten a la UPEC unirse e invadir las células epiteliales uretélicas superficiales (UEC) que recubren la luz de la vejiga. Las infecciones del tracto urinario con UPEC se inician por la adhesión bacteriana a las proteínas de uropodina en la superficie apical de las células paraguas. La adherencia es seguida por la invasión bacteriana de la pared de la vejiga. La internalización de la UPEC en las células paraguas y la formación de colonias intracelulares (vainas similares a biopelículas) de la UPEC en las células paraguas ha sido implicada en el mecanismo de la infección crónica del tracto urinario. De hecho, la internalización de bacterias por las células epiteliales urinarias podría beneficiar mucho a los patógenos. En general, la invasión de las células huésped por *Escherichia coli* puede permitir que los patógenos evadan las defensas del huésped y facilitar su diseminación tanto dentro como entre las barreras celulares. La invasión de UEC por la UPEC permite a estas bacterias evitar el flujo masivo de orina a través de la vejiga y el tracto urinario, y les da acceso a un medio ambiente más rico en nutrientes. Los uropatógenos intracelulares también son capaces de evitar el conjunto diverso de sustancias antimicrobianas y células inmunes presentes dentro de la orina y del tejido de la vejiga. Además, la *Escherichia coli* internalizada puede persistir dentro del tracto urinario virtualmente sin afectarse frente a tratamientos antibióticos que reducen eficazmente los títulos bacterianos dentro de la orina. Los datos emergentes indican que la capacidad de las cepas de *Escherichia coli* de tipo 1 para invadir las células epiteliales del tracto urinario es un acontecimiento clave en el establecimiento y la persistencia de una ITU.

50 La administración de antibióticos representa el tratamiento estándar para las ITU. Sin embargo, el uso extendido o repetido de antibióticos podría conducir al desarrollo de la resistencia y a efectos secundarios graves.

Además, hay evidencias científicas de que el tratamiento de las infecciones urinarias con antibióticos conduce a una penetración inadecuada de las células epiteliales de la vejiga, permitiendo que las bacterias intracelulares persistan.

La eliminación del grupo intracelular de bacterias ha demostrado tener beneficios clínicos potenciales, especialmente en la reducción de la recurrencia de las ITU. Los avances recientes han demostrado la posibilidad de

inducir la exocitosis de UPEC y la eliminación en las UEC. Sobre la base de las propiedades morfológicas, bioquímicas y funcionales, es probable que los compartimentos intracelulares en los BEC superficiales que albergan UPEC sean vesículas fusiformes. La exocitosis de vesículas fusiformes puede ser inducida por un aumento del cAMP intracelular. La activación de esta vía se ha identificado como una posible estrategia para el tratamiento de UEC infectados con UPEC, en modelos "in vitro" e "in vivo", resultando eficaz en la eliminación de ITU.

Teniendo en cuenta los inconvenientes anteriores causados por los tratamientos de ITU con compuestos farmacéuticos tradicionales proporcionados con actividad antibacteriana, se ha probado la actividad de algunos fármacos o suplementos a base de hierbas.

En la bibliografía se ha publicado la capacidad del zumo de arándanos y sus extractos en la reducción de los síntomas de la ITU y en algunos casos, la recurrencia de infecciones bacterianas del tracto urinario.

Sin embargo, la necesidad de consumir una gran cantidad de zumo para obtener un tratamiento satisfactorio de la ITU junto con su elevado contenido en azúcares y calorías dificulta el tratamiento satisfactorio con este zumo, en particular en sujetos diabéticos. Además, la alta acidez del zumo de arándanos a menudo causa trastornos estomacales en los sujetos bajo tratamiento.

Geetha R V et al. en la publicación "Nature's weapon against urinary tract infections" en el International Journal of drug development and research 2011 Chauhan Publishers Ind., Vol. 3 n. 3 de julio de 2011, páginas 85-100, describen que la Berberina -como principio activo de la Hydrastis Canadensis- y Arbutina -como principio activo de la Arctostaphylos uva-ursi- es eficaz contra las infecciones del tracto urinario.

Head K A en "Natural approaches to prevention and treatment of infections of the lower urinary tract" Alternative Medicine Review, Thorne Research Inc., Sandpoint US, vol. 13, n. 3, 1 de septiembre de 2008, páginas 227-244 describe agentes botánicos que pueden ser eficaces en el primer signo de una infección del tracto urinario inferior y para la profilaxis a corto plazo incluyen berberina y uva ursi.

La solicitud internacional WO2007/144778 A2 describe la prevención o el tratamiento de infecciones del tracto urinario que implican la administración de una composición que contiene hierbas que comprende una preparación de cortes/corteza de Crateva nurvala y una preparación de extracto de vástago de Equisetum arvense y preferiblemente al menos otro compuesto tal como hojas de Arctostaphylos uva ursi que contienen 140 mg de arbutina por unidad de dosificación oral.

La solicitud internacional WO2011/000124 A1 describe composiciones farmacéuticas que incluyen cepas probióticas viables de Lactobacillus spp. utilizadas para la prevención y recuperación de individuos con infecciones del tracto urinario e individuos inmunocomprometidos.

De Barbara Zdzisinska et al., "Therapeutic properties of betulin and betulinic acid, components of birch bark extract", Farm Prezgi Nauk, 2010, 3, 33-39 se sabe que las hojas de abedules se utilizan como diuréticos para el tratamiento de condiciones bacterianas e inflamatorias del tracto urinario.

Por consiguiente, en la actualidad todavía existe la necesidad de nuevos remedios adecuados para prevenir y tratar la ITU y para aliviar la sintomatología acompañante.

Un objeto general de la presente invención es superar algunos de los inconvenientes antes mencionados.

Es también un objeto de la presente invención proporcionar una composición para prevenir la recurrencia de las infecciones del tracto urinario.

Un objeto adicional de la presente invención reside en la provisión de una composición para tratar infecciones del tracto urinario causadas por microorganismos patógenos más comunes, en particular, el uropatógeno Escherichia coli (UPEC).

Sumario de la invención

Los inventores han descubierto que la asociación de Berberina y Arbutina, o extractos vegetales de berberina y plantas de uva, externaliza un microorganismo uropatógeno, a partir del urotelio infectado. Esta actividad es particularmente evidente para las infecciones del uropatógeno Escherichia coli.

Los inventores han encontrado también que la asociación de extractos de plantas o partes de especies vegetales que contienen Berberina y Arbutina inhibe la proliferación de bacterias patógenas en el tracto urinario reduciendo su capacidad de fijación a las células epiteliales de la vejiga y la pared uretral y/o de externalización del uropatógeno del urotelio infectado.

Mediante tales acciones, la composición objeto de la presente solicitud es eficaz para disminuir la incidencia de infecciones recurrentes del tracto urinario, previniendo complicaciones secundarias y promoviendo la viabilidad y las funciones de las células uretrales del deterioro, y la muerte relacionada con los procesos infecciosos.

La presente invención proporciona así una composición para uso en la prevención y el tratamiento de infecciones agudas y/o recurrentes del tracto urinario como se reivindica en la reivindicación 1.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la composición de la invención contiene extractos de plantas o porciones o tejidos vegetales de plantas que contienen Arbutina y/o Berberina.

- 5 En algunas realizaciones, los extractos de plantas que contienen Arbutina o/y Berberina son extractos vegetales secos.

La combinación de Berberina y Arbutina o de extractos de plantas que contienen tales ingredientes activos vegetales proporciona un efecto de externalización sinérgico sobre los microorganismos patógenos responsables de las infecciones más comunes del tracto urinario.

- 10 La composición de la invención es capaz de inhibir la proliferación de cepas bacterianas del tracto urinario, especialmente *Escherichia coli*, evitando que estas cepas bacterianas se adhieran a las células epiteliales de la vejiga y la pared uretral. La composición comprende una asociación sinérgica de extractos o partes de plantas de Berberina, Betulina y Arbutina en una cantidad eficaz y un vehículo comestible para su uso en la prevención o tratamiento de la ITU.

- 15 Típicamente, la composición de la invención es una composición farmacéutica o una fitomedicina o un suplemento que puede introducirse en los regímenes dietéticos de sujetos que son susceptibles de ITU.

Típicamente, los ingredientes activos sinérgicos de la composición pueden ser de origen vegetal.

- 20 Los inventores también han encontrado que la eficacia del tratamiento de la ITU se incrementa adicionalmente añadiendo Forskolina o un extracto vegetal o parte de plantas que contienen Forskolina a la composición que contiene Berberina, Betulina y Arbutina.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición para la prevención y el tratamiento de infecciones agudas y recurrentes del tracto urinario que comprende una asociación de los ingredientes activos o fitoquímicos: Berberina, Betulina, Forskolina y Arbutina en una cantidad terapéuticamente eficaz y un vehículo comestible.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra la viabilidad de las células uretéricas 5637, medida mediante el ensayo MTT, después de tratamientos con diferentes concentraciones de ingredientes activos vegetales individuales ensayados en tres disolventes diferentes.

- 30 Las Figs. 2 A, B muestran la viabilidad de las células uretéricas 5637, medida mediante el ensayo MTT, tras tratamientos con diferentes mezclas de ingredientes activos vegetales, en condiciones basales o después de la exposición a LPS.

La figura 3 ilustra la adhesión de *E. coli* sobre las células uroteliales 5637 en presencia de diferentes concentraciones de ingredientes activos individuales y mezclas de los mismos.

- 35 La figura 4 ilustra la internalización de *E. coli* (recuento bacteriano) en células uroteliales 5637 en presencia de diferentes concentraciones de ingredientes activos individuales o mezclas de diferentes ingredientes activos.

Las Figs. 5 - 8 muestran el ensayo de internalización (método citofluorométrico) sobre las células uroteliales 5637 en presencia de diferentes concentraciones de ingredientes activos vegetales individuales o mezclas de diferentes ingredientes activos.

- 40 Las Figs. 9 - 10 muestran los niveles de cAMP en células uroteliales 5637 tratadas con cada ingrediente activo vegetal único o mezclas de los mismos con o sin tratamiento previo con el inhibidor de fosfodiesterasa IBMX, 3-isobutil-1-metilxantina, IBMX.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición para su uso como se reivindica en la reivindicación 1.

- 45 De acuerdo con ciertos aspectos de la invención, los inventores encontraron que la asociación de Berberina y Arbutina reduce la adherencia de las fimbrias P bacterianas sobre la superficie de las células uretéricas, impidiendo así su colonización y posterior infección.

Uno de los ingredientes activos de la composición de la invención es Arbutina o un extracto vegetal o parte o tejido de una planta que contiene Arbutina.

La arbutina, también denominada β -D-glucopiranosido de hidroquinona [(2R, 3S, 4S, 5R, 6S)-2-hidroximetil-6-(4-hidroxifenoxi)oxano-3,4,5-triol], es una hidroquinona glicosilada extraída de la planta de la gayuba específicamente del género *Arctostaphylos*.

- 5 Se ha publicado que la Arbutina y sus derivados de monoéster como se describe en la Patente de EE.UU. No. 6.306.376, que se incorpora completamente por referencia, inhiben la tirosinasa y evita así la formación de melanina. Para estas propiedades, la Arbutina se utiliza comúnmente como un agente aclarante cutáneo. La arbutina se encuentra en muchas plantas, tales como los miembros de las familias *Ericaceae*, *Rosaceae*, *Saxifragaceae* y específicamente en *Bergenia crassifolia*.

- 10 La producción de Arbutina por síntesis química se ha descrito en la bibliografía, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 3.201.385, Pat. N° 6.388.103. La arbutina también puede producirse mediante técnicas comunes de extracción de plantas y partes de las mismas que contienen naturalmente Arbutina, o mediante biotransformación utilizando huéspedes microbianos o cultivos celulares de plantas, semillas o plántulas que expresan glucosiltransferasas adecuadas en contacto con hidroquinona y UDP-glucosa (Arend et al. *Phytochemistry* 53: 187-193 - 2000).

- 15 La arbutina encuentra su aplicación genéricamente en la despigmentación de la piel. En la composición de la invención, la arbutina contribuye sinérgicamente a la prevención y/o el tratamiento de la ITU, en particular la causada por la colonización de urotelio por *E. coli*. En ciertas realizaciones, la Arbutina o un extracto vegetal de la misma puede estar presente en la composición en una cantidad de 0,01 a 90% en peso, preferiblemente de 20 a 65% en peso.

- 20 La asociación de Arbutina y Berberina, opcionalmente con Betulina y Forskolina, inhibe sinérgicamente la recurrencia de las ITU, ya sea activando la exocitosis y la eliminación de la UPEC, mediante la activación de la vía cAMP en la UEC infectada como contrarrestando las tasas de adhesión de *E. coli* a las células uroepiteliales.

La berberina o un extracto vegetal o porción o tejido de una planta que contiene Berberina es uno de los ingredientes activos de la composición de la invención.

- 25 La berberina es un alcaloide vegetal que puede encontrarse en las raíces, rizomas o la corteza de los tallos de plantas que contienen berberina, tales como *Berberis vulgaris* (berberis), *Berberis aristata* (cúrcuma arbórea), *Berberis* (p. ej. *Berberis aquifolium* (uva de Oregón), *Hydrastis canadensis* (Goldenseal), *Coptis chinensis* (Goldthread de China, *Coptis*), *Phellodendron amurense* (Corcho de Amur, Huang Bai, Huang Po, Po Mu) o *Tinospora cordifolia*, o en menor cantidad también en *Eschscholzia californica* (Amapola californiana) o *Argemone mexicana* (Amapola espinosa).

Típicamente, la berberina es una sal de amonio cuaternario del grupo protoberberina de los alcaloides de la isoquinolina.

En ciertas realizaciones, el alcaloide de Berberina puede obtenerse a partir de extractos de *Berberis*, decocciones o partes de plantas que contienen dicho alcaloide.

- 35 En ciertas realizaciones de la invención, la berberina se obtiene como un extracto seco de una parte de una planta que contiene el alcaloide, especialmente, *Berberis Aristata*.

En ciertas realizaciones, la berberina o un extracto vegetal de la misma puede estar presente en la composición en una cantidad de 0,01 a 35% en peso, preferiblemente de 0,5 a 20% en peso.

- 40 En ciertas realizaciones, la betulina o un extracto vegetal o porción o tejido de una planta que contiene betulina es un ingrediente activo de la composición de la invención.

La betulina es un alcohol triterpénico pentacíclico natural de la familia de los lupinos, también denominado betulinol o lup-20(29)-en-3,28-diol. Se aísla comúnmente de la corteza de algunas especies arbóreas, especialmente en la corteza de abedul (*Betula* sp.) en cantidades de hasta el 40% del peso en seco de la corteza. La betulina también puede obtenerse a partir de extractos, decocciones o partes de plantas de especies de *Betula*.

- 45 En el campo de la extracción de plantas se conocen métodos para el aislamiento de betulina a partir de material de corteza, típicamente basado en la extracción.

La betulina puede convertirse en ácido betulínico, que es el grupo alcohólico sustituido por un grupo ácido carboxílico, que es biológicamente activo por sí mismo.

- 50 El ácido betulínico puede aislarse, por ejemplo, de *Betula* sp. (Abedul) o corcho o alcornoque (*Quercus suber* L.) por extracción. Además, el ácido betulínico puede producirse por métodos alternativos tales como los descritos en la patente de EE.UU. 5.804.575 o en la patente de EE.UU. 6.280.778.

En ciertas realizaciones, el ácido betulínico y/o la betulina o un extracto vegetal de la misma pueden estar presentes en la composición en una cantidad de 0,01 a 35% en peso, preferiblemente de 0,5 a 10% en peso.

En ciertas realizaciones, la composición de la presente invención comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de Arbutina, Berberina y Betulina o ácido betulínico, o extractos vegetales del mismo, y un vehículo comestible.

5 Los inventores han descubierto que la actividad profiláctica o terapéutica de una composición que contiene Arbutina y Berberina aumenta cuando se añade al menos un ingrediente activo adicional de origen vegetal seleccionado entre betulina, ácido betulínico y Forskolina.

En ciertas realizaciones, la composición de la invención comprende además Forskolina o un extracto vegetal o porción o tejido de una planta que contiene Forskolina como ingrediente activo adicional.

10 La forskolina es un compuesto diterpenoide descrito, por ejemplo en la Patente de EE.UU. 4.088.659. Típicamente, la Forskolina se origina de la hierba asiática *Coleus Forskohlii*. Típicamente, la Forskolina puede obtenerse por técnicas de extracción convencionales a partir de plantas conocidas tales como *Coleus Forskohlii*. Las preparaciones a base de hierbas de *Coleus Forskohlii* encontraron aplicaciones en el registro médico por ejemplo en el tratamiento de condiciones alérgicas, asma, psoriasis, trastornos cardiovasculares y condiciones oftálmicas tales como la reducción de la presión ocular interna y la prevención del glaucoma. La Forskolina también se ha utilizado en el control de la obesidad, en los síndromes digestivos y de malabsorción. En la literatura científica se ha publicado que la Forskolina actúa activando y estimulando la adenilato ciclasa, una enzima que regula la formación de AMP cíclico, una sustancia que ejerce un control sobre algunas actividades celulares. También se ha encontrado que la Forskolina actúa además inhibiendo las proteínas de transporte de membrana y las proteínas de canal a través de un mecanismo de acción que no implica la activación del AMPc.

La moderada toxicidad de la Forskolina observada en dosis altas ha limitado su uso solo a gran escala.

20 En ciertas realizaciones, la Forskolina o un extracto de planta que la contiene puede estar presente en la composición en una cantidad de 0,01 a 35% en peso, preferiblemente de 0,5 a 10% en peso.

Los inventores han encontrado ahora que combinando la Forskolina con Berberina, Betulina y Arbutina o extractos vegetales de los mismos, se obtiene un aumento sinérgico de los niveles de AMPc que dan como resultado un efecto beneficioso en la prevención y/o tratamiento de las ITU recurrentes.

25 La composición de la invención comprende Betulina como ingrediente activo adicional a la Berberina y Arbutina o su aglicona hidroquinona.

30 De acuerdo con ciertas realizaciones, el solicitante ha diseñado un modelo experimental para determinar el efecto terapéutico sinérgico de la berberina y la arbutina, junto con la betulina, en la prevención de la infección del urotelio por uropatógenos tales como *E. coli* y/o en la ITU recurrente. Esto se debe a que la combinación de los principios activos o extractos anteriores que los contienen, activan una vía de respuesta celular frente a la infección y facilitan la expulsión y escisión del uropatógeno del uroepitelio.

Más detalladamente, la combinación anterior induce y sobre-expresa los niveles intracelulares de AMPc. Típicamente, la regulación positiva de cAMP induce la exocitosis de vesículas fusiformes de células uretéricas, dando como resultado la externalización y reducción del número de *E. coli* intracelular.

35 Típicamente, la composición de la invención ejerce un efecto preventivo, a medio/largo plazo de la ingesta sistemática, en el retraso, la prevención y el tratamiento parcial de las infecciones del tracto urinario (ITU), en particular las causadas por el uropatógeno *Escherichia coli* (UPEC).

40 En ciertas realizaciones, uno o más de los ingredientes activos descritos anteriormente de la composición de la invención se proporcionan en forma de extractos vegetales secos. Una composición de acuerdo con la presente invención puede contener opcionalmente otros ingredientes activos.

Típicamente, la inclusión de un agente probiótico en la formulación de la composición de la invención aumenta la capacidad de prevenir y/o tratar la cistitis recurrente.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la composición contiene además un agente probiótico, como ingrediente activo adicional, tal como un *Lactobacillus acidophilus*.

45 Un agente probiótico adecuado es las cepas probióticas de Danisco *Lactobacillus acidophilus* NCFM®.

En ciertas realizaciones, la composición de la invención incluye además una o más vitaminas, tales como las vitaminas del grupo B, niacina, vitamina A, vitamina C, vitamina PP y otras.

De acuerdo con algunas realizaciones, la composición de la invención también incluye uno o micro micronutrientes y/o minerales o micronutrientes tales como sales de potasio, sodio, Zn, Fe, Cr, Se, Mn, Mg y otros.

50 El término "vehículo" se refiere a un vehículo, excipiente, diluyente o adyuvante con el que se administra la asociación de ingredientes terapéuticos o activos. Cualquier vehículo y/o excipiente adecuado para la forma de

preparación deseada para la administración se contempla para su uso con los compuestos descritos en la presente memoria.

Para los propósitos de la presente solicitud, se entiende por "comestible" los materiales de calidad alimentaria que son aprobados por las autoridades reguladoras para su uso en aplicaciones farmacéuticas o alimentarias.

- 5 Las composiciones de la presente invención abarcan cualquier composición hecha mezclando la asociación de ingredientes activos de origen vegetal de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones son adecuadas para uso nutricional, farmacéutico o dietético en un animal o en un ser humano.

10 El vehículo puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración oral, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, polvos. En la preparación de las composiciones para la forma de dosificación oral, se pueden emplear cualquiera de los medios nutricionales o farmacéuticos usuales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones; o vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de preparaciones sólidas orales tales como, por ejemplo, 15 polvos, cápsulas duras y blandas y tabletas, prefiriéndose las preparaciones orales sólidas sobre las preparaciones líquidas.

En ciertas realizaciones, los compuestos de la presente invención se pueden combinar como el ingrediente activo en mezcla íntima con un vehículo y/o excipiente comestible adecuado de acuerdo con técnicas farmacéuticas/nutricionales convencionales o de procesamiento de alimentos.

- 20 Una vía de administración ejemplar de la composición de la invención es la vía oral. Las composiciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia o en el procesamiento de alimentos.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de tabletas, pastillas, cápsulas, soluciones, suspensiones, emulsiones, polvos y como formulaciones de liberación sostenida.

- 25 Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse con técnicas acuosas estándar o no acuosas. En ciertas realizaciones, tales composiciones y preparaciones pueden contener al menos 0,1 por ciento de cada uno de los compuestos activos. El porcentaje de compuesto activo en estas composiciones puede, por supuesto, ser variado y puede estar convenientemente entre aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 60 por ciento del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones es tal que se obtendrá una dosificación profiláctica 30 o terapéuticamente eficaz.

Los comprimidos, pastillas, cápsulas y similares pueden contener también un aglutinante tal como goma de tragacanto, goma arábica, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina. Cuando la forma unitaria de dosificación 35 es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite graso.

En ciertas realizaciones, la composición de la invención incluye además uno o más componentes adicionales, tales como aditivos, cargas, estabilizantes, emulsionantes, texturizantes, filmógenos, plastificantes, humectantes y espesantes.

- 40 Otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos pueden estar recubiertos con goma laca, azúcar o ambos. El jarabe o elixir puede contener, además del ingrediente activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y un saborizante tal como el sabor de cereza o naranja. Para evitar la descomposición durante el tránsito a través de la porción superior del tracto gastrointestinal, la composición puede 45 ser una formulación revestida entérica.

En algunas realizaciones, en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el principio activo o los principios activos se formulan generalmente en unidades de dosificación. La unidad de dosificación puede contener de 0,1 a 1000 mg de compuesto activo por unidad de dosificación para la administración diaria.

- 50 En algunas realizaciones, las cantidades eficaces para la formulación dependerán de la gravedad de la enfermedad, trastorno o condición, terapia previa, el estado de salud del individuo y la respuesta a la asociación de los ingredientes activos. En algunas realizaciones, la dosis está en el intervalo de 0,001% en peso a aproximadamente 60% en peso de la formulación.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la composición de la invención es un medicamento a base de hierbas que es un producto que contiene materiales vegetales o partes de plantas como ingredientes activos en el estado bruto o 55 procesado y uno o más vehículos.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la composición de la invención es un suplemento o producto nutricional.

Con el término de "sinergismo o actividad sinérgica" se entiende una actividad que es mayor que la suma de las actividades del ingrediente activo cuando se toma solo. El sinergismo del fármaco se produce cuando dos ingredientes activos interactúan de manera que realzan o magnifican uno o más efectos, o efectos secundarios, de los mismos. En otras palabras, dos ingredientes activos que producen efectos abiertamente similares a veces producen efectos exagerados o disminuidos cuando se utilizan simultáneamente, y es necesaria una evaluación cuantitativa para distinguir estos casos de la simple acción aditiva (Tallarida RJ. "Drug synergism: its detection and applications", J Pharmacol Exp Ther. 2001 Sep; 298 (3): 865 - 72). Los efectos biológicos en los que se están focalizando son la modulación positiva del cAMP en la UEC y la consecuente inducción de la exocitosis y eliminación de UPEC. La definición farmacológica de sinergismo, cuando se traduce en términos de eventos moleculares, se refiere a menudo a la capacidad de dos sustancias bioactivas que producen sinergismo mejorando las funciones celulares mediante la obtención de vías que son originalmente distintas pero que convergen en los niveles superiores en las actividades de las células elementales que concurren en el mismo programa principal de células. En otras palabras, si hay dos maneras en las que una célula evita la muerte controlada por dos vías no relacionadas o mínimamente relacionadas A y B, el aumento de sólo A o B por dos compuestos es probable que produzca, a las dosis más altas, la saturación de la vía, y por lo tanto, un efecto combinado que es menor que el aditivo. La estimulación completa de A y B, en cambio, podría producir aditividad o incluso sinergia (a) porque todas las actividades que llevan a esa respuesta están comprometidas, (b) debido a que las interacciones cruzadas que tienen lugar donde las vías convergen pueden aumentar mutuamente o, finalmente, (c) porque la activación sincrónica de ambos permite a la célula moverse en pasos de actividad discretos pero secuenciales.

Los siguientes ejemplos se proporcionan meramente para ilustrar la presente invención.

Ejemplo 1

Composición sinérgica para prevenir o tratar infecciones del tracto urinario con la siguiente formulación:

Ingrediente activo vegetal (extracto de planta)	Solución madre	Disolvente	Solución de trabajo
Berberina	3 mg/mL	H ₂ O	1:20
Betulina	50 mg/mL	H ₂ O:DMSO (80:20)	1:10
Arbutina	50 mg/mL	H ₂ O	1:10
Forskolina (Coleus forskohlii)	50 mg/mL	H ₂ O:DMSO (80:20)	1:10
Mezcla de plantas Berberina-Betulina-Arbutina (v/v/v)	50 mg/mL	H ₂ O:DMSO (80:20)	1:10

Ejemplo 2

Propiedades antimicrobianas

Para caracterizar adicionalmente el mecanismo de invasión bacteriana a través de vesículas fusiformes, se estudió una cepa de *E. coli* fimbriada tipo 1, ORN103 (pSH2)11, y la línea BEC 5637 humana (HTB-9, ATCC).

Microorganismos probados

Se probó la susceptibilidad de las siguientes bacterias:

Lactobacillus acidophilus

E. coli O1

E. coli O2

E. coli O11

E. coli O55

Enterococcus faecalis

Proteus vulgaris

Los microorganismos se cultivaron durante la noche a 37°C en caldo Mueller-Hinton (Oxoid, Inglaterra) a pH 7,4.

Pruebas antibacterianas

La actividad antimicrobiana de los extractos brutos de diferentes plantas se determinó por el método de micro dilución líquida (van den Berge & Vlietinick 1991).

Se realizaron siete diluciones de 2 veces del extracto de la planta, se esterilizaron por filtración a través de un filtro de membrana de 0,23 µm, partiendo de la dilución indicada en la Tabla 1. Los tubos con las sustancias y el caldo se inocularon con una suspensión de microorganismos a una densidad de 10⁵ CFU por ml. Los tubos se incubaron a 37°C durante 24 h, y luego se observaron para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC). El crecimiento de los organismos se observó macroscópicamente como turbidez media y se determinó adicionalmente mediante un espectrofotómetro (Victor2-Perkin Elmer) a 620 nm. Se analizaron simultáneamente pocillos de control que contenían gérmenes sin extractos o viceversa, extractos sin bacterias. Todas las condiciones se probaron por triplicado.

Líneas celulares

Fueron cultivadas células de vejiga tumorales humanas en medio RPMI suplementado con FBS al 10%, penicilina y estreptomycin y L-glutamina en placas de cultivo de tejidos, en CO al 5% en aire en placas de 24 pocillos y crecieron hasta confluencia.

Marcaje de bacterias

Las bacterias crecidas durante la noche fueron sedimentadas, lavadas y resuspendidas en PBS estéril hasta una concentración final de 10 E6 cfu/ml y luego fueron marcadas con CFDA-SE, 5 mM a TA durante 20 min. El marcaje fluorescente se terminó por sedimentación de bacterias y lavado una vez en PBS para eliminar el exceso de CFDA-SE. Las bacterias se suspendieron suavemente en 1 ml de medio y se co-incubaron con células.

Ensayo de internalización

Las bacterias marcadas se co-incubaron con las células de vejiga durante 2 h a 37°C. Después se lavaron los cultivos dos veces con RPMI y luego se incubaron durante otras 2 h en medio que contenía el antibiótico ampicilina bactericida impermeable a membrana de 100 µg/ml con plantas a diversas concentraciones. Las células se lavaron entonces tres veces con PBS, se separaron manualmente con un raspador y finalmente se analizaron mediante el citómetro de flujo.

Medición de citometría de flujo

La intensidad fluorescente de las células de la vejiga con bacterias internalizadas se midió con el equipo FACSCanto (Becton Dickinson). Los datos obtenidos del citómetro de flujo se analizaron utilizando el software FACS Diva (Becton Dickinson).

El análisis inicial de las células se llevó a cabo en el modo de visualización de gráfico de puntos de dispersión hacia delante (FCS) frente a dispersión lateral (SSC). La FCS en el eje x es una medida del tamaño de la partícula detectada y la SSC en el eje y mide la granularidad celular. Basado en el análisis FCS v. SSC de las células y la tinción de las células con el FITC conjugado el citómetro de flujo se ajustó para incluir las células de la vejiga y para la salida de los desechos celulares y las bacterias no adherentes. Los resultados numéricos se expresan como valores geométricos medios de intensidad fluorescente (IMF) de una población de células.

Medición de la viabilidad bacteriana

Con el fin de confirmar que las células internalizadas conservaban su vitalidad, se lavó tres veces con PBS una alícuota de 500 µl de cada pocillo (tratada como se ha descrito anteriormente), se lisó en 1 ml de Triton X-100 al 0,1% en ddH₂O, se plaquéó sobre agar Muller Hinton t se incubó durante la noche a 37°C. Las colonias fueron luego contadas manualmente 18h más tarde.

Detección de AMP cíclico

Las células tumorales humanas de vejiga se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron en RPMI completo (con FCS al 10%) para permitir la adhesión y el crecimiento a la confluencia. Las células se trataron de manera similar al ensayo de internalización descrito anteriormente. El AMP cíclico se detectó mediante el kit ELISA inmunoenzimático según las instrucciones del proveedor (Arbor Assay, Michigan, EE.UU.). Brevemente, las células se lavaron con PBS y el Diluyente de la Muestra se añadió directamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se desprendieron de la superficie de la placa, se inspeccionaron para asegurar la lisis y se centrifugaron adicionalmente a $\geq 600 \times g$ a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se ensayó directamente siguiendo el protocolo suministrado por el kit ELISA.

Ejemplo 3

La línea celular uroepitelial ATCC 5637 se expuso a los compuestos de ensayo en un intervalo de dosis de entre 25 y 12:39 mg/ml, con el fin de excluir una toxicidad directa in vitro de los extractos.

Durante esta serie de experimentos (figura 1), los polvos secos fitoquímicos se solubilizaron con diferentes disolventes:

A) 100% de agua (H₂O)

B) 20% de DMSO y después se diluye adicionalmente con 80% de H₂O.

- 5 C) 20% de etanol (EtOH) y después se diluye adicionalmente con 80% de H₂O. No se observaron signos evidentes de toxicidad para dosis iguales o inferiores a 3,12 mg/ml para Arbutina y Berberina, 12,5 mg/ml para Berberina y Forskolina y 6,25 mg/ml para Betulina y 3,12 mg/ml.

A pesar de que no se revelaron diferencias significativas entre los tres disolventes ensayados, los experimentos posteriores se llevaron a cabo solubilizando los fitoquímicos en mezcla de DMSO/H₂ (20/80 v/v).

- 10 Basándose en los resultados anteriores, los extractos se mezclaron y ensayaron (figura 2) sobre una proporción variable como sigue: Arbutina (55-65%), Berberina (9-11%), Betulina (18-20%), Forskolina (9-11%). Con el fin de verificar que los fitoquímicos cuando se mezclan no exhiben toxicidad sinérgica los mismos ensayos, como se describen en la Fig. 1, se repitieron exponiendo las células a la mezcla de plantas.

- 15 La misma prueba se realizó también en presencia de 0,1 ng/ml de LPS (Fig. 2b), circunstancia que puede parecerse in vitro a la interacción entre la uroepithelia y las bacterias gram negativas, en ambas condiciones, con excepción de las tres dosis más altas, no se detectó ningún signo de toxicidad relevante.

- 20 Se ensayó la capacidad de los fitoquímicos para interferir con la adhesión de E. coli a la superficie celular (Fig. 3). Las sustancias de ensayo se ensayaron solas y en combinación de acuerdo con la misma proporción descrita anteriormente. El número de unidades formadoras de colonias (CFU) en el medio solo se asumió como 100%. Tanto la Betulina, la Berberina como la Forskolina, cuando se ensayaron solas, no ejercieron más que una reducción moderada en el recuento de bacterias adherentes.

Viceversa, la arbutina sola fue capaz de reducir el recuento hasta en un 40%, incluso a dosis bajas (3,12 mg/ml).

- 25 Del mismo modo, la mezcla de sustancias, aunque en menor medida, contrarresta la adhesión de E. coli. Además, el efecto fue detectable en ambas mezclas, lo que sugiere que este efecto era independiente de la presencia de Forskolina.

Se realizó un ensayo de internalización "canónica" (figura 4) con el objetivo de evaluar la capacidad de las sustancias de ensayo (solas o en combinación) en inducir a las células 5637 a extruir la E. coli previamente internalizada.

- 30 Como era de esperar, la Forskolina fue capaz de reducir los recuentos bacterianos de bacterias en todas las tres dosis ensayadas. En comparación, tanto Arbutina como Berberina fueron parcialmente activas incluso en menor grado.

Notables los resultados obtenidos con la mezcla de plantas.

Ambas fórmulas (con o sin Forskolina), cuando se comparan con el medio solo o con los componentes individuales, mostraron efectos sinérgicos notables en la promoción de la extrusión bacteriana.

- 35 Respectivamente, se obtuvo una reducción de CFU igual a aproximadamente el 50% con la mezcla sin FSK y hasta del 80% en la fórmula completa.

- 40 Los experimentos se repitieron (Fig. 5 a, b, c.) con una metodología diferente para confirmar los resultados obtenidos del ensayo de internalización realizado con recuento microbiológico suplementario. E. coli, pre-teñida con carbossi-fluoresceína, se dejó adherir e internalizar en células 5737. Los cultivos, tratados como se describe anteriormente y detallados en M&M, se analizaron entonces en citofluorimetría. Como se esperaba, se obtuvieron resultados similares y comparables a los microbiológicos. Una vez más, el tratamiento con la mezcla de plantas fue capaz de contrastar y reducir el proceso de internalización de E. coli. Además, esto era evidente cuando estaba presente la Forskolina, pero incluso la falta de este componente en la fórmula sólo redujo parcialmente la potencia de los efectos.

- 45 La Forskolina se utiliza comúnmente para elevar los niveles de AMP cíclico (cAMP), cuyo aumento de la producción impulsa el proceso de extrusión de las bacterias de la célula urotelial. (Fig. 6a, b) Con el fin de determinar un posible mecanismo de acción, se midieron los niveles de AMPc en cultivos de células 5637 previamente expuestas a diferentes dosis de fitoquímicos solos o en combinación.

- 50 El descubrimiento de que el cAMP regula el nicho intracelular de la UPEC ha revelado una estrategia nueva y potencialmente eficaz para combatir las ITU. Las composiciones que aumentan el cAMP dentro de las UEC aceleran el tiempo hasta la resolución de la ITU y disminuyen la morbilidad. Las farmacoterapias que aumentan el AMPc

intracelular, combinadas con los antibióticos tradicionales, pueden dar lugar a grandes beneficios clínicos en las ITU refractarias y recurrentes.

Ejemplo 4

- 5 Una composición para su uso en la prevención y el tratamiento de infecciones recurrentes del tracto urinario que tiene la siguiente formulación:

Berberina 75 mg

Forskolina (Coleous) 30 mg

Extracto de Arbutina 330 mg

Extracto de Betulina 55 mg

- 10 Agente probiótico 20 mg

Ejemplo 5

Una composición para su uso en la prevención y el tratamiento de infecciones recurrentes del tracto urinario que tiene la siguiente formulación:

Extracto de Berberina 75 mg

- 15 Extracto de arbutina 330 mg

Extracto de Betulina 55 mg

Agente probiótico 20 mg

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en la prevención y el tratamiento de infecciones agudas y/o recurrentes del tracto urinario que comprende una combinación sinérgica de Berberina, Betulina y Arbutina en una cantidad eficaz y un vehículo comestible.
- 5 2. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la berberina está en la forma de un extracto vegetal o porción de una planta que contiene Berberina.
3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la planta que contiene Berberina se selecciona de Berberis, Coptis chinensis, Phellodendron amurense, Tinospora cordifolia, Eschscholzia californica, Argemone Mexicana y sus mezclas.
- 10 4. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la arbutina está en la forma de un extracto vegetal o porción de una planta que contiene Arbutina.
5. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la planta que contiene Arbutina es una planta de gayuba.
- 15 6. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la betulina está en la forma de un extracto vegetal o porción de una planta que contiene betulina o ácido betulínico.
7. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la planta que contiene betulina pertenece a la especie Betula o corcho o alcornoque.
8. Una composición para su uso de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además Forskolina como ingrediente activo vegetal.
- 20 9. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la Forskolina está en la forma de un extracto vegetal o porción de una planta que contiene Forskolina.
10. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la planta que contiene Forskolina es Coleus Forskohlii.
- 25 11. Una composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende Arbutina, Berberina, Forskolina, betulina y/o ácido betulínico o extractos vegetales y/o porciones de plantas y/o tejidos vegetales que los contienen como ingredientes activos y un vehículo comestible.
12. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además un agente probiótico y/o al menos un ingrediente seleccionado de vitaminas, minerales, micronutrientes y mezclas de los mismos.
- 30 13. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el agente probiótico es un Lactobacillus acidophilus.
14. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en la forma de un comprimido o de un polvo opcionalmente encapsulado.
- 35 15. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la infección recurrente del tracto urinario está causada por una bacteria gramnegativa.
16. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 15, en la que la bacteria gramnegativa es Escherichia coli.

Fig. 1

	25mg/ml	12,5mg/ml	6,25mg/ml	3,12mg/ml	1,56mg/ml	0,78mg/ml	0,39mg/ml	
Arbutina (H ₂ O)		-376%	-110%	-63%	-12%	13%	0%	1%
Arbutina (DMSO y H ₂ O)		-328%	-112%	-62%	-8%	-24%	4%	-1%
Arbutina (EtOH y H ₂ O)		-348%	-72%	-39%	-6%	19%	1%	21%
Berberina (H ₂ O)		-2%	-1%	-56%	-43%	-25%	6%	11%
Berberina (DMSO y H ₂ O)		-6%	-2%	26%	6%	22%	34%	46%
Berberina (EtOH y H ₂ O)		4%	12%	9%	8%	20%	26%	20%
Betulina (H ₂ O)		13%	-14%	6%	-8%	25%	10%	11%
Betulina (DMSO y H ₂ O)		-24%	-20%	-10%	10%	7%	3%	0%
Betulina (EtOH y H ₂ O)		-17%	25%	-14%	5%	9%	0%	11%
FSK (H ₂ O)		-198%	0%	19%	2%	21%	18%	24%
FSK (DMSO e H ₂ O)		17%	6%	20%	11%	16%	14%	4%
FSK (EtOH e H ₂ O)		3%	17%	31%	-16%	2%	-14%	-14%

Fig. 2 A

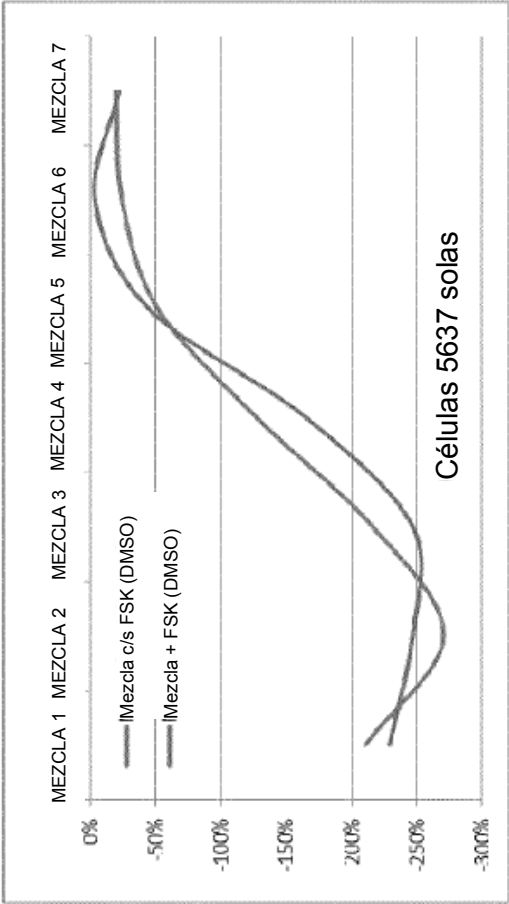
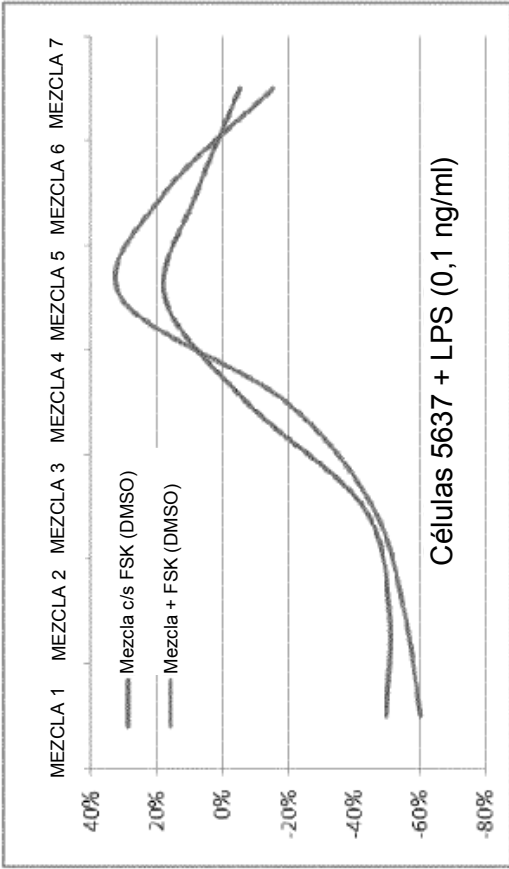


Fig. 2 B



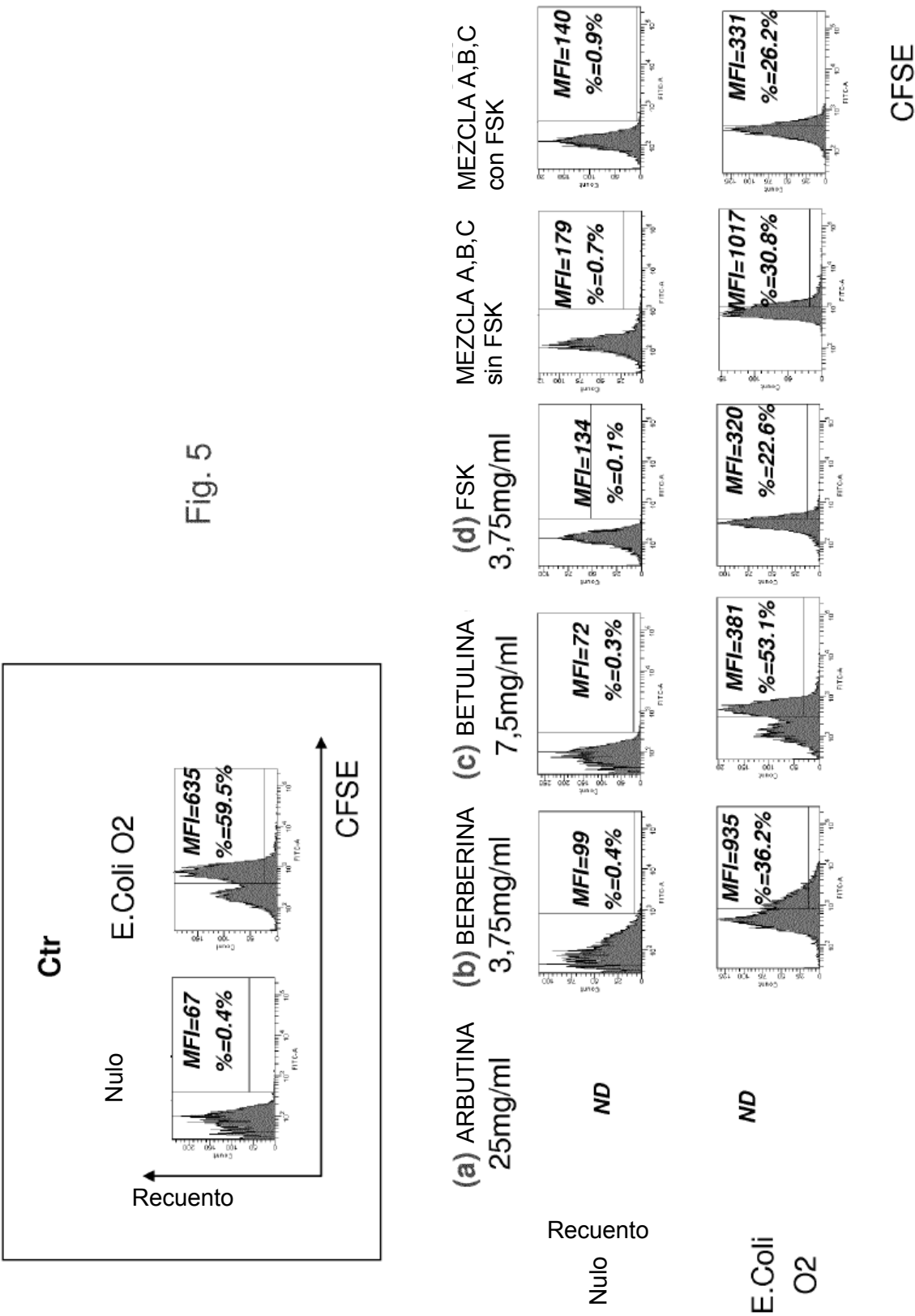
*	Arbutina	MEZCLA 1	MEZCLA 2	MEZCLA 3	MEZCLA 4	MEZCLA 5	MEZCLA 6	MEZCLA 7
	Berberina	12,5mg/ml	6,25mg/ml	3,12mg/ml	1,56mg/ml	0,78mg/ml	0,39mg/ml	0,39mg/ml
	Betulina	1,87mg/ml	0,93mg/ml	0,46mg/ml	0,23mg/ml	0,11mg/ml	0,05mg/ml	0,05mg/ml
		3,75mg/ml	1,87mg/ml	0,93mg/ml	0,46mg/ml	0,23mg/ml	0,11mg/ml	0,11mg/ml
	FSK	1,87mg/ml	0,93mg/ml	0,46mg/ml	0,23mg/ml	0,11mg/ml	0,05mg/ml	0,05mg/ml

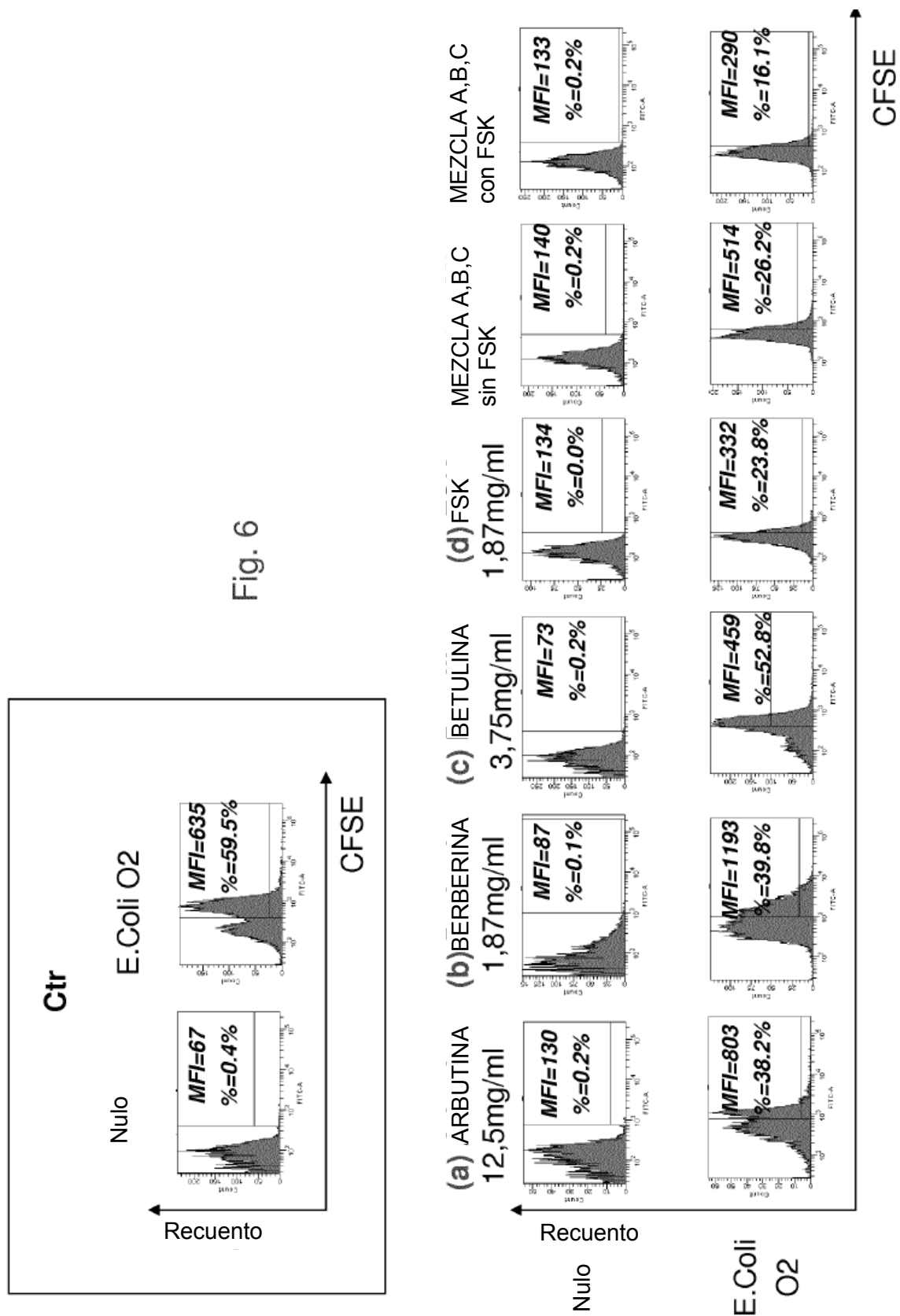
Fig. 3

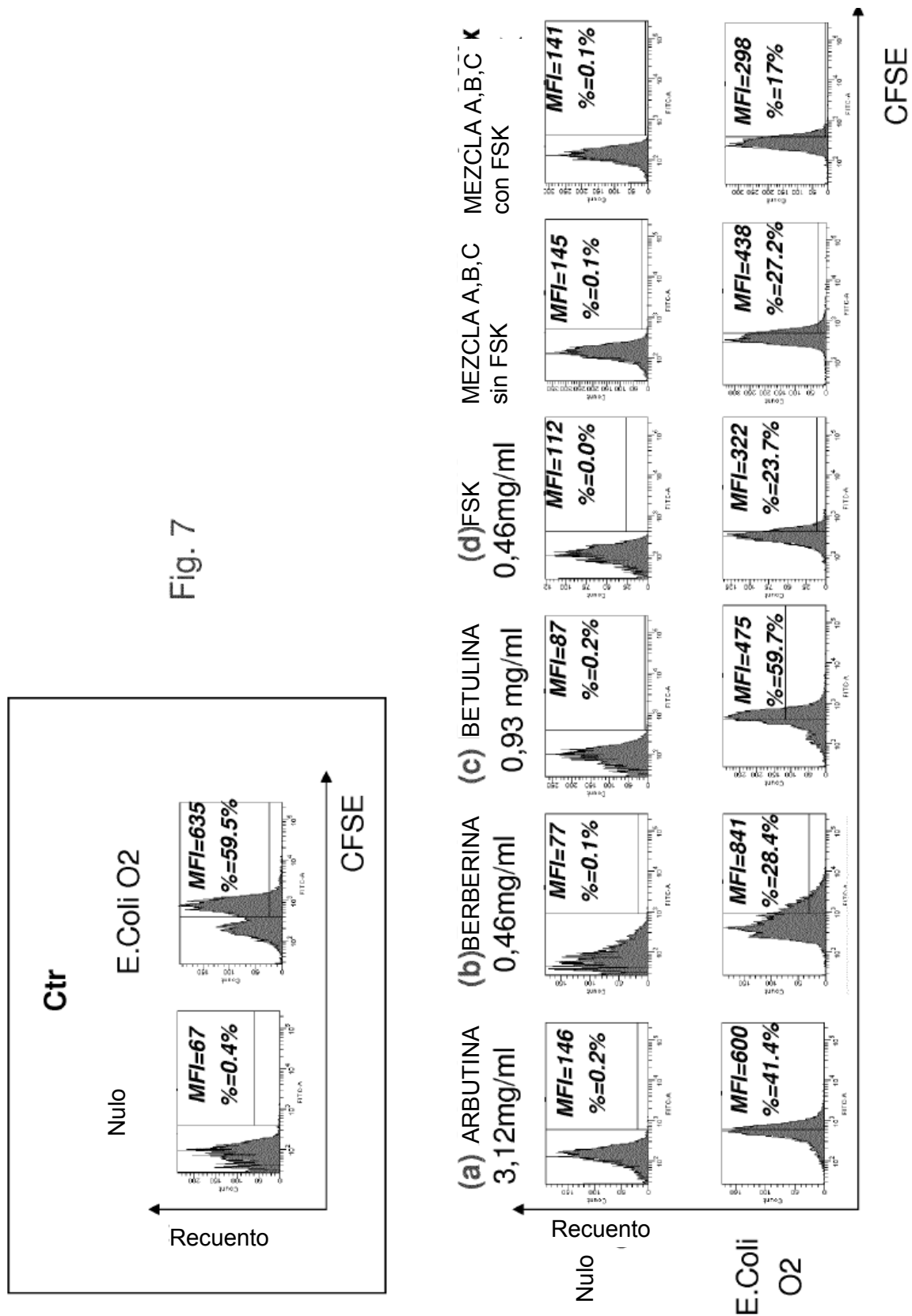
Control <i>E. coli</i> O2 100% (6500 CFU)				
ARBUTINA 25 mg/ml (a) 24% 1548 CFU	ARBUTINA 2.5 mg/ml (a) 28% 1823 CFU	ARBUTINA 3.12 mg/ml (a) 40% 2598 CFU	ARBUTINA 3.12 mg/ml (a) 36% 2340 CFU	
BERBERINA 3.75 mg/ml (b) 69% 4450 CFU	BERBERINA 1.87 mg/ml (b) 85% 5500 CFU	BERBERINA 0.46 mg/ml (b) 84% 5450 CFU	BERBERINA 0.46 mg/ml (b) 78% 5070 CFU	
BETULINA 7.5 mg/ml (c) 40% 2600 CFU	BETULINA 3.75 mg/ml (c) 39% 2550 CFU	BETULINA 0.93 mg/ml (c) 105% 6800 CFU	-----	
FORSKOLINA 3.75 mg/ml (d) 79% 5150 CFU	FORSKOLINA 1.87 mg/ml (d) 89% 5800 CFU	FORSKOLINA 0.46 mg/ml (d) 92% 6000 CFU	FORSKOLINA 0.46 mg/ml (c) 85% 5525 CFU	
MEZCLA sin FSK (a,b,c) 71% 4600 CFU	MEZCLA sin FSK (a,b,c) 72% 4680 CFU	MEZCLA sin FSK (a,b,c) 75% 4900 CFU	MEZCLA sin FSK K (a,b) 73% 4745 CFU	
MEZCLA con FSK (a,b,c) 65% 4230 CFU	MEZCLA con FSK (a,b,c) 69% 4460 CFU	MEZCLA con FSK (a,b,c) 77% 5020 CFU	MEZCLA con FSK (a,b) 80% 5200 CFU	

Fig. 4

Control <i>E. coli</i> O2 100% (3000 CFU)				
ARBUTINA 25 mg/ml (a) ND	ARBUTINA 12.5 mg/ml (a) 64% 1925 CFU	ARBUTINA 3.12 mg/ml (a) 68% 2050 CFU	ARBUTINA 3.12 mg/ml (a) 70% 2100 CFU	
BERBERINA 3.75 mg/ml (b) 62% 1850 CFU	BERBERINA 1.87 mg/ml (b) 65% 1960 CFU	BERBERINA 0.46 mg/ml (b) 48% 1450 CFU	BERBERINA 0.46 mg/ml (b) 52% 1560 CFU	
BETULINA 7.5 mg/ml (c) 87% 2600 CFU	BETULINA 3.75 mg/ml (c) 85% 2550 CFU	BETULINA 0.93 mg/ml (c) 100% 3000 CFU	-----	
FORSKOLINA 3.75 mg/ml (d) 38% 1150 CFU	FORSKOLINA 1.87 mg/ml (d) 40% 1200 CFU	FORSKOLINA 0.46 mg/ml (d) 37% 1100 CFU	FORSKOLINA 0.46 mg/ml (c) 42% 1260 CFU	
MEZCLA sin FSK (a,b,c) 53% 1600 CFU	MEZCLA sin FSK (a,b,c) 43% 1300 CFU	MEZCLA sin FSK (a,b,c) 47% 1400 CFU	MEZCLA sin FSK (a,b) 45% 1350 CFU	
MEZCLA con FSK (a,b,c) 45% 1350 CFU	MEZCLA con FSK (a,b,c) 27% 800 CFU	MEZCLA con FSK (a,b,c) 28% 850 CFU	MEZCLA con FSK (a,b) 32% 960 CFU	







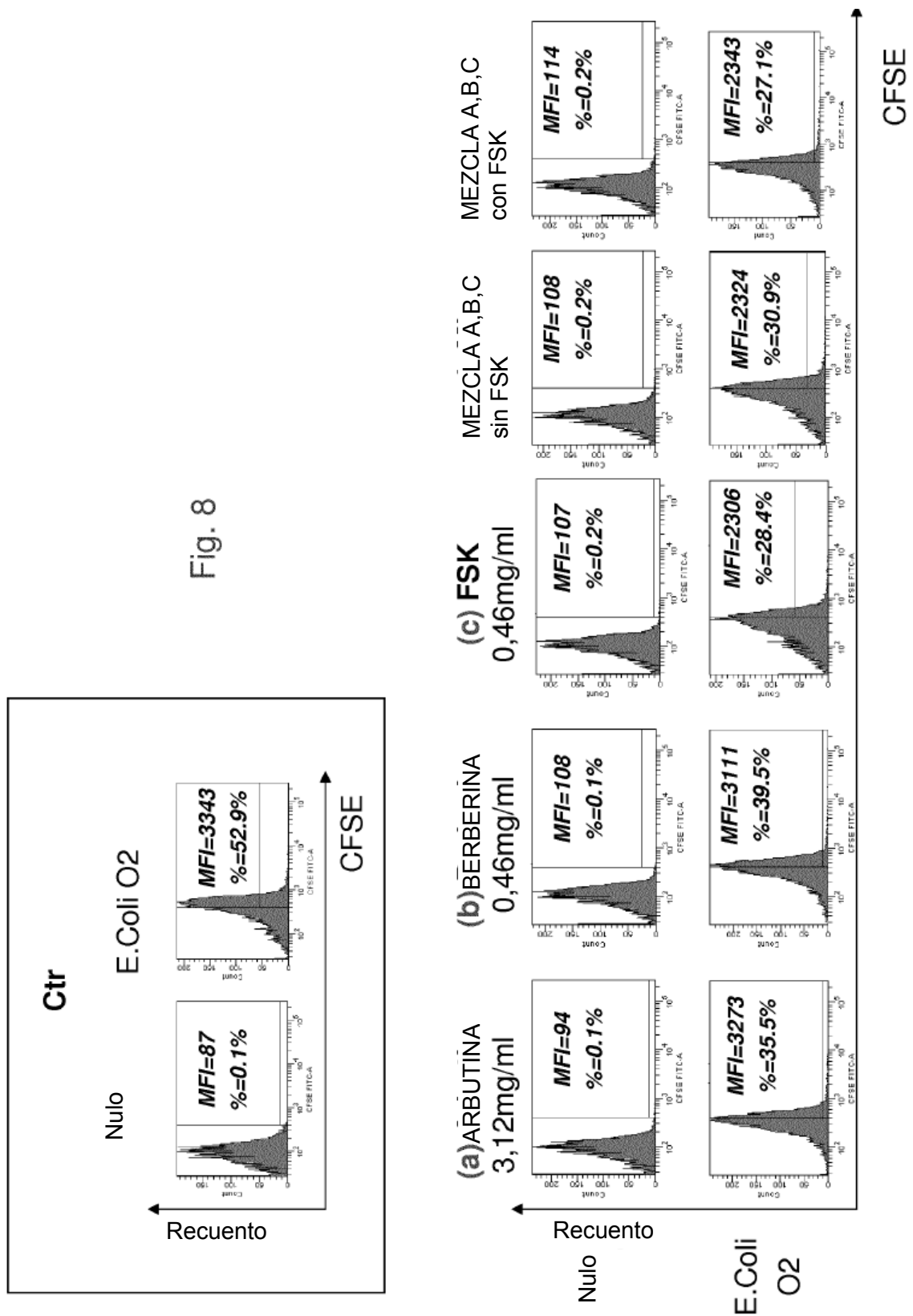


Fig. 9

