

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 723 576**

51 Int. Cl.:

A61K 31/192 (2006.01)

A61K 35/644 (2015.01)

A23L 21/20 (2006.01)

A23L 33/10 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2016 E 16382378 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 3278798**

54 Título: **Composición sinérgica que comprende propóleo y ácido carnósico para uso en el tratamiento y la prevención de infecciones causadas por especies del hongo *Cryptococcus neoformans***

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.08.2019

73 Titular/es:

VITALGAIA ESPAÑA, S.L. (100.0%)
Calle Acisclo Díaz N°2, Escalera B, Entresuelo 2°
30005 Murcia, ES

72 Inventor/es:

LOZANO TERUEL, JOSÉ ANTONIO;
ARGÜELLES ORDÓÑEZ, JUAN CARLOS;
ARGÜELLES PRIETO, ALEJANDRA;
SÁNCHEZ-FRESNEDA PINTO, RUTH;
GUIRAO ABAD, JOSÉ PEDRO y
ALBURQUERQUE GONZALEZ, BEGOÑA

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 2 723 576 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 sinérgica que comprende propóleo y ácido carnósico para uso en el tratamiento y la prevención de infecciones causadas por especies del hongo *Cryptococcus neoformans*

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a la prevención y el tratamiento de meningitis, neumonía y otras infecciones causadas por especies del hongo oportunista *Cryptococcus neoformans*, en humanos y animales. De forma particular, la presente invención se refiere a una composición sinérgica que comprende propóleo y ácido carnósico para su uso en la aplicación mencionada, tal y como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

- 10 El solicitante ha probado formulaciones antimicrobianas con otras sustancias, por ejemplo, la bromelaína, el galato de epigalocatequina o la Malaleuca alternifolia. Estas formulaciones no tuvieron resultados satisfactorios.

- La sinergia por definición, según texto adaptado del original inglés escrito por Barb Reutenbach significa que la interacción combinada de las partes crea un efecto mayor que la suma de ellas. Efectivamente, en el mismo sentido expuesto en el concepto que acabamos de mostrar de sinergia, nos encontramos que la esencia "teoría general de los sistemas (TGS)", planteada inicialmente por el biólogo Bertalanffy y llevada a nuevos y superiores niveles como Ervin Laszlo, es que en un sistema viviente se pueden generar sinergias, pero el efecto de estas interacciones sobrepasa el ocasionado por la suma de la acción de las partes aisladas.
- 15

- La sinergia permite obtener un resultado superior a la simple suma de las partes. El término proviene de la palabra griega "sin" que significa con y "ergos" que significa trabajo. La sinergia incluye también formas de colaboración que tocan lo más profundo de nuestra naturaleza humana, como el pensamiento creador y el propósito consciente. Peter Andrew Corning, director del Instituto para el Estudio de los Sistemas Complejos de Washington, en su documento "The Synergism hipótesis: On the Concept of Synergy and its Role in the Evolution of Complex Systems", profundizó en una línea introducida por Bertalanffy, con su hipótesis de la sinergia como fuente de creatividad en la evolución biológica, y ha jugado un papel central en el desarrollo de complejidad organizativa en la naturaleza; de suerte que la sinergia es un fenómeno que lleva aparejada la creatividad y complejidad.
- 20
- 25

- Trasladado este concepto sinérgico y los predicados que le acompañan al mundo de las infecciones fúngicas, nos encontramos con que las micosis han experimentado un crecimiento dramático en las dos últimas décadas, asociado al aumento de la población mundial que sufre situaciones de inmunodepresión. Dichas infecciones se caracterizan por su duración y persistencia en el cuerpo humano. Por otra parte, su tratamiento terapéutico resulta complicado porque hongos y seres humanos compartimos el mismo patrón de organización celular (organismos eucariotas), lo que impide una elevada toxicidad selectiva de los antifúngicos, así como la resistencia que se viene registrando en la práctica clínica. Por tanto, la máxima dificultad que las micosis le han planteado a la ciencia según revela el estado actual de la técnica era el tiempo de curación, convirtiéndose ello en el obstáculo más difícil de superar para su erradicación, pues así como en el mundo de las bacterias tratadas con antibióticos el abordaje de las mismas en procesos infecciosos es relativamente corto, el escenario se complica cuando nos enfrentamos a una infección fúngica o por levaduras oportunistas, como *Candida*, capaces de cohabitar en el cuerpo del hospedador durante meses o años, y que pueden dar lugar a procesos fatales si desembocan en una candidemia o septicemia generalizada.
- 30
- 35

- Ante un problema tan complejo, no cabe ninguna duda que aquello que goza de más mérito en el campo de la lucha antifúngica es encontrar un mecanismo de acción sinérgica que en el más breve espacio de tiempo lograra combatir las infecciones por *Candida* sp. y otros hongos patógenos, pues ello es lo que merecería el calificativo de máxima altura inventiva en el ámbito de la lucha contra las infecciones fúngicas. Pues bien, la sinergia ácido carnósico-propóleo que ha solicitado Vitalgaia para obtener la patente es la única en el estado actual de la técnica que consigue una marcada acción fungicida en una hora, quedando demostrado científicamente que no es una mera suma o adición de los efectos de dos compuestos aislados individualmente, sino que se ha acreditado matemáticamente la sinergia de modo científico a través del correspondiente isoblograma.
- 40
- 45

- Las patologías causadas por hongos oportunistas se han incrementado drásticamente en las últimas décadas. Datos de la OMS estiman una incidencia de dos millones de nuevos casos por año, con una tasa de mortalidad en torno al 20-40%, dependiendo del escenario. El segmento de población inmunocomprometida es el más susceptible a las micosis septicémicas, incluyendo pacientes de SIDA o sometidos a intensas terapias antitumorales y antibióticas, así como aquellos tratados en unidades de cuidados intensivos. Varias circunstancias explican este agravamiento: la escasa disponibilidad de antifúngicos seguros y eficaces; el aumento de resistencia frente a los compuestos convencionales, y el asilamiento creciente de nuevas cepas responsables de brotes nosocomiales, como las especies "no-albicans" del género *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus*. Éste último hongo será objeto de la presente patente.
- 50

Biología general de *Cryptococcus*

Es una levadura capsulada perteneciente a la clase Basidiomycetes, y el agente etiológico de la meningitis criptocócica, una micosis oportunista potencialmente grave en pacientes inmunodeprimidos, principalmente infectados con el VIH (SIDA), aunque también puede afectar a individuos inmunocompetentes (Crowe *et al.*, 1991; Currie y Casadevall, 1994). Incluye dos especies: *C. neoformans*, un microorganismo con distribución universal que se encuentra, sobre todo, en hábitats naturales procedente del guano de paloma, de las deyecciones de diferentes aves y murciélagos, y barrizales (Casadevall y Perfect, 1998). En contraste, *Cryptococcus gattii*, afecta con frecuencia a personas sanas, causando neumonía en la mayoría de los casos. Se aísla generalmente de áreas subtropicales o tropicales, aunque se ha recuperado en regiones más templadas, con un incremento en los últimos años en algunas zonas del Pacífico Norte. Ambos tienen una prevalencia notable en los países en vías de desarrollo.

Importancia clínica

La patología más grave es la denominada meningitis (meningoencefalitis) criptocócica o criptococosis (Casadevall y Perfect, 1998). El contagio se inicia por inhalación de los blastoconidios (formas levaduriformes) o esporas de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*, siendo el pulmón es el primer órgano colonizado. Determinados serotipos tienen un mayor grado de virulencia (Casadevall and Perfect 1998, Velagapudi et al 2009). La evolución de la enfermedad depende de la respuesta inmune del huésped, siendo controlada en individuos sanos, salvo complicaciones. Sin embargo, la levadura puede replicarse en el interior de los macrófagos, actuando como un reservorio y permaneciendo en estado latente durante años. En condiciones de inmunosupresión (principalmente con un descenso en el número de linfocitos T) se produce una colonización invasiva que conlleva la diseminación desde los pulmones a través del torrente sanguíneo y su alojamiento en el sistema nervioso central, donde causa meningitis y meningoencefalitis, resultando fatal si no es tratada adecuadamente.

Los principales factores de virulencia de *Cryptococcus* son una cápsula externa de polisacárido con actividad antifagocitaria y la capacidad para acumular melanina. También presenta otras propiedades, como la producción de ureasa y fosfolipasas que le confieren cierta ventaja para su supervivencia en el interior del huésped. Aunque la morfogénesis es un rasgo común a muchos hongos patógenos, *Cryptococcus* no forma hifas ni pseudohifas, si bien durante la colonización *in vivo* experimenta cambios morfológicos relevantes en la morfología celular. Los principales son: A) Ensanchamiento de la cápsula externa; y B) Crecimiento global de las células, dando lugar a la formación de células "gigantes o titanes". Los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de estos procesos no son todavía conocidos.

Las infecciones producidas por *C. neoformans* han sido una importante causa de morbilidad y mortalidad en pacientes VIH, ya que entre el 5-10% de los individuos con linfopenia CD4+

desarrollaron criptococosis a finales del siglo XX (Casadevall y Perfect, 1998). Aunque la incidencia de la criptococosis ha disminuido significativamente en los países desarrollados gracias a la introducción de la terapia antiretroviral con alta actividad (HAART), la mortalidad asociada sigue siendo elevada (Chottanapund *et al.*, 2007; Dromer *et al.*, 2007; Friedman *et al.*, 2005; Jongwutiwes *et al.*, 2007; Lortholary *et al.*, 2006; Mirza *et al.*, 2003). En regiones en vías de desarrollo, la incidencia de la criptococosis está lejos de estar controlada, estimándose en 720.000 nuevos casos al año en el África sub-sahariana y 120.000 en el sudeste asiático (Park *et al.*, 2009). En estas zonas, junto con Latinoamérica y el Caribe, la mortalidad oscila entre el 55-70%, ascendiendo el número anual de muertes a más de 650.000 personas. *Cryptococcus gattii* se ha asociado clásicamente con la corteza de los eucaliptos (Fortes *et al.*, 2001) y parece tener una distribución global diferente a *C. neoformans*, localizándose en áreas de clima tropical y subtropical, pero estudios recientes indican que *C. gattii* podría tener una distribución más amplia (Campbell *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008). Como *C. neoformans*, *C. gattii* se adquiere por inhalación. Sin embargo, la principal diferencia entre ambas especies es que *C. gattii* afecta a personas inmunocompetentes y no está asociado a la infección por VIH (Sorrell, 2001). En algunas regiones, como el norte de Brasil, *C. gattii* es endémico y se le atribuye el 60% de los casos de criptococosis (Nishikawa *et al.*, 2003).

Su cuadro clínico más característico es una neumonía generalizada con daño pulmonar severo, detectándose meningitis en una minoría de los casos en los que suele haber algún defecto inmunológico (Harris *et al.*, 2011; Ngamskulrungronj *et al.*, 2012). La criptococosis pulmonar se caracteriza por un cuadro febril de disnea, tos seca, sudoración nocturna y deterioro respiratorio progresivo, ocasionalmente fulminante. Las formas pulmonares graves presentan riesgo de diseminación al SNC y otras localizaciones, especialmente a la piel. El principal factor de riesgo es la infección por VIH, especialmente con niveles de linfocitos CD4 por debajo de 100 células/mm³, dominando el cuadro clínico la afectación del SNC. En otros estados de inmunosupresión, como las enfermedades pulmonares crónicas, pacientes con corticoterapia prolongada o receptores de trasplante de órgano sólido, se produce un cuadro de predominio respiratorio.

Pese a constituir únicamente el 1% de todas las infecciones de criptococosis mundiales, *C. gattii* cobró gran importancia cuando se descubrió en 1999 que esta especie era el agente causante de un brote detectado en la isla

de Vancouver, Canadá (Hoang *et al.*, 2004). Estas cepas infectivas se han extendido en la actualidad a otras regiones del Canadá y al Noroeste del Pacífico (Byrnes y Marr, 2011; Galanis y Macdougall, 2010). Por ello, el estudio de la virulencia de *C. gattii* es un tema de gran interés para la comunidad científica.

Función de la respuesta inmune

- 5 Resulta crucial que el sistema inmune del hospedador responda correctamente para erradicar o limitar la expansión de los patógenos fúngicos desde los pulmones antes de que ocurra una diseminación extensiva. Para ello, el hospedador cuenta de forma innata con las células fagocitarias pulmonarias como primera línea de defensa. Dichas células incluyen macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. Cuando el hongo es reconocido por fagocitos, éstos absorben y neutralizan el organismo invasor formando el fagosoma, que madurará, se adicificará y seguidamente se fusionará con un lisosoma dando lugar a la destrucción del hongo. Sin embargo, *Cryptococcus* ha desarrollado mecanismos y factores de virulencia para evitar su eliminación, y aunque ha sido esbozado en apartados anteriores, es importante destacar la compleja y elaborada estructura de su cápsula, formada principalmente por glucuronoxiloman (GMX), galactoxilomanan (GalXM) y manoproteínas ancladas a la pared celular, que también incluye quitina, chitosán, glucanos y glicoproteínas.
- 10
- 15 La cápsula es dinámica y durante la infección aumenta de grosor drásticamente. Adicionalmente, sirve para evitar que *Cryptococcus* sea reconocido como patrón molecular asociado a patógeno (PAMPs) permitiéndole evadir al sistema inmune y la fagocitosis. Además, facilita su protección frente a las especies reactivas del oxígeno (ROS) y los péptidos antimicrobianos y posee propiedades antifagocíticas que intervienen en la opsonización. Otro mecanismo empleado por este hongo es su habilidad para formar "células titán" como también se ha descrito anteriormente (Zaragoza *et al.*, 2010).
- 20

Finalmente, cabe destacar la producción de melanina por "laccasas" como otro factor de virulencia de ambas especies pues sirve para proteger al organismo del estrés oxidativo dentro del fagolisosoma mediante la rotura y transformación de sustratos dañinos del hospedador en reactivos intermedios que pueden dañar al propio hospedador.

Diagnóstico y aislamiento

- 25 El patrón radiológico habitual de *Cryptococcus* es de afectación nodular múltiple. Las formas reticulonodulares son más propias de los cuadros invasivos. También es posible la afectación como consolidación lobar o segmentaria. Pueden aparecer adenopatías torácicas. El derrame pleural o la cavitación son excepcionales.

Su presencia como colonizador no suele ser frecuente, por lo que su aislamiento en cultivo de esputo o LBA en el contexto clínico es suficiente para el diagnóstico. La determinación de antígeno de *Cryptococcus* en plasma es muy útil, pero puede ser negativa en las formas pulmonares limitadas. La detección de antígeno en esputo o LBA muestra resultados inconsistentes. El estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR) se realiza mediante tinción de tinta china, detección de antígeno y/o cultivo. La punción lumbar no se recomienda como rutina en todas las formas pulmonares, sino sólo en presencia de síntomas neurológicos, inmunodepresión grave, datos de diseminación, o títulos altos de antígeno en suero.

30

35 Tratamiento

El tratamiento de las formas pulmonares ha sido poco estudiado y las principales recomendaciones se basan en la experiencia terapéutica de la afectación del SNC en pacientes con infección por VIH. En pacientes asintomáticos no está indicada la aplicación de antifúngicos, en cuadros respiratorios leves o moderados se recomienda fluconazol durante 6-12 meses. En cuadros graves o con afectación del SNC se recomienda al menos 2 semanas de terapia combinada con anfotericina B y fluorocitosina. Tras ese tratamiento se procede a monitorizar con fluconazol durante 6-12 meses. La duración del tratamiento se debe individualizar en función de los factores de riesgo y de si ha revertido el estado de inmunosupresión. Así, en sujetos con VIH debe mantenerse hasta controlar la replicación viral y obtener una cifra de linfocitos CD4 (>100 células/mm³) de forma estable. Además, se debe retrasar al menos 4-8 semanas el inicio de la terapia antirretroviral para evitar el síndrome de reconstitución inmune, subrayándose una vez más el difícil equilibrio inmunológico que se requiere en el manejo de las micosis oportunistas.

40

45

Un inconveniente reside en que numerosas cepas patógenas de *C. neoformans* son refractarias a la aplicación de equinocandinas, que actúan como inhibidores específicos de la glucan sintetasa, implicada en la síntesis del β -(1,3)-glucano, componente principal de la pared fúngica. Esta circunstancia se está intentando resolver con las nuevas formulaciones.

50 Terapia basada en sustancias naturales

A pesar de que principios activos de extractos de origen natural como los procedentes de las siguientes plantas: *Cuminum cyminum*, *Salvadora persica*, *Syngonanthus nitens*, *Tulbaghia alliacea*, *Alternaria alternata*, *Trichoderma*

spp., *Arthrimum arundinis*, *Selaginella tamariscina*, *Glycyrrhizine* y *Citrus bergamia*, han sido estudiados en diferentes experimentos científicos, ninguno ha demostrado ser un agente antifúngico eficaz frente a infecciones por *Cryptococcus* (citas relevantes en la sección "Referencias").

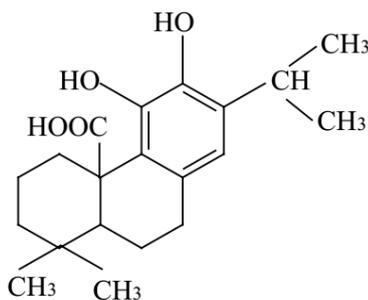
5 En el mundo de la investigación, como en la aplicación de la misma a las patologías existentes en la materia que nos ocupa existen lagunas de aplicación y eficacia. En este sentido, en el estado actual nos encontramos con que cada patología y dolencia es tratada de modo sectorial e individual; de suerte que es diferente el principio activo utilizado para tratar de combatir la piorrea, la criptococosis o la caries por *Streptococcus mutans*. Las soluciones ofrecidas son pues unilaterales y segmentadas. En el caso de la meningitis criptocócica, los escasos principios activos ofertados no sólo no contemplan pérdidas globales de funcionalidad, sino que actualmente no hay patentado ningún producto que
10 la combata totalmente, porque cada principio activo único o las combinaciones ensayadas, han fracasado en su noble y loable propósito de eliminar la patología.

El diseño de una estrategia efectiva frente a la actividad perniciosa de las especies de *Cryptococcus* descritas, exige una concepción de doble vertiente, molecular por un lado y multidiana por otro. La combinación de extractos o productos naturales escogidos al azar no conduce en ningún caso a la obtención de resultados positivos, adecuados
15 y susceptibles de ser aplicables en la realidad clínica.

Las labiadas son una fuente incesante de sustancias naturales con probado valor terapéutico. Se trata de una amplia y singular familia de plantas y arbustos angiospermos dicotiledóneos, caracterizados por tener un tallo cuadrado, hojas opuestas y decusadas, flores hermafroditas, frecuentemente zigomorfas, de vistosa coloración, cáliz persistente y corola con los pétalos soldados (gamopétala), cuyo extremo finaliza en dos partes o labios (bilabiadas), el superior
20 formado por dos pétalos y el inferior por tres. En cuanto a su fruto, éste es seco y formado por cuatro núculas. Ejemplos ampliamente conocidos son el romero, la albahaca, el espliego, el tomillo y la salvia.

La bibliografía existente recoge diversos estudios en los que se emplean compuestos procedentes de *Rosmarinus officinalis* (romero) frente a criptococosis, pero utilizando siempre la fracción de aceite esencial que contiene exclusivamente monoterpenos: cineol, canfor, borneol, verbenona, etc... y no la fracción polifenólica que contiene los
25 diterpenos, y otros compuestos como triterpenos y derivados del ácido cafeico.

En nuestras investigaciones se empleó un extracto alta y específicamente enriquecido en diterpenos (en concentración superior al 80%) y sobre todo en ácido carnósico (en concentración superior al 70%), con la presencia adicional de pequeñas proporciones de carnosol y otros diterpenos de estructura similar. El ácido carnósico, cuya estructura se muestra más abajo, es un diterpeno fenólico que se extrae de las hojas de la planta de romero (*Rosmarinus officinalis*)
30 y sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas, neuroprotectoras y antiinflamatorias, así como su efecto conservante de productos de diversa índole, son ampliamente conocidos.



Fórmula química del ácido carnósico

35 Actualmente la información bibliográfica que se tiene sobre los mecanismos de actuación de este compuesto multifuncional es la que se detalla a continuación:

- No bloquea la liberación de histamina.
- Reduce la liberación de NO, PGE₂, TNF-alpha desencadenado por PGN.

- Suprime a nivel de transcripción la respuesta inflamatoria. Src/Syk podrían ser el objetivo de dicha respuesta, ya que suprime la actividad kinasa de éstas.
- Es un potente quimioprotector frente a la carcinogénesis oral, probablemente debido a su potencial antilipo-peroxidativo y al efecto modulador en la detoxificación carcinógena de enzimas durante la carcinogénesis oral DMBA-inducida.

5

En la actualidad, el uso de extractos de romero ricos en diterpenos se centra exclusivamente en su aplicación como agentes antioxidantes, capaces de prevenir la oxidación, el “enranciamiento” de lípidos y algunas proteínas, sin embargo su uso como agentes “antimicrobianos” es casi nulo. En cuanto a los propóleos, es bien conocido que se trata de un producto natural producido por las abejas, como resultado de la adición de secreciones mandibulares a las resinas recolectadas por éstas de diferentes plantas. En la colmena son utilizados para reducir las entradas, sellar grietas y embalsamar organismos muertos. Su composición es muy variable, dependiendo del lugar de recolección, de las plantas utilizadas para su producción y de la especie concreta de abeja. Entre sus propiedades destacan: acción antimicrobiana, antioxidante y antitumoral.

10

Se tiene constancia de un cierto número de estudios científicos sobre el uso de propóleos de distinta naturaleza en el tratamiento de ciertas infecciones fúngicas. Sin embargo, aunque dichos estudios sugieren que estos extractos poseen cierta potencialidad antifúngica, ninguno de ellos asevera de forma concluyente una aplicación efectiva, fiable y segura para la erradicación de los diferentes tipos de criptococosis.

15

En definitiva, a través de evidencias experimentales obtenidas en la presente invención, se demuestra que sólo la combinación adecuada de ambos extractos muestra una eficacia fiable en el potencial tratamiento de meningitis criptocócica. Los resultados obtenidos permiten concluir la existencia de una significativa sinergia molecular entre el ácido carnósico (diterpenos) junto con los polifenoles y flavonoides presentes en los propóleos, superando incluso la variabilidad habitual en la distribución de polifenoles de éstos últimos.

20

Debemos reiterar que, actualmente, el número de antifúngicos sintéticos/farmacológicos como de productos naturales destinados a erradicar la criptococosis está aumentando, en paralelo con la alta prevalencia de esta levadura en infecciones nosocomiales del ser humano. Sin embargo, la eficacia de estos compuestos no es capaz de resolver el problema socio-sanitario existente. Y, a pesar de los esfuerzos de la comunidad científica, todavía no se ha podido obtener un producto realmente efectivo. Al respecto, cabe destacar algunas familias de antifúngicos comercializados a nivel internacional, que se describen en función del principio activo que contienen y su vía de administración:

25

Vía oral

30

- Fluconazol: comercializado también como Fluconazol Apotex, Diflucan y Gynflu-P.
- Micostantina: comercializado también como Nistatina, Bio-Statin o Micostatin.
- Itraconazol: comercializado también como Sopranos.
- Anfotericina B: disponible como Ambisome.
- Ketoconazol: comercializado también como Nizoral.

35

- Voriconazol: comercializado también como Vfend.
- Nilstat: comercializado también como Infestat, Korostatin, Mycostatin, Mykinac, Nysert, Nystalocal, Nystamont, Nystan, Nystatin, Nystex, Nystop.
- Candifix
- Claritromicina.

40

- Terbinafina: comercializado también como Lasimil.
- Micafungina.

Vía tópica

- Clotrimazol: comercializado también como Ginecanestén, Glynclox Lafrancol y Lotrimil.

- Miconazol: comercializado también como Daktarin y Gynflu-P
 - Secnidazol: comercializado también como Gynflu-P.
 - Clindamicina: comercializado también como Gynclox Lafrancol.
 - Micostantina: comercializado también como Nistatina, Bio-Statin o Micostatin.
- 5
- Econazol.
 - Fenticonazol.
 - Ketoconazol: comercializado también como Nizoral.
 - Sertaconazol.
 - Tioconazol.
- 10
- Terbinafina: comercializado también como Lasimil.

Vía parenteral

- Anfotericina B.
 - Voriconazol: comercializado también como Vfend.
 - Claritromicina.
- 15
- Caspofungina.
 - Micafungina.

Óvulos

- Butoconazol: comercializado también como Femstat.
 - Clindamicina: comercializado también como Gynclox Lafrancol.
- 20
- Nistatina.
 - Ketoconazol: comercializado también como Nizoral.

25 En cuanto a potenciales sustancias de origen natural, existen en el mercado composiciones anti-criptocócicas, de escasa efectividad y sin una base científica que sustente sus previsibles efectos antifúngicos, ya que no se han realizado pruebas experimentales concluyentes. Se pueden encontrar productos de esta clase tanto de naturaleza probiótica (*Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus acidophilus*, etc.) como de origen vegetal (extracto de semilla de pomelo, aloe vera, ajo, etc.), dando lugar a mezclas heterogéneas sin una sinergia establecida, siendo simples “cócteles” que intentan cubrir espectros de acción de forma aleatoria y poco eficaz, obteniéndose productos eminentemente comerciales.

30 Debido a que dichas mezclas son complejas e inespecíficas tanto en su composición como en sus mecanismos de acción, algunas han llegado incluso a incluir -sin ningún fundamento sinérgico-, entre sus más de quince o veinte compuestos, el propóleo o algunos extractos de plantas labiadas conteniendo polifenoles del ácido cafeico, pero no de naturaleza diterpénica (ausencia de ácido carnósico y otros diterpenos). Dichos productos se comercializan en tiendas de naturopatía y portales inespecíficos de venta online, sin ningún fundamento médico ni científico. Cabe citar a modo de ejemplo: “Puri-corp”, “Holoprolis spray”, “Candaway”, “Candinorm” o “Candi clear”.

35 A diferencia de los casos citados, en la presente solicitud, los ensayos experimentales realizados de forma rigurosa y estandarizada, demuestran la efectividad de la formulación propuesta, concluyendo que la magnitud de la sinergia resultante sobrepasa notablemente los productos anticriptococosis de mayor impacto empleados hasta ahora. Además de sustentarse en rotundas pruebas científicas, la presente solicitud no se fundamenta en una mezcla inespecífica

que dé lugar a un “cóctel” que abarque unos amplísimos campos de actuación, para garantizar que al menos alguno de los compuestos adicionados sea realmente efectivo en la aplicación deseada, sino que se han seleccionado de forma específica, tras un cuidadoso análisis los dos compuestos que conforman la base de la patente y su aplicación concreta.

5

Hasta la fecha, no ha sido localizado ningún documento en el estado de la técnica que describa el uso de los principios activos aquí empleados para combatir las meningoencefalitis criptocócicas en sus diferentes manifestaciones.

Descripción de la invención

10 La presente solicitud presenta un alto grado de innovación en su composición química, como demuestran las siguientes evidencias.

- No hay ningún documento en el estado de la técnica, en relación con el objeto de la presente invención, que haya descrito la utilización de extractos de plantas labiadas con contenidos de diterpenos en proporciones superiores al 80% y con una concentración de ácido carnósico superior al 70% combinados con extractos de propóleo conteniendo polifenoles totales a una concentración entre 70 y 90% en peso.

15 - En la presente invención no se ha utilizado aceite esencial de romero ni en modo alguno incluimos el ácido carnósico para fines de evitar la oxidación o el envejecimiento. Por tanto, la presente composición se dirige a tratar las criptocosis en todas sus formas y manifestaciones, ya sean tópicas o sistémicas, probando de modo riguroso, exacto y científico nuestras afirmaciones a través de la muerte celular de *Cryptococcus* observada en los ensayos de cinética y dosis-respuesta que sustentan esta solicitud.

20 La presente invención proporciona una composición sinérgica que comprende

- Propóleo. Incluye polifenoles a una concentración entre 70 y 90% en peso respecto al propóleo y
- ácido carnósico,

25 para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones causadas por especies del hongo oportunista *Cryptococcus neoformans* seleccionadas del grupo que consiste en criptocosis, meningitis y neumonías en humanos y/o en animales.

La invención también se define como un método de prevención y/o tratamiento de infecciones causadas por especies del hongo oportunista *Cryptococcus neoformans* seleccionadas del grupo que consiste en criptocosis, meningitis y neumonías en humanos y/o en animales, que implica administrar una composición sinérgica que comprende

- propóleo que comprende polifenoles a una concentración entre 70 y 90% en peso respecto al propóleo y

30 - ácido carnósico.

La invención también se define como el uso de una composición sinérgica que comprende

- propóleo que contiene polifenoles a una concentración entre 70 y 90% en peso respecto al propóleo y
- ácido carnósico,

35 para fabricar un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de infecciones causadas por especies del hongo oportunista *Cryptococcus neoformans* seleccionadas del grupo que consiste en criptocosis, meningitis y neumonías en humanos y/o en animales.

Otra realización es una composición sinérgica que consiste en:

- propóleo que comprende polifenoles a una concentración entre 70 y 90% en peso respecto al propóleo y
- ácido carnósico,

para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones causadas por especies del hongo oportunista *Cryptococcus neoformans* seleccionadas del grupo que consiste en criptococosis, meningitis y neumonías en humanos y/o en animales

5 La composición sinérgica para uso de la invención se emplea, mediante la administración de una dosis efectiva, como producto fundamental para prevenir y/o combatir la criptococosis en las mucosas del tracto vaginal, tanto en forma de gel, crema, ungüento y óvulos como de toallitas higiénicas.

10 La composición sinérgica para uso de la invención se emplea, a través de la administración de una dosis efectiva, como producto fundamental para prevenir y/o combatir las criptococosis en casos en que aparece como agente patógeno muy virulento, como sucede cuando el sistema inmune sufre depresión o debilitación severa, en pacientes sometidos a cirugía intensiva, receptores de trasplantes o vigilados en unidades de cuidados intensivos, neonatos, ancianos y personas sujetas a terapia antitumoral o tratamientos antibióticos prolongados; así como la aparición de criptococosis invasivas en afectados de SIDA y septicemia.

15 La combinación de propóleo que comprende polifenoles a una concentración entre 70 y 90% en peso respecto al propóleo y ácido carnósico también se emplea como ingrediente bioactivo en la preparación de dispositivos y objetos para mascotas, así como en diversas aplicaciones veterinarias.

Otra realización es la composición sinérgica para uso de la invención, donde la concentración del propóleo es entre 20 y 80% en peso respecto al total de la composición sinérgica.

Otra realización es la composición sinérgica para uso de la invención, donde la concentración de ácido carnósico es entre 10 y 60% en peso respecto al total de la composición sinérgica.

20 Otra realización es la composición sinérgica para uso de la invención, donde la criptococosis es de tipología epitelial.

La composición sinérgica para uso de la invención se emplea, a través de la administración de una dosis efectiva, como producto fundamental para prevenir y/o erradicar la criptococosis epitelial, así como en el cuero cabelludo y uñas.

25 Otra realización es la composición sinérgica para uso de la invención, que está seleccionada del grupo compuesto por crema, gel, ungüento, óvulos, spray, comprimidos, polvos de uso tópico, cápsulas, polvo para suspensión oral, gotas óticas, pasta dental, colutorio, perfusión, jarabe, toallitas, seda dental, hilo dental, cepillo dental y cepillo interdental.

La composición sinérgica para uso de la invención se emplea en forma de spray (aerosol) para prevenir y/o combatir afecciones buco-faríngeas y bronquíticas.

30 La composición sinérgica para uso de la invención se emplea en forma de gotas óticas para la prevención y/o tratamiento de las otitis.

La composición sinérgica para uso de la invención se emplea como producto fundamental en la prevención y mantenimiento de una correcta higiene buco-dental, así como de prótesis dentales, especialmente en el caso de diabéticos, e implantes dentales susceptibles de desarrollar criptococosis, a través de la pasta dental, colutorio y líquidos de limpieza.

35 La invención también proporciona una composición farmacéutica y/o veterinaria sinérgica que comprende:

- propóleo que comprende polifenoles a una concentración entre 70 y 90 % en peso respecto al propóleo y
- ácido carnósico,

40 junto con excipientes farmacéuticamente y/o veterinariamente aceptables, para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones causadas por especies del hongo oportunista *Cryptococcus neoformans* seleccionadas del grupo que consiste en criptococosis, meningitis y neumonías en humanos y/o en animales, en adelante composición farmacéutica y/o veterinaria sinérgica de la invención.

45 En la presente invención se entiende por "excipiente" a aquella materia que, incluida en las formas galénicas, se añade a los principios activos o a sus asociaciones para posibilitar su preparación y estabilidad. Ejemplos de excipientes son aglutinantes, rellenos, desintegradores, lubricantes, recubridores, endulzantes, saborizantes y colorizantes. Ejemplos más concretos no limitantes de excipientes aceptables son almidones, azúcares, sorbitol, xilitol, fosfato de calcio, grasas esferoides, talco, sílice o glicerina entre otros.

Otra realización es la composición farmacéutica y/o veterinaria sinérgica de la invención, donde la concentración del propóleo es entre 20 y 80 % en peso respecto al total de la composición farmacéutica y/o veterinaria sinérgica.

Otra realización es la composición farmacéutica y/o veterinaria sinérgica de la invención, donde la concentración de ácido carnósico es entre 10 y 60 % en peso respecto al total de la composición farmacéutica y/o veterinaria sinérgica.

- 5 Otra realización es la composición sinérgica farmacéutica y/o veterinaria de la invención, donde dichos excipientes están seleccionados del grupo compuesto por aglutinantes, rellenos, desintegradores, lubricantes, recubridores, endulzantes, saborizantes, colorizantes, azúcares, xilitol, fosfato de calcio, grasas esferoides, talco, polisorbato, propilenglicol, alcohol isopropílico, celulosa microcristalina, estearato de magnesio, lactosa, lactosa monohidrato, almidón de arroz, maltodextrinas, lauril sulfato de sodio, sorbitol, carbonato de calcio precipitado ligero, bicarbonato de sodio, solución de silicato de sodio, sacarina de sodio, carboximetil celulosa de sodio, aceite mineral ligero, agua purificada, dióxido de sílice coloidal, sacarosa, sílice coloidal anhidra, goma arábiga, citrato de sodio, ácido cítrico anhidro, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, glicerina, hidroalcohólico con polimetacrilato de glicerilo, tensioactivos eudérmicos, etanol y cloruro de benzalconio.
- 10

La invención también proporciona un producto alimenticio sinérgico que comprende

- 15 - propóleo que comprende polifenoles a una concentración entre 70 y 90% en peso respecto al propóleo y
- ácido carnósico,

para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones causadas por especies del hongo oportunista *Cryptococcus neoformans* seleccionadas del grupo que consiste en criptococosis, meningitis y neumonías en humanos y/o en animales, en adelante producto alimenticio sinérgico de la invención.

- 20 La combinación de propóleo que comprende polifenoles a una concentración entre 70 y 90% en peso respecto al propóleo y ácido carnósico también se emplea como ingrediente bioactivo en alimentos.

Otra realización es el producto alimenticio sinérgico de la invención, seleccionado del grupo compuesto por goma de mascar, gominola, piruleta y golosina.

- 25 Otra realización es el producto alimenticio sinérgico de la invención, donde la concentración del propóleo es entre 20 y 80 % en peso respecto al total del producto alimenticio.

Otra realización es el producto alimenticio sinérgico de la invención, donde la concentración de ácido carnósico es entre 10 y 60% en peso respecto al total del producto alimenticio.

Breve descripción de las figuras

- 30 La Figura 1 muestra la morfología celular mediante microscopía óptica sobre levaduras de *Cryptococcus neoformans* H99, tratadas con: propóleo (PP) a una concentración de 200 µg/ml, ácido carnósico (CA) a una concentración de 50 µg/ml y la combinación de ambos compuestos (S). Se aplica la técnica de contraste interferencial de "Nomarsky".

La Figura 2 muestra la viabilidad celular en medio líquido de la cepa *Cryptococcus neoformans* H99 en respuesta al tratamiento con ácido carnósico (50 µg/ml), propóleo (200 µg/ml) y una combinación sinérgica de ambos, tomando como referencia una muestra control, sin tratamiento.

- 35 La Figura 3 muestra un ensayo de crecimiento colonial en medio YPD sólido de la cepa *Cryptococcus neoformans* H99 en respuesta al tratamiento con ácido carnósico (50 µg/ml), propóleo (200 µg/ml) y una combinación sinérgica de ambos. Se incluyó un control negativo. C: Control. PP: propóleo a una concentración de 200 µg/ml. CA: ácido carnósico. S: combinación de ambos compuestos (S).

- 40 La Figura 4 muestra una representación de la existencia de sinergismo a través del modelo matemático de representación de isobolográfica.

La Figura 5 muestra una representación de la existencia de sinergismo a través del modelo matemático de representación de isobolográfica.

Descripción de modos de realización

Ejemplo 1. Efecto sinérgico de la combinación de propóleo y ácido carnósico sobre *Cryptococcus neoformans*

La cepa utilizada en este ejemplo es una cepa de levadura de *Cryptococcus neoformans* H99. Esta cepa ha sido tratada con: propóleo (PP) a una concentración de 200 µg/ml, ácido carnósico (CA) a una concentración de 50 µg/ml y la combinación de ambos compuestos (S).

5 Se ha observado la morfología celular de la cepa mediante microscopía óptica. Se ha aplicado la técnica de contraste interferencial de “Nomarsky”. Si bien se puede apreciar una ligera granularidad interna en las células tratadas con los compuestos de forma individual, aquellas que han sido sometidas a la combinación de dichos compuestos, presentan una granularidad rotundamente mayor, así como alteraciones morfológicas visibles en las células, que pueden interpretarse como alteraciones de la estructura externa (pared) con la consiguiente muerte celular. Las imágenes de microscopía óptica se muestran en la Figura 1.

10 Se han realizado medidas de la viabilidad celular en medio líquido de la cepa en respuesta al tratamiento con propóleo (PP) a una concentración de 200 µg/ml, ácido carnósico (CA) a una concentración de 50 µg/ml y la combinación de ambos compuestos (S), tomando como referencia una muestra control, sin tratamiento. Se partió de un preinóculo incubado toda la noche a 28 °C; al día siguiente se refrescó en el mismo medio YPD (D.O. 600 nm= 0,3). El cultivo se dejó crecer hasta D.O. 600 nm= 0,8 a 37 °C. A continuación se adicionaron los compuestos objeto de estudio durante
15 una hora a la misma temperatura, recogiendo alícuotas idénticas a los tiempos indicados. Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2.

Se han realizado ensayos de crecimiento colonial en medio YPD sólido de la cepa en respuesta al tratamiento con propóleo (PP) a una concentración de 200 µg/ml, ácido carnósico (CA) a una concentración de 50 µg/ml y la combinación de ambos compuestos (S), con objeto de medir la inhibición del crecimiento a distintos tiempos de
20 exposición (1, 3 y 5 horas). Adicionalmente se incluyó un control negativo. Para la recogida de muestras se siguió el protocolo descrito en el párrafo anterior. Se practicaron diluciones seriadas de cada muestra y se dispensaron 5 µl de cada dilución sobre placas de medio sólido. Las placas se incubaron durante 24-48 horas antes de ser fotografiadas. Los resultados se muestran en la Figura 3.

La existencia de sinergismo se ha demostrado científicamente mediante modelo matemático de representación isobolográfica (Tallarida, RJ, 2012. Quantitative methods for assessing drug synergism. Genes& Cancer, 2: 1003-1008). Esta referencia propone el uso de fórmulas matemáticas (isobogramas) para dilucidar si existe o no sinergismo. Las CMI₁₀₀ (dosis) se conectan por una línea que corta los ejes (Isobolo). Si el efecto de la combinación de los compuestos fuera aditivo la mezcla de concentraciones que reduce la población al 100% (CMI₁₀₀) caería sobre la recta creada. El sinergismo estaría por debajo de dicha recta y el antagonismo por encima. En nuestro caso, la
25 aplicación de este procedimiento a nuestros resultados demuestra inequívocamente que la combinación CA (ácido carnósico) + PP (propóleo) tiene un fuerte efecto sinérgico sobre la cepa H99 de *Cryptococcus neoformans*. Los isobogramas se muestran en las Figuras 4 y 5.

Método de microdilución en placa M27-S4 del CLSI (Clinical Laboratory Sciences Institute)

35 Se dispusieron placas de 96 pocillos con las diluciones seriadas de los antifúngicos a partir de una disolución madre en medio RPMI (con glutamina y sin bicarbonato), tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0,164M (ICN, Sigma), ajustado a pH 7,0±0,1, más 0,2% de glucosa. Posteriormente, se adicionó a cada pocillo 100 µl de la suspensión de las levaduras previamente diluidas 1000 veces en RPMI hasta obtener 1-5 x 10³ cels/ml. Por tanto, la concentración final de células en el pocillo es de 0,5 - 2,5 x 10³ cels/ml. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h, en ambiente húmedo para prevenir la evaporación del medio. Trascorrida la incubación, se procedió a la lectura
40 visual de las CMIs en función de la intensidad colonial en el fondo del pocillo. Cada ensayo se realizó por duplicado, utilizándose los datos más representativos. En todas las placas se tuvieron en cuenta los Controles de Crecimiento (CC) y los Controles de Esterilidad (CE) para todas las concentraciones.

Tabla 1. Resultados obtenidos a las 48 horas

	CC*	CMI ₁₀₀ µg/ml
Ácido carnósico (CA)	+	125
Propóleo (PP)	+	62,5
Sinergismo (CA + PP)	+	62,5/15,6

45 CC son las siglas de Control de Crecimiento. Para cada una de las concentraciones probadas, se ha comprobado que había crecimiento del microorganismo, con el objetivo de ratificar que la ausencia de dicho microorganismo se

debía únicamente a la capacidad antifúngica de los compuestos administrados. Igualmente, para cada concentración empleada en dicho ensayo, se incluyó también un Control de Esterilidad (CE), teniendo así la seguridad de que las condiciones de esterilidad del medio se mantenían, evitando falsos positivos.

La Figura 4 corresponde a los resultados de la Tabla 1.

5

Tabla 2. Resultados obtenidos a las 48 horas

	CC*	CMI ₁₀₀ µg/ml
Ácido carnósico (CA)	+	125
Propóleo (PP)	+	62,5
Sinergismo (CA + PP)	+	31,25/31,25

La Figura 5 corresponde a los resultados de la Tabla 2.

Los resultados de la Tabla 1 (Figura 4) y de la Tabla 2 (Figura 5) se han obtenido a partir de una misma disolución madre inicial. Se obtienen datos de efecto sinérgico para dos diluciones diferentes, obteniéndose por tanto datos de efecto sinérgico para dos CMI₁₀₀ diferentes de ácido carnosico (CA) y propóleo (PP).

10 Ejemplo 2. Ejemplos de forma de aplicación, vehículos y sistemas de aplicación-dosificación

Aplicabilidad

Considerando las múltiples posibilidades y necesidades de aplicación de esta combinación sinérgica, se incluyen propuestas de diferentes formas y sistemas de dosificación de la misma.

15 En el caso de salud buco-dental, la pasta o gel dental representa un mecanismo de actuación multifactorial simultánea, frente a degeneraciones-pérdidas de función de origen también multifactorial, abarcando tanto la criptococosis, como la evitación de caries y gingivitis, así como la normalización salival y flora buco-dental.

En infecciones del tracto genitourinario femenino, la aplicación tendría lugar a través de toallitas, considerando que boca y vagina tienen la misma composición epitelial, de lisozimas y de mucosas. A su vez, en criptococosis sistémicas, la aplicación sería a través de la forma de jarabe o inyección.

20 Para establecer la correcta aplicabilidad de la composición sinérgica de la presente solicitud, se realizaron todas las pruebas de adecuación de dicha formulación con los excipientes descritos a continuación, resultando correcta la misma en todos los casos incluidos:

CREMA

1. Propilenglicol
- 25 2. Polisorbato

SPRAY

1. Propilenglicol
2. Alcohol isopropílico

COMPRIMIDOS

- 30 1. Celulosa microcristalina
2. Estearato de magnesio

3. Lactosa

POLVOS USO TÓPICO

1. Almidón de arroz
2. Maltodextrinas

5 CÁPSULAS

1. Lactosa o lactosa monohidrato
2. Celulosa microcristalina
3. Almidón de maíz
4. Estearato de magnesio

- 10 5. Lauril sulfato de sodio

6. Dióxido de sílice coloidal

POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL

1. Sacarosa
2. Sílice coloidal anhidra
3. Goma arábiga
4. Citrato de sodio
5. Ácido cítrico anhidro

15

PERFUSIÓN

1. Cloruro de sodio
2. Hidróxido de sodio para ajustar pH

20

JARABE

1. Glicerina

TOALLITAS

1. Hidroalcohólico con polimetacrilato de glicerilo
2. Tensioactivos eudérmicos
3. Etanol
4. Propilenglicol
5. Cloruro de benzalconio

25

Referencias

- 30 Byrnes, E. J., 3rd y Marr, K. A. (2011). The Outbreak of *Cryptococcus gattii* in Western North America: Epidemiology and Clinical Issues. *Curr Infect Dis Rep* 13, 256-261.

- Campbell, L. T., Fraser, J. A., Nichols, C. B., Dietrich, F. S., Carter, D. y Heitman, J. (2005). Clinical and environmental isolates of *Cryptococcus gattii* from Australia that retain sexual fecundity. *Eukaryot Cell* 4, 1410-1419.
- Casadevall, A. y Perfect, J. (1998). *Cryptococcus neoformans* (Washington DC: ASM).
- Chen, J., Varma, A., Diaz, M. R., Litvintseva, A. P., Wollenberg, K. K. y Kwon-Chung, K. J. (2008). *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. *Emerg Infect Dis* 14, 755-762.
- Chottanapund, S., Singhasivanon, P., Kaewkungwal, J., Chamroonswasdi, K. y Manosuthi, W. (2007). Survival time of HIV-infected patients with cryptococcal meningitis. *J Med Assoc Thai* 90, 2104-2111.
- Crowe, S. M., Carlin, J. B., Stewart, K. I., Lucas, C. R. y Hoy, J. F. (1991). Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons. *J Acquir Immune Defic Syndr* 4, 770-776.
- Currie, B. P. y Casadevall, A. (1994). Estimation of the prevalence of cryptococcal infection among patients infected with the human immunodeficiency virus in New York City. *Clin Infect Dis* 19, 1029-1033.
- Dromer, F., Casadevall, A., Perfect, J. y Sorrell, T. (2011). *Cryptococcus neoformans*: Latency and Disease, In *Cryptococcus*. From human pathogen to model yeast, T. R. K.
- 15 Joseph Heitman, Kyung J Kwon-Chung, John R Perferct, and Arturo Casadevall, ed. (Washington: ASM), pp. 431-441.
- Fortes, S. T., Lazera, M. S., Nishikawa, M. M., Macedo, R. C. y Wanke, B. (2001). First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. *Mycoses* 44, 137-140.
- Friedman, G. D., Jeffrey Fessel, W., Udaltsova, N. V. y Hurley, L. B. (2005). Cryptococcosis: the 1981-2000 epidemic. *Mycoses* 48, 122-125.
- 20 Galanis, E. y Macdougall, L. (2010). Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. *Emerg Infect Dis* 16, 251-257.
- Harris, J. R., Lockhart, S. R., Debess, E., Marsden-Haug, N., Goldoft, M., Wohrle, R., Lee, S., Smelser, C., Park, B. y Chiller, T. (2011). *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. *Clin Infect Dis* 53, 1188-1195.
- 25 Hoang, L. M., Maguire, J. A., Doyle, P., Fyfe, M. y Roscoe, D. L. (2004). *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. *J Med Microbiol* 53, 935-940.
- Jongwutiwes, U., Kiertiburanakul, S. y Sungkanuparph, S. (2007). Impact of antiretroviral therapy on the relapse of cryptococcosis and survival of HIV-infected patients with cryptococcal infection. *Curr HIV Res* 5, 355-360.
- 30 Lortholary, O., Poizat, G., Zeller, V., Neuville, S., Boibieux, A., Alvarez, M., Dellamonica, P., Botterel, F., Dromer, F. y Chene, G. (2006). Long-term outcome of AIDS-associated cryptococcosis in the era of combination antiretroviral therapy. *Aids* 20, 2183-2191.
- Mirza, S. A., Phelan, M., Rimland, D., Graviss, E., Hamill, R., Brandt, M. E., Gardner, T., Sattah, M., de Leon, G. P., Baughman, W. y Hajjeh, R. A. (2003). The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. *Clin Infect Dis* 36, 789-794.
- 35 Ngamskulrunroj, P., Chang, Y., Sionov, E. y Kwon-Chung, K. J. (2012). The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. *MBio* 3.
- Nishikawa, M. M., Lazera, M. S., Barbosa, G. G., Trilles, L., Balassiano, B. R., Macedo, R. C., Bezerra, C. C., Perez, M. A., Cardarelli, P. y Wanke, B. (2003). Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbiol* 41, 73-77.
- 40 Park, B. J., Wannemuehler, K. A., Marston, B. J., Govender, N., Pappas, P. G. y Chiller, T. M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids* 23, 525-530.
- Sorrell, T. C. (2001). *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol* 39, 155-168.

Velagapudi R, Hsueh YP, Geunes-Boyer S, Wright JR, Heitman J. (2009). Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 77, 4345-55.

Zaragoza, O., Garcia-Rodas, R., Nosanchuk, J. D., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J. L. y Casadevall, A. (2010). Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog* 6, e1000945.

- 5 Freitas Araújo MG1, Pacifico M, Vilegas W, Dos Santos LC, Icely PA, Miró MS, Scarpa MV, Bauab TM, Sotomayor CE. Evaluation of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhl. Extract as antifungal and in treatment of vulvovaginal candidiasis. *Med Mycol*. 2013 Oct; 51(7):673-82.

Hwang IS, Lee J, Jin HG, Woo ER, Lee DG. Amentoflavone stimulates mitochondrial dysfunction and induces apoptotic cell death in *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 2012 Apr; 173(4):207-18. Epub 2011 Dec 31.

- 10 Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. Protective effect of glycyrrhizine in mice with systemic *Candida albicans* infection and its mechanism. 1991 Oct;13(5):380-3.

Naeini A, Naderi NJ, Shokri H. Analysis and in vitro anti-*Candida* antifungal activity of *Cuminum cyminum* and *Salvadora persica* herbs extracts against pathogenic *Candida* strains. *J Mycol Med*. 2014 Mar;24(1):13-8. Epub 2013 Nov 8.

- 15 Phaopongthai J, Wiyakrutta S, Meksuriyen D, Sriubolmas N, Suwanborirux K. Azole-synergistic anti-candidal activity of altenusin, a biphenyl metabolite of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Terminalia chebula* Retz. *J Microbiol*. 2013 Dec; 51(6):821-8. Epub 2013 Dec 19.

- 20 Vicente MF, Cabello A, Platas G, Basilio A, Díez MT, Dreikorn S, Giacobbe RA, Onishi JC, Meinz M, Kurtz MB, Rosenbach M, Thompson J, Abruzzo G, Flattery A, Kong L, Tspouras A, Wilson KE, Peláez F. Antimicrobial activity of ergokonin A from *Trichoderma longibrachiatum*. *J Appl Microbiol*. 2001 Nov;91(5):806-13.

Thamburan S, Klaasen J, Mabusela WT, Cannon JF, Folk W, Johnson Q. *Tulbaghia alliacea* phytotherapy: a potential anti-infective remedy for candidiasis. *Phytother. Res*. 2006 Oct; 20(10):844-50.

Tallarida, R.J.;2012. Quantitative methods for assessing drug synergism. *Genes& Cancer*, 2: 1003-1008.

REIVINDICACIONES

1. Composición sinérgica que comprende
 - propóleo que comprende polifenoles a una concentración entre 70 y 90 % en peso respecto al propóleo y
 - ácido carnósico,
- 5 para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones causadas por especies del hongo oportunista *Cryptococcus neoformans* seleccionadas del grupo que consiste en criptococosis, meningitis y neumonías en humanos y/o en animales.
2. Composición sinérgica para uso según la reivindicación 1, caracterizada por que la criptococosis es criptococosis epitelial.
- 10 3. Composición sinérgica para uso según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada por que la concentración del propóleo es entre 20 y 80% en peso respecto al total de la composición sinérgica.
4. Composición sinérgica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que la concentración de ácido carnósico es entre 10 y 60% en peso respecto al total de la composición sinérgica.
- 15 5. Composición sinérgica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que está seleccionada del grupo compuesto por crema, gel, ungüento, óvulos, spray, comprimidos, polvos de uso tópico, cápsulas, polvo para suspensión oral, gotas óticas, pasta dental, colutorio, perfusión, jarabe, toallitas, seda dental, hilo dental, cepillo dental y cepillo interdental.
6. Composición farmacéutica y/o veterinaria sinérgica que comprende:
 - propóleo que comprende polifenoles a una concentración entre 70 y 90% en peso respecto al propóleo y
 - ácido carnósico,

junto con excipientes farmacéuticamente y/o veterinariamente aceptables, para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones causadas por especies del hongo oportunista *Cryptococcus neoformans* seleccionadas del grupo que consiste en criptococosis, meningitis y neumonías en humanos y/o en animales.
- 25 7. Composición farmacéutica y/o veterinaria sinérgica para uso según la reivindicación 6, caracterizada por que la concentración del propóleo es entre 20 y 80% en peso respecto al total de la composición farmacéutica y/o veterinaria sinérgica.
8. Composición farmacéutica y/o veterinaria sinérgica para uso según la reivindicación 6 o 7, caracterizada por que la concentración de ácido carnósico es entre 10 y 60% en peso respecto al total de la composición farmacéutica y/o veterinaria sinérgica.
- 30 9. Composición farmacéutica y/o veterinaria sinérgica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizada por que dichos excipientes están seleccionados del grupo compuesto por aglutinantes, rellenos, desintegradores, lubricantes, recubridores, endulzantes, saborizantes, colorizantes, azúcares, xilitol, fosfato de calcio, grasas esferoides, talco, polisorbato, propilenglicol, alcohol isopropílico, celulosa microcristalina, estearato de magnesio, lactosa, lactosa monohidrato, almidón de arroz, maltodextrinas, lauril sulfato de sodio, sorbitol, carbonato de calcio precipitado ligero, bicarbonato de sodio, solución de silicato de sodio, sacarina de sodio, carboximetil celulosa de sodio, aceite mineral ligero, agua purificada, dióxido de sílice coloidal, sacarosa, sílice coloidal anhidra, goma arábiga, citrato de sodio, ácido cítrico anhidro, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, glicerina, hidroalcohólico con polimetacrilato de glicerilo, tensioactivos eudérmicos, etanol y cloruro de benzalconio.
- 35 10. Producto alimenticio sinérgico que comprende
 - propóleo que comprende polifenoles a una concentración entre 70 y 90% en peso respecto al propóleo y
 - ácido carnósico,
- 40

para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones causadas por especies del hongo oportunista *Cryptococcus neoformans* seleccionadas del grupo que consiste en criptococosis, meningitis y neumonías en humanos y/o en animales.

- 5 11. Producto alimenticio sinérgico para uso según la reivindicación 10, caracterizado por que está seleccionado del grupo compuesto por goma de mascar, gominola, piruleta y golosina.
12. Producto alimenticio sinérgico para uso según la reivindicación 10 u 11, caracterizado por que la concentración del propóleo es entre 20 y 80 % en peso respecto al total del producto alimenticio.
13. Producto alimenticio sinérgico para uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado por que la concentración de ácido carnósico es entre 10 y 60 % en peso respecto al total del producto alimenticio.

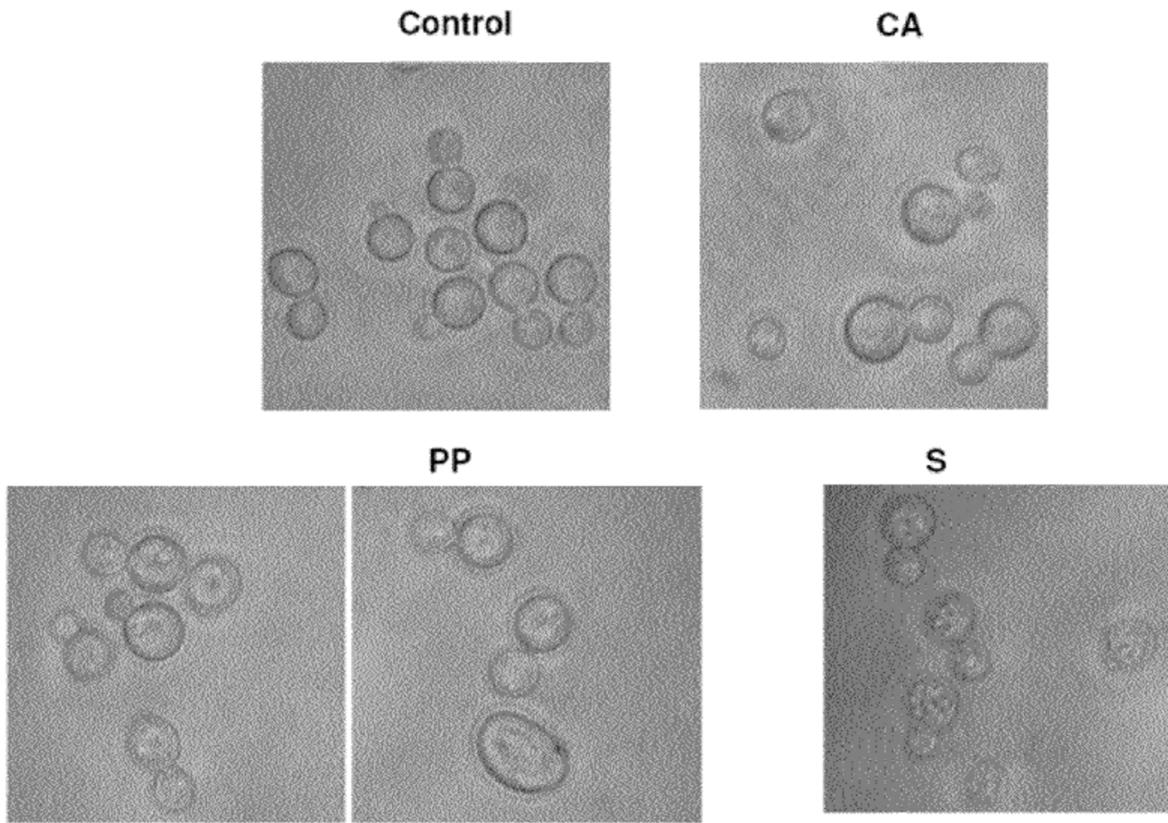


FIG. 1

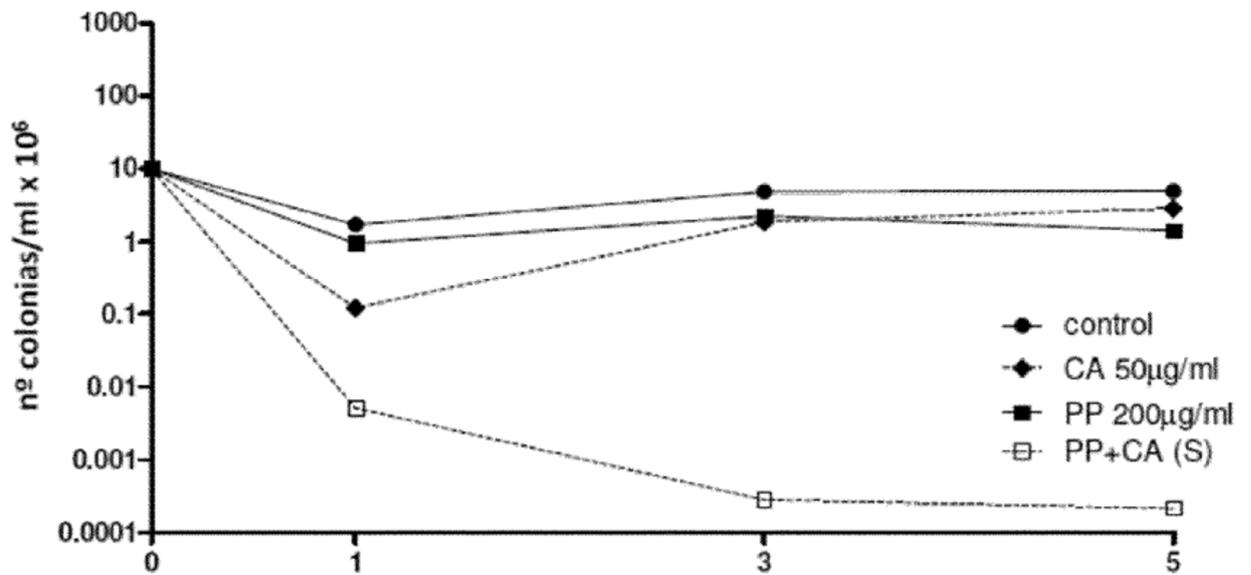


FIG. 2

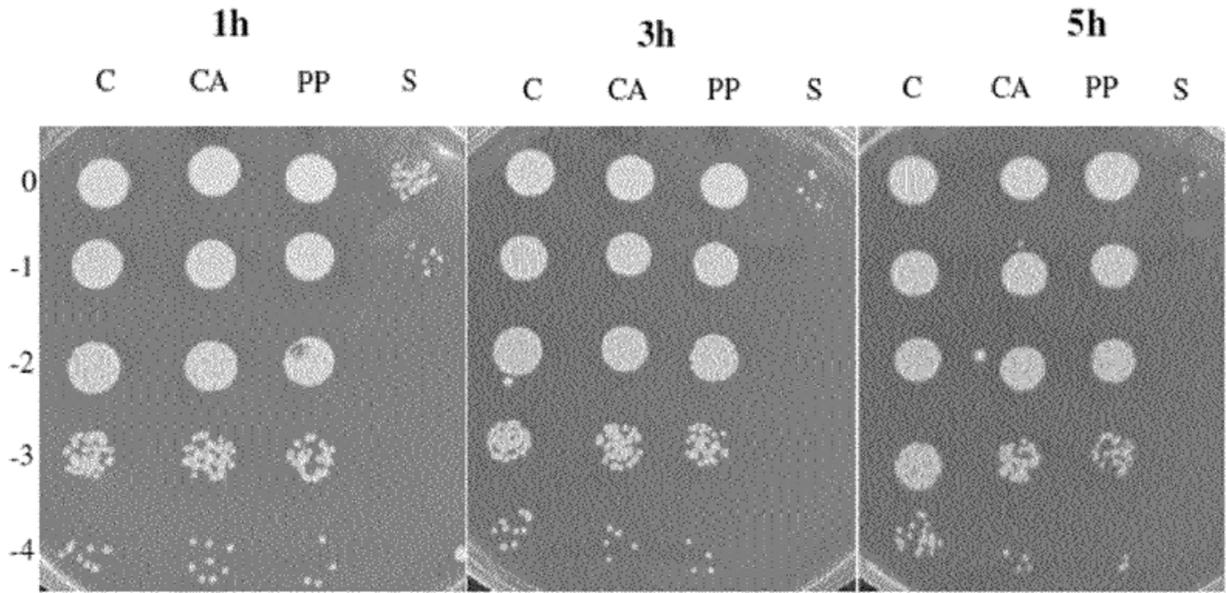


FIG. 3

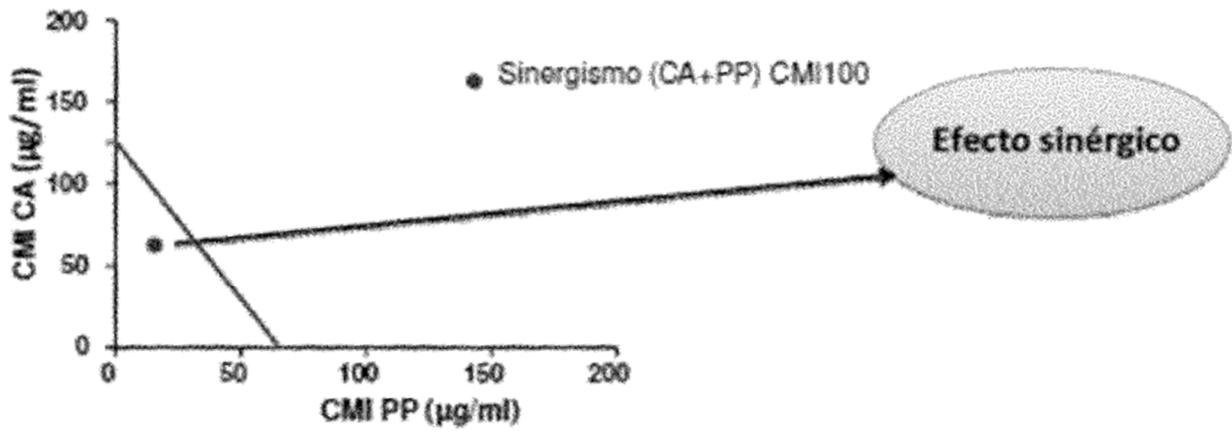


FIG. 4

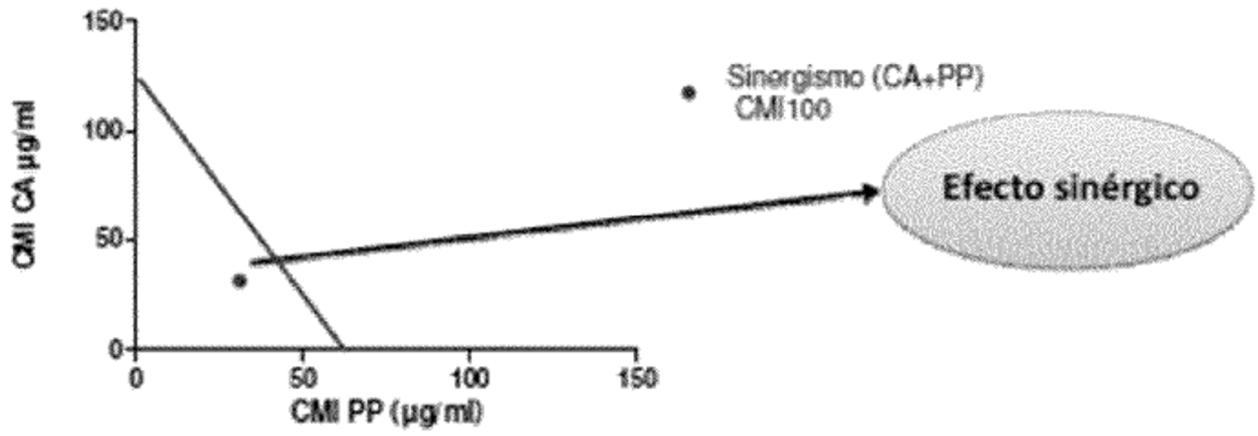


FIG. 5