

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 017 694**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/191 (2006.01)
A61K 31/365 (2006.01)
A61K 31/366 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2018 PCT/EP2018/077129**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2019 WO19068862**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2018 E 18788687 (4)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2025 EP 3691625**

(54) Título: **Derivados del ácido glucónico para su uso en el tratamiento y/o prevención de infecciones microbianas**

(30) Prioridad:

06.10.2017 EP 17195192

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.05.2025

(73) Titular/es:

**GEDEA BIOTECH AB (100.00%)
Medicon Village
223 81 Lund, SE**

(72) Inventor/es:

**ELLERVIK, ULF;
STERNER, OLOV;
STREVENS, HELENA y
MANNER, SOPHIE**

(74) Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 3 017 694 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

Derivados del ácido glucónico para su uso en el tratamiento y/o prevención de infecciones microbianas

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula XX, o una lactona del mismo, para su uso en el tratamiento y/o prevención de infecciones bacterianas.

10 Antecedentes

Los agentes antimicrobianos se han utilizado durante los últimos 70 años para tratar a pacientes con enfermedades infecciosas. Desde la década de 1940, estos fármacos han reducido en gran medida la morbilidad y la mortalidad por enfermedades infecciosas. Sin embargo, su uso se ha extendido tanto y 15 durante tanto tiempo que los organismos infecciosos para cuya eliminación están diseñados los antimicrobianos se han adaptado a ellos. Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, aumentando el riesgo de contagio a otras personas.

20 La resistencia antimicrobiana amenaza la prevención y el tratamiento efectivos de un rango siempre creciente de infecciones provocadas por bacterias, parásitos, virus y hongos.

Por lo cual, la resistencia antimicrobiana es una amenaza cada vez más seria para la salud pública global que requiere de la acción a través de todos los sectores del gobierno y de la sociedad.

25 Todas las clases de microbios desarrollan resistencia: los hongos desarrollan resistencia antifúngica, los virus desarrollan resistencia antiviral, los protozoos desarrollan resistencia antiprotozoaria, y las bacterias desarrollan resistencia a antibióticos.

30 El problema con la resistencia a antibióticos es un fenómeno común. Las infecciones fúngicas que son resistentes al tratamiento son un problema emergente de salud pública. En general, la resistencia antifúngica aún es relativamente desconocida, pero el problema probablemente continuará evolucionando a menos que se realice algo más para evitar que se siga desarrollando más resistencia y prevenir la propagación de estas infecciones. A pesar de que la mayor parte de la resistencia antifúngica ocurre en las especies de *Candida*, la resistencia en otros tipos de hongos, tales como *Aspergillus*, también es un problema emergente.

35 Debido a que los hongos son eucariotes, tal como los huéspedes humanos a los que ellos infectan, existen solamente pocos objetivos diferentes que se pueden emplear para el desarrollo de los fármacos antifúngicos. Por lo cual, los antifúngicos se restringen en su mayor parte a los fármacos que están dirigidos a pocas rutas metabólicas.

40 Un objetivo para los agentes antimicrobianos es la biopelícula la cual es un producto de un proceso de desarrollo microbiano. Las biopelículas están formadas por las células microbianas que se adhieren una con la otra y están rodeadas por una matriz polimérica extracelular autoproducida. La formación de la biopelícula es una estrategia de sobrevida para las bacterias y hongos para adaptarse a su entorno vivo, especialmente 45 en un entorno hostil. Cuando una célula comuta al modo de crecimiento de biopelícula, esta sufre un cambio fenotípico en su comportamiento en el cual grandes conjuntos de genes se regulan de manera diferencial. Las biopelículas pueden contener muchos tipos diferentes de microorganismos, por ejemplo bacterias, arqueas, protozoos, hongos y algas.

50 Se estima que las biopelículas están asociadas con el 80% de las infecciones microbianas y el crecimiento de microorganismos en las biopelículas puede aumentar su resistencia a los agentes antimicrobianos. Además, las bacterias de la biopelícula son hasta 1000 veces más tolerantes y/o resistentes a los antibióticos que las células de plancton.

55 En la mayoría de los hongos, las hifas son el modo principal de crecimiento vegetativo, y en conjunto se denominan un micelio. Por ejemplo, la virulencia de *Candida albicans* es mediada por una transformación de células planctónicas en hifas. La forma de las hifas, es decir, células filamentosas, tienen la capacidad de invadir el tejido e inducir la inflamación, mediada por candidalisinina, una toxina peptídica citotóxica que destruye las células epiteliales (Moyes et. al., Nature, 2016, 532, 64).

60 La resistencia antimicrobiana no solamente es problemática en infecciones primarias, sino también en infecciones secundarias. Sin agentes antimicrobianos efectivos para la prevención y tratamiento de las infecciones, los procedimientos médicos tales como el trasplante de órganos, la quimioterapia de cáncer, el manejo de la diabetes y la cirugía mayor se transforman en un riesgo elevado. Además, las infecciones 65 fúngicas se han vuelto una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los pacientes inmunocomprometidos, tales como aquellos con VIH/SIDA, tuberculosis o los que reciben quimioterapia. A

pesar de una conciencia aumentada y de las estrategias de tratamiento mejoradas, el frecuente desarrollo de resistencia a los fármacos antifúngicos usados en establecimientos clínicos contribuye al aumento en la cantidad de micosis.

- 5 El documento EP 1 764 100 divulga que el efecto antibacteriano de un agente antifúngico como el miconazol puede potenciarse mediante un sistema tampón que comprende un ácido orgánico.

El documento WO 2010/129443 divulga sales de ácido de azúcar de calcio, como el gluconato de calcio, y su capacidad para reducir la producción de TSST-1 de *S. aureus*.

- 10 10 El documento WO 2016/141946 divulga el efecto del gluconato de zinc sobre la salmonela en cerdos.

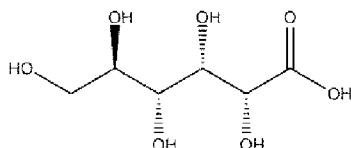
El documento WO 2008/108834 divulga el efecto de una serie de lactonas sobre *Streptococcus pneumoniae*.

- 15 15 Por lo cual, existe una necesidad creciente de nuevos agentes antimicrobianos.

Compendio

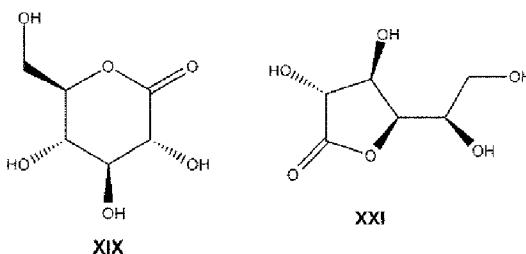
Los presentes inventores han desarrollado un método para prevenir y/o reducir la formación de biopelículas.

- 20 20 Cuando se reduce o previene la formación de la biopelícula, las células microbianas individuales ya no pueden adherirse a la superficie. Por lo tanto, se previene una infección posterior y las células microbianas que ya no forman una biopelícula se desechan. Los presentes inventores han demostrado que el tratamiento con un compuesto de Fórmula XX,



XX

25 o una lactona del mismo, como un compuesto de fórmula XIX o XXI,



XIX

XXI

30 30 reduce la presencia de biopelícula de especies de hongos, y tener un efecto citotóxico sobre varias especies de hongos. Además, los presentes inventores han demostrado que un compuesto de fórmula I es útil como agente antibacteriano.

35 Así, en un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula XX, o una lactona del mismo, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula XX, o una lactona del mismo, para su uso en el tratamiento y/o prevención de infecciones bacterianas.

En una realización, la presente invención se refiere a glucono- δ -lactona para su uso en el tratamiento de una infeción bacteriana causada por *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus spp*, *Ureaplasma urealyticum*, 40 *Mycoplasma hominis*, *Prevotella spp*, *Enterococci*, *Bacteroides spp*, *Peptostreptococcus spp*, *Porphyromonas gingivalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acetinobacter baumanii*, *Streptococcus pyogenes*, *Beta-Hemolytic Streptococci Grupo C*, *Beta-Hemolytic Streptococci Grupo G*, y/o *Streptococcus agalactiae*.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula XX, o una lactona del mismo, 45 tal como un compuesto de Fórmula XIX o XXI, para su uso en la prevención del parto prematuro causado por vulvovaginitis bacteriana.

La invención se define en las reivindicaciones. Cualquier materia que quede fuera del ámbito de las reivindicaciones se proporciona únicamente a título informativo.

- 50 50 Descripción de los Dibujos

Figura 1. Formación normalizada de biopelícula de *Candida albicans* tratada con distintos ácidos. GlyA = ácido glicérico (pH = 7), XA = ácido xilónico (pH = 7), CA = ácido cítrico (pH = 4,6), GA = ácido glucónico (pH = 6,5), LA = ácido láctico (pH = 4,9). La biopelícula se midió después de 24 h.

5 **Figura 2.** Cambios en la rotación óptica en la hidrólisis de la glucono- δ -lactona (GDA) en agua destilada (círculos no rellenos), tampón pH 4 (cuadrados rellenos), tampón pH 5 (cuadrados no rellenos) y tampón pH 7 (círculos rellenos).

10 **Figura 3.** Formación normalizada de biopelícula de *Candida albicans* en el medio mínimo a pH 2,6-6,6 con tampón fosfato (círculos no rellenos, línea punteada) o glucono- δ -lactona (cuadrados rellenos, línea continua). La biopelícula se midió al cabo de 24 h y la tinción se realizó con violeta cristal.

15 **Figura 4. (A)** Formación normalizada de biopelícula de *Candida albicans* tratada con GA lactonizado/oligomerizado. Un pellet de ácido glucónico lactonizado/oligomerizado se agregó a una solución tampón de pH 3,71 (10 mL) a 37°C. Las muestras se tomaron (4 mL) cada hora (en rangos de tiempo distintos) y se agregó una nueva solución tampón (4 mL). Las muestras se diluyeron 50 veces con medio de biopelícula y se midió la cantidad de formación de biopelícula al cabo de 24 h. **(B)** Formación normalizada de biopelícula de *Candida glabrata* tratada con GA lactonizado/oligomerizado. Se agregó un pellet de ácido glucónico lactonizado/oligomerizado a una solución tampón de pH 3,71 (10 mL) a 37°C. Se tomaron muestras (4 mL) a cada hora (a distintos rangos de tiempo) y se agregó una nueva solución tampón (4 mL). Las muestras se diluyeron 50 veces con medio de biopelícula y se midió la cantidad de formación de biopelícula al cabo de 24 h.

20

25 **Figura 5. (A)** Formación normalizada de biopelícula de *Candida albicans* tratada con glucono- δ -lactona (GDA). Un pellet de GDA se agregó a una solución tampón de pH 3,71 (10 mL) a 37°C. Se tomaron muestras (4 mL) después de 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h y se agregó una nueva solución tampón (4 mL). Las muestras se diluyeron 50 veces con medio de biopelícula y la cantidad de formación de biopelícula se midió luego de 24 h. **(B)** Formación normalizada de biopelícula de *Candida glabrata* tratada con GDA. Se agregó un pellet de GDA a una solución tampón de pH 3,71 (10 mL) a 37°C. Se tomaron muestras (4 mL) después de 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h y se agregó una nueva solución tampón (4 mL). Las muestras se diluyeron 50 veces con medio de biopelícula y la cantidad de formación de biopelícula se midió luego de 24 h.

30

35 **Figura 6. (A)** Viabilidad de las biopelículas de *C. albicans* y *C. glabrata* luego del tratamiento con glucono- δ -lactona (GDA) a distintas concentraciones durante 24 h. Se realizó la tinción de la biopelícula con XTT. Se midió la densidad óptica a 485 nm. Las franjas en diagonal indican los datos para *C. albicans*. Las columnas rellenas en negro indican datos para *C. glabrata*. **(B)** Viabilidad de las biopelículas de *C. albicans* y *C. glabrata*, luego del tratamiento con GDA a distintas concentraciones por 48 h. La tinción de la biopelícula se llevó a cabo con XTT. Se midió la densidad óptica a 485 nm. Las franjas en diagonal indican los datos para *C. albicans*. Las columnas rellenas en negro indican los datos para *C. glabrata*.

40

Figura 7. Efecto de glucono- δ -lactona (GDA) sobre la biopelícula madura de *C. albicans* y *C. glabrata*. Se incubó la biopelícula madura (cultivada por 48 h) con GDA durante 5 h a 37°C y luego las células se plaquearon en dilución seriada sobre placas de YPD para estimar la sobrevida celular.

45 **Figura 8. (A)** Estudio microfluídico del desarrollo de la biopelícula de *C. albicans* no tratada en medio mínimo a pH 7,0. Las células no tratadas principalmente forman hifas. **(B)** Estudio microfluídico del desarrollo de biopelícula de *C. albicans* tratada en medio mínimo con un hidrolizado de glucono- δ -lactona (GDA) a una concentración final de X50, pH 3,8. La adición de GDA causó que *C. albicans* creciera predominantemente como una forma de levadura, pero no como hifas.

50

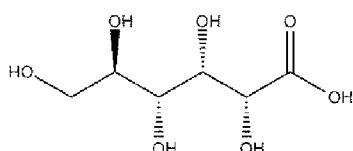
55 **Figura 9.** Formación de biopelícula de *Escherichia coli* K12 ya sea tratada con tampón de fosfato (cuadrados rellenos), ácido cítrico (cuadrados no rellenos), ácido láctico (triángulos rellenos), ácido glucónico (círculos rellenos) o glucono- δ -lactona (círculos no rellenos) para obtener medios con diferente pH (2,6 a 6,6). Se tiñó la biopelícula con cristal violeta.

Descripción detallada de la invención

Las referencias a métodos de tratamiento en esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

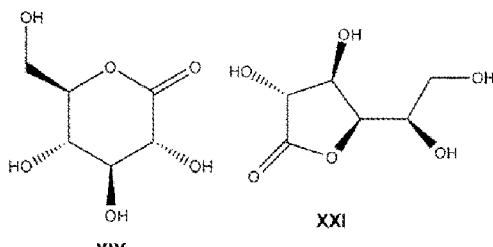
Compuestos

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula XX,



XX

o una lactona del mismo, tal como un compuesto de fórmula XIX o XXI,



XIX

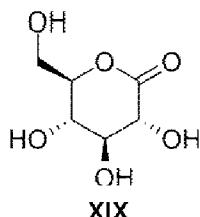
XXI

5

para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección bacteriana seleccionada del grupo que consiste en *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus spp*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Prevotella spp*, *Enterococci*, *Bacteroides spp*, *Peptostreptococcus spp*, *Porphyromonas gingivalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acetinobacter baumanii*, *Streptococcus pyogenes*, *Beta-Hemolytic Streptococci Grupo C*, *Beta-Hemolytic Streptococci Grupo G-*, y/o infección por *Streptococcus agalactiae*.

En una realización, los compuestos XIX, XX y XXI están en equilibrio en solución acuosa.

15 En una realización preferida, el compuesto de Fórmula I es glucono- δ -lactona (GDA, Fórmula XIX),



Polímero/oligómero

20

En una realización, el compuesto de Fórmula XX, o lactona del mismo, tal como un compuesto de Fórmula XIX o XXI, se oligomeriza para formar un oligómero. En otra realización, el compuesto de Fórmula XX, o lactona del mismo, tal como un compuesto de Fórmula XIX o XXI, se polimeriza para formar un polímero.

25

En una realización, el oligómero o polímero comprende un compuesto de Fórmula XX, o lactona del mismo, tal como un compuesto de Fórmula XIX o XXI, es decir, es un homo-oligómero/polímero en el que un compuesto de Fórmula XX, o lactona del mismo, tal como un compuesto de Fórmula XIX o XXI, es el monómero. En otra realización, el oligómero o polímero es un oligómero/polímero mixto, es decir, un heterooligómero/polímero.

30

En una realización, el oligómero o polímero además comprende ácido láctico, es decir, un oligómero/polímero de ácido láctico.

Infecciones

35

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula XX, o lactona del mismo, tal como un compuesto de Fórmula XIX o XXI, o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección bacteriana seleccionada del grupo que consiste en *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus spp*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Prevotella spp*, *Enterococcos*, *Bacteroides spp*, *Peptostreptococcus spp*, *Porphyromonas gingivalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acetinobacter baumanii*, *Streptococcus pyogenes*, *Beta-Hemolytic Streptococci Grupo C*, *Beta-Hemolytic Streptococci Grupo G-*, y/o infección por *Streptococcus agalactiae*.

En una realización, la infección bacteriana es una infección urogenital. En una realización la infección bacteriana es una infección vaginal.

- 5 En una realización, la infección es una infección en un mamífero, es decir, el individuo que necesita dicho tratamiento es un mamífero. Preferentemente, el mamífero es un humano. En una realización, el humano es una mujer. Dicha mujer puede ser una mujer embarazada.

10 En una realización, la infección es dermatitis y/o eczema. Dicha dermatitis y/o eczema puede ser dermatitis seborreica. La infección también puede ser una infección secundaria de dicha dermatitis o eczema.

15 El término "infección secundaria", como se usa en este documento, se refiere a una secuela o complicación de una causa raíz. Dicha causa raíz puede ser una infección primaria.

15 En una realización, la infección es el acné de todas las severidades, o condiciones acneiformes tales como rosácea, dermatitis perioral o periorbital.

En una realización, la infección es furunculosis, carbunculosis o foliculitis.

20 En una realización, la infección es una infección de la cara, cuero cabelludo, el torso y/o la ingle. La infección puede ser una infección de heridas en la piel infectadas en dichas áreas. La infección también puede estar ubicada en los pliegues de la piel del cuerpo.

En una realización, la infección es impétigo o erisipela.

- 25 En una realización, la infección es una infección de los pies. Dicha infección de los pies puede estar asociada con heridas de pies de diabéticos. En una realización, la infección de los pies es secundaria al crecimiento interno de las uñas de los pies o ampollas de los pies.

30 En una realización, la infección es una infección secundaria que aparece luego de la mordedura de un animal. Dicho animal puede ser un insecto. En una realización, la infección es una infección secundaria que aparece luego de las picaduras de insectos, picaduras de mosquitos, picaduras de garrapatas, eritema migratorio o linfadenosis benigna de cutis.

35 En una realización, la infección es una infección secundaria de herpes simplex, dermatológica, oral o genital, o una infección secundaria de herpes zoster o varicela zoster.

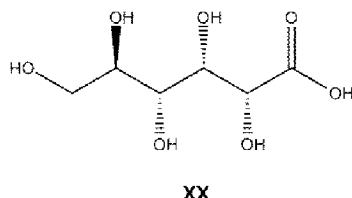
En una realización, la infección es una infección secundaria de lesiones a la piel, tal como quemaduras o cortes.

- 40 En una realización, la infección bacteriana es periodontitis.

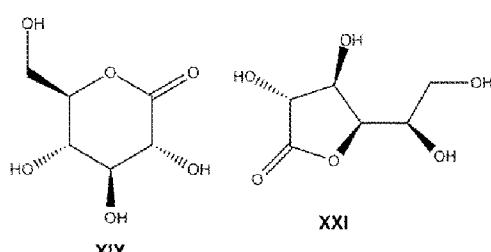
En una realización, la infección bacteriana es vaginosis bacteriana.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula XX,

45



o una lactona del mismo, tal como un compuesto de fórmula XIX o XXI,



50

- para su uso en el tratamiento de vaginosis bacteriana, en el que la vaginosis bacteriana está causada por *Gardherella vaginalis*, *Mobiluncus spp*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Prevotella spp*, *Enterococci*, *Bacteroides spp*, *Peptostreptococcus spp*, *Porphyromonas gingivalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acetinobacter baumanii*, *Streptococcus pyogenes*, *Estreptococos betahemolíticos del grupo C*, *Estreptococos betahemolíticos del grupo G*, y/o *Streptococcus agalactiae*.
- En una realización, la infección es secundaria a la colonización oral, nasal o anogenital de estreptococos del grupo A o del grupo B o de bacterias multirresistentes.
- 10 En una realización, la infección es dermatitis estreptocócica perianal.
- Formulaciones*
- En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula XX, o lactona del mismo, tal como un compuesto de fórmula XIX o XXI, para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana. En una realización, la composición farmacéutica se formula en forma de comprimido, comprimido de desintegración oral (o comprimido de disolución oral (ODT)), pastilla, chicle, goma de mascar, crema, loción, gel, emulsión, solución, espuma, pomada, aerosol, enjuague bucal en suspensión, enjuague bucal, enjuague bucal, baño bucal, esmalte de uñas, parche dérmico o champú. En una realización, dicha solución está adaptada para su uso en un vendaje, apósito y/o compresa.
- En una realización, la composición farmacéutica comprende al menos 5% en peso, tal como al menos 10% en peso, tal como al menos 15% en peso, tal como al menos 20% en peso, tal como al menos 25% en peso, tal como al menos 30% en peso, tal como al menos 40% en peso, tal como al menos 50% en peso, tal como al menos 60% en peso del compuesto de la Fórmula (I).
- En una realización, la composición farmacéutica para ser usada según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición farmacéutica comprende no más de 99% en peso, tal como no más de 95% en peso, tal como no más de 90% en peso, tal como no más de 85% en peso, tal como no más de 80% en peso, tal como no más de 75% en peso del compuesto de la Fórmula (I).
- En una realización, la composición farmacéutica comprende de 5 a 99% en peso, tal como entre 10 a 95% en peso, tal como entre 15 a 95% en peso, tal como entre 20 a 90% en peso, tal como entre 40 a 95% en peso, tal como entre 40 a 95% en peso, tal como entre 50 a 95% en peso del compuesto de la Fórmula (I).
- 35 En una realización, la composición farmacéutica comprende no más de 10% en peso de agua, tal como no más de 5% en peso de agua.
- Un "agente antimicrobiano", como se utiliza en este documento, se refiere a un agente que es capaz de disminuir o eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos tal como el término conocido en el arte (microorganismos ejemplares incluyen microbios tales como bacterias, hongos, virus y otros patógenos). De manera similar, el término "agente antifúngico" se refiere a un agente que es capaz de disminuir o eliminar o inhibir el crecimiento de los hongos, y el término "agente antibacteriano" se refiere a un agente que es capaz de disminuir o eliminar o inhibir el crecimiento de bacterias.
- 45 En una realización, la composición farmacéutica se formula como tampón, vagitorio, aerosol vaginal, copa vaginal, gel vaginal, inserto vaginal, parche vaginal, anillo vaginal, esponja vaginal, suppositorio vaginal, crema vaginal, emulsión vaginal, espuma vaginal, loción vaginal, pomada vaginal, polvo vaginal, champú vaginal, solución vaginal, aerosol vaginal, suspensión vaginal, comprimido vaginal, varilla vaginal, disco vaginal, dispositivo vaginal, y cualquier combinación de los mismos, o en los que la composición farmacéutica está presente en un artículo sanitario, como un tampón, una compresa, una compresa o pañal de incontinencia, o un salva-slips.
- 55 En una realización, la composición farmacéutica está adaptada para la administración al menos una vez al día, tal como al menos dos veces al día, tal como al menos tres veces al día.
- En una realización, la composición farmacéutica está adaptada para la administración no más de cada día por medio, tal como no más cada tres días, tal como no más de una vez a la semana.
- 60 En una realización, la composición farmacéutica está adaptada para la administración durante de no más de seis días.
- En una realización, la composición farmacéutica está adaptada para la administración durante al menos una semana, tal como durante al menos dos semanas, tal como durante al menos tres semanas, tal como durante al menos cuatro semanas.

En una realización, la composición farmacéutica está adaptada para la administración para al menos una vez al día durante al menos una semana.

5 En una realización, la composición farmacéutica está formulada para liberar el compuesto según la Fórmula I a lo largo de un período prolongado de tiempo, tal como por sobre al menos 4 h, tal como por sobre al menos 6 h, tal como por sobre al menos 24 h después de la administración.

10 El término "biopelícula" como se utiliza en este documento se refiere a un agregado de microorganismos donde las células microbianas se adhieren una con otra y/o a una superficie. Estas células adherentes a menudo están cubiertas con una matriz de sustancia polimérica extracelular, por ejemplo, que comprende ADN, proteínas y polisacáridos extracelulares, las cuales es producida por las células. Las células microbianas que crecen en una biopelícula a menudo son fisiológicamente distintas de las células planctónicas del mismo organismo. Tales biopelículas pueden formarse sobre cualquier superficie viva o inanimada.

15 *Método para su uso en la prevención del parto prematuro*

20 En una realización, la infección bacteriana es una vulvovaginitis bacteriana. Con madurez cervical, o insuficiencia cervical, dicha infección puede migrar hacia el útero y provocar corioamnionitis y posteriormente un parto prematuro. Existe evidencia que soporta la inflamación excesiva, tal como una vaginitis o cervicitis, a través de la producción de prostaglandinas puede provocar contracciones, y un nacimiento prematuro incluso en ausencia de una corioamnionitis manifiesta. El neonato de pretérmino puede posteriormente enfrentarse a una infección bacteriana invasiva; neumonía, meningitis o sepsis, debido a la inmunodeficiencia neonatal en el infante prematuro. Especialmente los estreptococos del grupo A y B y bacterias multirresistentes pueden dar origen a una infección perinatal seria en el lactante y una endometritis postparto en la mujer que recientemente ha dado a luz y ser la causa tanto de una morbilidad y mortalidad seria neonatal como materna.

25 30 En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de Fórmula XX, o lactona del mismo, tal como un compuesto de Fórmula XIX o XXI, para su uso en la prevención del parto prematuro causado por vulvovaginitis bacteriana. En una realización preferida, dicho compuesto se administra por vía vaginal. El compuesto puede formularse como tampón, vagitorio, aerosol vaginal, copa vaginal, gel vaginal, inserto vaginal, parche vaginal, anillo vaginal, esponja vaginal, suppositorio vaginal, crema vaginal, emulsión vaginal, espuma vaginal, loción vaginal, pomada vaginal, polvo vaginal, champú vaginal, solución vaginal, aerosol vaginal, suspensión vaginal, comprimido vaginal, varilla vaginal, disco vaginal, dispositivo vaginal, y cualquier combinación de los mismos, o en los que el compuesto está presente en un artículo sanitario, como un tampón, una compresa, una compresa o pañal de incontinencia, o un salva-slips.

35 *Ejemplos*

40 *Ejemplo 1: Efectos de diferentes ácidos carboxílicos hidroxilados*

Ensayo de la formación de biopelícula

45 50 Las cepas de levadura (Tabla 1) se cultivaron a 37 °C en medio completo YPD (0,5% de extracto de levadura, 1% de peptona, 2% de glucosa) o en medio mínimo consistente en YNB (base nitrogenada de levadura sin aminoácidos ni sulfato amónico, FORMEDIUM™, CYN0505) suplementado con 0,5% de sulfato amónico, 0,2% de glucosa y 100 mM de L-prolina. En caso necesario, se utilizó agar al 2% para solidificar los medios. El medio mínimo líquido (YNB (base nitrogenada de levadura sin aminoácidos ni sulfato amónico, FORMEDIUM™, CYN0505) suplementado con 0,5% de sulfato amónico, 0,2% de glucosa y 100 mM de L-prolina) se utilizó para el ensayo de biopelículas (medio de biopelícula).

55 En los experimentos sobre el impacto del pH en la biopelícula, se obtuvieron los valores de pH (de 2,6 a 6,6) utilizando diferentes tampones de fosfato potásico a la concentración final de 0,25 M, o mediante la adición de ácido cítrico, ácido láctico y ácido glucónico al medio de biopelícula.

Tabla 1. Cepas de Levadura utilizadas en este estudio.

Nombre Original	Denominación de Laboratorio para la cepa	Descripción	Referencia
<i>Candida albicans</i> SC5314	Y775	Tipo virulenta en un modelo de ratón de infección sistémica, cepa secuenciada	[A. M. Gillum, et al. Mol. Gen. Genet. 1984, 198, 179-182]

<i>Candida glabrata</i> Y1092 CBS138	Cepa tipo Silvestre, aislada de deposiciones humanas, cepa secuenciada	[B. Dujon, et al. Nature, 2004, 430, 35-44]
---	--	---

La biopelícula se midió en cultivo líquido como se describe [K. Scherz et al., G3 (Bethesda), 2014, 4, 1671-1680. I. Serrano-Fujarte et al. Biomed Res Int. 2015;2015:783639] con algunas modificaciones. Antes del ensayo de biopelícula, los cultivos de levadura se hicieron crecer en medio YPD líquido durante 24 h hasta la fase estacionaria (OD_{600} 11-17)², las células se precipitaron por centrifugación (1699 g), se lavaron con agua estéril y las células se inocularon de nuevo en medio de biopelícula de ensayo (YNB (base nitrogenada de levadura sin aminoácidos ni sulfato de amonio) suplementado con 0,5% de sulfato amónico, 0,2% de glucosa y 100 mM de L-prolina pH7,0) a una concentración final de 0,2 OD_{600} /mL y se incubaron en placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos (Sigma Aldrich, placas de cultivo Corning® Costal®, CLS3596-50EA) durante 72 h a 37 °C de temperatura. En puntos temporales definidos se añadió violeta cristal (HT901-8FOZ; Sigma Aldrich) al medio a una concentración final del 0,05%, además se midió la biomasa total. Tras 24 h de tinción de las células, los pocillos de las placas se lavaron cuatro veces con 200 μ L de agua para eliminar las células planctónicas, a continuación se secaron las biopelículas y se disolvieron en 200 μ L de etanol al 96%. Las mediciones de la biomasa total y de la tinción con violeta de cristal de las biopelículas se realizaron a OD_{560} con el lector de placas FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH. Las mediciones de biopelícula con violeta de cristal se normalizaron con respecto a la biomasa total (OD_{560} Biofilm/ OD_{560} biomasa total).

Efectos de distintos ácidos carboxílicos hidroxilados

Para comparar los efectos de distintos ácidos carboxílicos hidroxilados a concentraciones bajas, se midió la formación de la biopelícula a las 24 h luego de la adición de 0,06% en peso de ácido glicérico, ácido xilónico, ácido cítrico, ácido glucónico y ácido láctico, bajo condiciones no tamponadas. Los datos se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 1.

Tabla 2. Efecto de bajas concentraciones (0,06%) de ácidos carboxílicos hidroxilados sobre la formación de biopelícula de *Candida albicans*. La biopelícula se midió luego de 24 h

	pH resultante	biopelícula estandarizada (% del control)
ácido glicérico (GlyA)	7,0	40
ácido xilónico (XA)	7,0	31
ácido cítrico (CA)	4,6	14
ácido glucónico (GA)	6,5	6
ácido láctico (LA)	4,9	13

Como se puede observar a partir de la Tabla 2, el ácido glucónico es el compuesto más eficaz, seguido por ácido láctico y ácido cítrico. Al reemplazar el ácido láctico por ácido glucónico resultó > 50% menos de formación de biopelícula (6% versus 13% de control). Ya que la formación de la biopelícula es muy sensible a un pH bajo y que el ácido glucónico solamente induce una disminución moderada de pH en comparación con el ácido láctico y el ácido cítrico, el resultado es sorprendente.

*Ejemplo 2: Formación de Biopelícula de *Candida albicans* a diferentes pH*

Para poder evaluar además el efecto del ácido glucónico en la prevención de la formación de la biopelícula, se determinó la formación de biopelícula a distintos pH (como se describe en el Ejemplo 1) para ácido glucónico, ácido láctico y ácido cítrico.

Como se puede observar a partir de la Tabla 3, el ácido glucónico muestra fuertes efectos sobre la formación de la biopelícula de *Candida albicans*, mientras que los efectos del ácido láctico y el ácido cítrico son mucho menos pronunciados. Además, el ácido glucónico muestra un fuerte efecto también a valores de pH de hasta alrededor de al menos 6, mientras que el efecto observado con el ácido láctico y el ácido cítrico comienza a disminuir ya a pH 5. Además, el ácido glucónico resulta en una completa pérdida de la formación de biopelícula a pH 2,6. Los datos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Formación de biopelícula de *Candida albicans* mediante la adición de ácido glucónico, ácido láctico o ácido cítrico (24 h de tratamiento).

	ácido glucónico	ácido láctico	ácido cítrico	tampón
Biopelícula estandarizada (OD_{560}) a pH 6,1	0,17	3,1	4,6	3,2
Biopelícula estandarizada (OD_{560}) a pH 2,6	0	1,6	0,34	0,25

*Ejemplo 3: Formación de la biopelícula de *Candida glabrata* a diferentes pH*

- 5 La cepa *Candida glabrata* es mucho más complicada de tratar, comparada con la *Candida albicans*. Sin embargo, un efecto claro se obtiene por tratamiento más largo, es decir 72 h con ácido glucónico (Tabla 4).

10 **Tabla 4.** Formación de biopelícula de *Candida glabrata* por adición de ácido glucónico, ácido láctico o ácido cítrico. (72 h de tratamiento).

	ácido glucónico	ácido láctico	ácido cítrico	tampón
Biopelícula estandarizada (OD_{560}) a pH 6,1	1,6	2,8	2,9	4,7
Biopelícula estandarizada (OD_{560}) a pH 2,6	0,07	0,9	1,0	4,8

En base a estos resultados se concluyó que el ácido glucónico tiene un efecto superior en la determinación de la formación de la biopelícula por *Candida* en comparación con el ácido láctico y el ácido cítrico. En contraste con el efecto observado para el ácido láctico y el ácido cítrico, el efecto observado para el ácido glucónico no es simplemente un efecto relacionado con el pH. El efecto está presente incluso a pH 6.

Por lo tanto se concluye que el ácido glucónico es útil como un compuesto antifúngico, como se indica mediante la reducción de la formación de la biopelícula. El compuesto es fisiológica y farmacéuticamente aceptable. Por lo cual, el ácido glucónico es útil para proporcionar formulaciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de candidiasis vulvovaginal.

Ejemplo 4: Preparación de derivados de ácido glucónico

25 Lactonización/oligomerización de ácido glucónico:

Se vertió ácido glucónico (GA) (50% en peso en H_2O , 4 g) en un vial abierto y se calentó a 120°C. luego de 24 h, la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente, mientras se solidificó.

30 Para analizar la composición de la solución acuosa de ácido glucónico (GA), se disolvió en GA (50% en peso en H_2O) en DMSO-d⁶ y se analizó por ¹H- y ¹³C-NMR.

Ácido glucónico lactonizado/oligomerizado (cf. Anterior) se disolvió en DMSO-d⁶ y se analizó por ¹H- y ¹³C-NMR, véase la Tabla 5.

35 **Tabla 5.** Composición de GA, GA lactonizado y oligomerizado, analizado por ¹H- y ¹³C-NMR.

Compuesto	DMSO-d ⁶ (¹ H y ¹³ C)
GA [526-95-4]	70% ácido glucónico 15% glucono-δ-lactona 15% γ-gluconolactona
GA Lactonizado y oligomerizado	10% ácido glucónico 25% δ-gluconolactona 50% γ-gluconolactona 15% material oligomerizado

Se concluyó que el GA forma una mezcla compleja de distintas lactonas así como material oligomerizado frente a la deshidratación prolongada.

40 *Ejemplo 5: Hidrólisis de glucono-δ-lactona (GDA)*

La solución glucono- δ -lactona en agua (GDA) se encuentra en equilibrio con el ácido glucónico (GA, CAS 526-95-4). Se agregó GDA (200 mg) a H₂O destilada (20 mL), tampón pH 4, tampón pH 5, o tampón pH 7 a 37°C. Se midieron la rotación óptica y el pH a lo largo del tiempo. La rotación óptica, se midió a 37°C, línea D de sodio, C = 10 mg/mL, longitud de la trayectoria = 10 cm. La rotación óptica de GDA es de aproximadamente 66°. La rotación óptica del ácido glucónico es de aproximadamente 5° [D. T. Sawyer, J. B. Bagger, J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, 5302-5306].

Este experimento muestra que GDA se hidroliza lentamente a una mezcla de GDA y GA (Figura 2). El equilibrio es dependiente del pH y las concentraciones importantes de GDA están presentes en todas las condiciones tamponadas.

Ejemplo 6: Formación de biopelícula en un modelo de condiciones in vivo utilizando ácido glucónico (GA)

Se añadieron gránulos de ácido glucónico lactonizado/oligomerizado (1,3 g, muestras duplicadas) a una solución amortiguadora de pH 3,71 (1,3 g, muestras duplicadas) a una solución tamponada de pH 3,71 (KH₂PO₄/ácido ortofosfórico, 0,5 M, 10 mL) a 37°C. Se tomaron muestras (4 mL) cada hora (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h) y se agregó nueva solución tampón (4 mL). Se diluyeron las muestras 50 veces con medio para biopelícula (vide supra) y la cantidad de formación de biopelícula se midió luego de 24 h como se describió anteriormente. Como se observa a partir de la Figura 4A, el GA liberado reduce significativamente la cantidad de formación de biopelícula en *Candida albicans*. Además, la hidrólisis del pellet es aparentemente lo suficientemente lenta para proporcionar un efecto preventivo por al menos hasta 6 h, probablemente mucho más. El efecto es menos pronunciado con *Candida glabrata* (Figura 4B). Los datos se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Formación de la biopelícula de *Candida albicans* y *Candida glabrata* tratada con GA lactonizado/oligomerizado en un modelo de condiciones in vivo. Se tomaron muestras después de 1 hora, se diluyeron 50 veces con medio para biopelícula y se midió la cantidad de formación de biopelícula luego de 24 h

Biopelícula estandarizada (% del control), 1 h	
<i>Candida albicans</i>	6,5
<i>Candida glabrata</i>	42

Ejemplo 7: Formación de biopelícula en un modelo de condiciones in vivo utilizando glucono- δ -lactona

Se agregaron gránulos de glucono- δ -lactona (GDA) (2,5 g, muestras duplicadas) a una solución tampón de pH 3,71 (KH₂PO₄/ácido ortofosfórico, 0,5 M 10 mL) a 37°C. Se tomaron muestras (4 mL) a puntos de tiempo fijos (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 h) y se agregó una nueva solución tampón (4 mL). Se diluyeron las muestras 50 veces con medio de biopelícula (vide supra) y la cantidad de formación de biopelícula se midió luego de 24 h como se describió anteriormente. Como se observa en la Figura 5A, la GDA liberada reduce significativamente la cantidad de formación de biopelícula en *C. albicans*. Además, la hidrólisis del gránulo es aparentemente lo suficientemente lenta para proporcionar un efecto preventivo por al menos hasta 24 h, probablemente mucho más. El efecto es menos pronunciado con *C. glabrata* (Figura 5B).

Tabla 7. Formación de Biopelícula de *C. albicans* y *C. glabrata* tratada con GDA en un modelo de condiciones in vivo. Las muestras fueron tomadas después de 1 hora, se diluyeron 50 veces con medio de ensayo de biopelícula y se midió la cantidad de formación de la biopelícula luego de 24 h.

	Biopelícula estandarizada (% del control), 1 hora
<i>Candida albicans</i>	8,3
<i>Candida glabrata</i>	71

Los resultados muestran que la formación de biopelícula de ambas *C. albicans* como de *C. glabrata* se redujo en presencia de GDA. Además de la formación disminuida de la biopelícula, GDA puede afectar la viabilidad de la biopelícula madura de *C. albicans* y *C. glabrata*.

*Ejemplo 8: Viabilidad de las biopelículas maduras de *C. albicans* y *C. glabrata* tratadas con glucono- δ -lactona*

Se evaluó la viabilidad de las biopelículas de *C. albicans* y *C. glabrata* tras el tratamiento con glucono- δ -lactona (GDA) a distintas concentraciones y distintos períodos de tiempo mediante la tinción de las células con XTT. El XTT es un ensayo colorimétrico para la cuantificación de la viabilidad celular y la citotoxicidad. El ensayo se basa en la escisión de la sal de tetrazolio XTT, una conversión que sólo se produce en células viables. La biopelícula madura se expuso a GDA durante 24 h. A continuación, las células se lavaron 2 veces

con PBS, tras lo cual se añadió la mezcla de reacción XTT. Después de 30 min se midió la densidad óptica a 485 nm.

5 El ensayo XTT mostró una fuerte disminución de la viabilidad para *C. glabrata* ya después de 24 h de incubación (Fig 6A). El efecto fue menos pronunciado para *C. albicans* pero se observó claramente después de 48 h (Fig 6B).

10 Además, se incubó biopelícula madura (crecido durante 48 h en YNB, 0,2% glucosa, 100 mM prolina) de *C. albicans* y *C. glabrata* con GDA de diferentes concentraciones (0,05 - 0,5 g/mL) a 37 °C. Para ello, se retiró el medio de biopelícula (YNB, 0,2% de glucosa, 100 mM de prolina) y se añadió GDA, que se disolvió en agua en concentraciones de 0,05, 0,1, 0,2 y 0,5 g/mL. Luego de la incubación con GDA por 5 h o 73 h, se plaquearon 5 µL de células en dilución seriada (1:10 a 1:1000) en el medio YPD agar para estimar la sobrevivencia celular. Las células plaqueadas se incubaron durante 24 h a 37°C y se analizaron visualmente. Las células de la biopelícula madura tratadas con agua fueron usadas como un control. Se encontró que GDA disminuye la viabilidad celular de *C. albicans* y de *C. glabrata*, particularmente a altas concentraciones. A las concentraciones de 0,2 y 0,5 g/mL luego de 5 h de incubación, disminuyó la viabilidad celular en aproximadamente de 100 veces para ambos *C. albicans* y *C. glabrata*. Luego de 73 h de incubación con 0,5 g/mL de GDA, la viabilidad celular de *C. albicans* se redujo en alrededor de 1000 veces (datos no mostrados). *C. glabrata* mostró ser más sensible a GDA (Figura 7).

20 *Ejemplo 9: Estudio microfluídico del desarrollo de la biopelícula*

Para monitorear la morfología celular de *C. albicans*, estudiamos el desarrollo de la biopelícula también utilizando microscopía y estudio microfluídico. Luego de inocular las células de levadura, las hifas comenzaron a formarse dentro de la primera hora de incubación en el medio para biopelícula (YNB complementado con prolina 100 mM y glucosa al 0,2%, pH 7,0). La Figura 8A muestra las células no tratadas luego de 5 h. Se agregó un pellet de glucono-δ-lactona (2,5 g) a la solución tampón de pH 3,71 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{ácido ortofosfórico}$, 0,5 M 10 mL) a 37°C. Se tomó una muestra luego de 1 hora y se diluyó 50 veces con medio para biopelícula y se agregó a *C. albicans*. Luego de 5 h, la mayoría de las células tratadas eran planctónicas (Figura 8B).

Ejemplo 10: Viabilidad de distintas especies de Candida en presencia de glucono-δ-lactona

Otras *Candida* sp. estudiadas también fueron sensibles a glucono-δ-lactona (GDA) (es decir, la medición de la viabilidad celular utilizando el ensayo XTT, cf. Ejemplo 8). Sin embargo, estas presentan diferentes niveles de sensibilidad. La cepa *Candida albicans* SC5314 exhibió la menor susceptibilidad y la cepa aislada *Candida krusei* A4-1 en silicona presentó la mayor susceptibilidad. La toxicidad por GDA es mediada a través del daño a la pared celular en la medida que las células expuestas a GDA tuvieron una menor viabilidad en el medio con calcofluor blanco comparado con aquel complementado con estabilizador osmótico (sacarosa 0,5 M) y comparado con las células no tratadas en estos medios. La Tabla 3 resume los efectos cualitativos mostrados por GDA.

Table 8. Sensibilidad de distintas especies de Candida a GDA

Cepa	Sensibilidad a GDA, 24 h de exposición, placas
<i>C. albicans</i> SC5314	+
<i>C. glabrata</i> CBS138	++++++
<i>C. tropicalis</i> aislado U3-3 en silicona	++++++
<i>C. krusei</i> aislado U3-5 en silicona	++
<i>C. tropicalis</i> aislado A6-1 en silicona	+++
<i>C. krusei</i> aislado U2-12 en silicona	++++++
<i>C. krusei</i> aislado A5-2 en silicona	++
<i>C. krusei</i> aislado A4-1 en silicona	++++++

45 Para concluir, (i) GDA puede romper la biopelícula Madura formada por *C. albicans* y *C. glabrata*, (ii) frente a la exposición a GDA, *C. albicans* se transforma a una forma de levadura, mientras que la viabilidad de *C. glabrata* disminuye, (iii) el efecto es claro Incluso sobre otras Cepas, es decir *C. tropicalis* y *C. krusei*.

Ejemplo 11: Cooligomerización de ácido glucónico (GA) con ácido láctico (LA)

LA: GA (relación molar 4:1)

- 5 Se mezclaron ácido DL-Láctico (563 mg, 6,26 mmol) y ácido D-glucónico (50% en agua, 0,50 mL, 1,57 mmol) en un tubo de ensayo y se calentó a 130°C. Luego de 4 h, se aumentó la temperatura a 140°C. Luego de un total de 27 h, la mezcla de reacción se permitió que alcanzara la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se solidificó al enfriarse.

10 LA: GA (relación molar 8:1)

- 15 Se mezclaron ácido DL-Láctico (569 mg, 6,32 mmol) y ácido D-glucónico (50% en agua, 0,25 mL, 0,78 mmol) en un tubo de ensayo y se calentó a 130°C. Luego de 4 h, la temperatura se aumentó a 140°C. Luego de un total de 27 h, la mezcla de reacción se permitió que alcanzara la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se solidificó al enfriarse.

LA: GA (proporción molar de 16:1)

- 20 Se mezclaron ácido DL-Láctico (565 mg, 6,28 mmol) y ácido D-glucónico (50% en agua, 0,35 mL, 0,39 mmol) en un tubo de ensayo y se calentó a 130°C. Luego de 4 h, la temperatura se aumentó a 140°C. Después de un total de 27 h, la mezcla de reacción se permitió que alcanzara la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se solidificó al enfriarse.

25 LA: GA (relación molar 10:1, mezcla directa)

- 30 Se mezclaron ácido DL-Láctico (1 g, 11 mmol) y ácido D-glucónico (50% en agua, 0,35 mL, 0,78 mmol) en un tubo de ensayo y se calentaron a 130°C bajo vacío. Luego de un total de 22 h, la mezcla de reacción se permitió que alcanzara la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se volvió casi completamente sólida al enfriarse.

LA: GA (relación molar 10: 1, precalentamiento por 5 h)

- 35 Se precalentó ácido DL-Láctico (1 g, 11 mmol) a 130°C bajo vacío. Luego de 5 h, se agregó ácido D-glucónico (50% en agua, 0,35 mL, 1,1 mmol). Luego de otras 16 h bajo vacío a 130°C, se permitió que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se solidificó al enfriarse.

1 % en peso de CA en GA

- 40 Se mezclaron ácido D-glucónico (50% en agua, 4 g) y ácido cítrico monohidratado (20 mg, 1% en peso) en un tubo de ensayo y se calentó a 120°C. Luego de un total de 15 h, la mezcla de reacción se permitió que alcanzara la temperatura ambiente. La mezcla de reacción no se solidificó al enfriarse.

5 % en peso de CA en GA

- 45 Se mezclaron ácido D-glucónico (50% en agua, 4 g) y ácido cítrico monohidratado (105 mg, 5% en peso) en un tubo de ensayo y se calentó a 120°C. Luego de un total de 15 h, la mezcla de reacción se permitió que alcanzara la temperatura ambiente. La mezcla de reacción no se solidificó al enfriarse.

50 10 % en peso de CA en GA

Se mezclaron ácido D-glucónico (50% en agua, 4 g) y ácido cítrico monohidratado (222 mg, 10% en peso) en un tubo de ensayo y se calentó a 120°C. Luego de un total de 15 h, la mezcla de reacción se permitió que alcanzara la temperatura ambiente. La mezcla de reacción no se solidificó al enfriarse.

- 55 A partir de estos resultados mostramos que el ácido glucónico se puede oligomerizar con ácido láctico para formar un sólido, al contrario del ácido glucónico puro o ácido láctico donde ambos son líquidos.

*Ejemplo 12: Efecto de glucono- δ -lactona y azúcares ácidos en *E. coli**60 Condiciones de crecimiento

- 65 La cepa bacteriana *Escherichia coli* K12 se utilizó para el estudio de la biopelícula. Esta cepa se mantuvo en medio LB a 37 °C. Se estudió la biopelícula en medio sintético M9 (sales mínimas M9 x1 (Sigma M6030), MgSO₄ 2 mM, CaCl₂ 0,1 mM y glucosa al 0,2%), la cual contenía tampón fosfato, ácido cítrico, ácido láctico, ácido glucónico o glucono- δ -lactona para obtener medios con distintos pH (2,6 a 6,6).

Biopelícula

5 El cultivo durante la noche de *E. coli* K12 (OD₆₀₀~5,0) se lavó con agua estéril y se inoculó a la concentración final de 0,2 OD/mL de Medio M9 con distintos pH de compuestos diferentes. El desarrollo de la biopelícula se estudió en placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano con 96 pocillos (Sigma Aldrich, Corning® Costar® culture plates, CLS3596-50EA). La biopelícula se tñó con cristal violeta.

10 Durante el experimento de biopelícula (24-48 horas) la cepa bacteriana había aumentado su biomasa (2-3 veces) sólo en el medio M9 suplementado con tampón fosfato a pH 6,1 y pH 6,6 (**Fig. 9**). La biomasa fue menor en otros medios y observamos la disminución de la biomasa bacteriana con la disminución del pH del medio. Los ácidos (ácido cítrico, ácido láctico, ácido glucónico) y la glucono- δ -lactona tuvieron un efecto inhibidor sobre el crecimiento. Además de la inhibición del crecimiento, la reducción del pH del medio provocó una disminución de la formación de biopelículas. La menor cantidad de biopelícula se observó en el medio 15 suplementado con ácido glucónico. El segundo más eficaz en la inhibición de la biopelícula fue el ácido láctico, seguido de la glucono- δ -lactona. En comparación con el medio de fosfato, la biopelícula en el medio de ácido glucónico era 38 veces menor a pH 2,6 y 15 veces menor a pH 3,0 A pH 6,6, el glucónico y el láctico redujeron la biopelícula ~2 veces. La glucono- δ -lactona a pH 2,6 disminuyó la formación de biopelícula 14,2 veces a las 24h y 30 veces a las 48h, respectivamente.e.

20 La disminución del pH del medio tuvo un efecto claro sobre el desarrollo de la biopelícula de *E. coli*, lo cual está probablemente asociado con el efecto bactericida (la menor biopelícula se acompañó por una menor biomasa).

25 *Ejemplo 13: ensayo MIC de glucono- δ -lactona sobre Gardnerella vaginalis, Lactobacillus Crispatus y Lactobacillus iners*

Cepas

30 *Gardnerella vaginalis* CCUG 3717

Lactobacillus crispatus CCUG 44128

Lactobacillus iners CCUG 44025

35 Preparación de inóculos

40 *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus iners*, y *Lactobacillus Crispatus* mediante fueron recuperadas por CCUG (Colección de Cultivo por la Universidad de Gothenburg). Las placas de subcultivo fueron preparadas para *G. vaginalis* sobre placas de GL-Chocolate y *Lactobacillus* spp. en placas de agar M.R.S. a 5% de CO₂, 36°C. Se prepararon los inóculos a partir de las placas de subcultivo. Las colonias se inocularon en tubos de cultivo con 5 mL de medio de ensayo y se mezclaron en vortex por 2 minutos con alrededor de 10 perlas de vidrio de 3 mm de diámetro. Se tomaron colonias hasta que la turbidez de la solución tuvo una OD₄₇₅ de 0,4 a 0,5. Las soluciones bacterianas fueron verificadas por microscopía de luz a x40 con contraste de fase para 45 asegurarse que las células estuviesen dispersas. Cada suspensión bacteriana se diluyó en su medio de prueba, 1:100, para igualar a 1 a 3 x 10⁶ UFC/mL. Las soluciones microbianas fueron almacenadas a 20°C durante la preparación de los inóculos

Preparación de Microdilución y el ensayo MIC

50 La solución de la sustancia de ensayo se preparó de manera aséptica a 1 g/mL en H₂O estéril. La primera hilera de pocillos se llenó con 100 μ L de sustancia y luego se realizaron diluciones 2 veces de manera vertical en 8 etapas. Se incluyeron controles: i) controles de crecimiento para cada cepa (+ ctrl) = el respectivo microorganismo en medio de ensayo sin agente antimicrobiano (AM), ii) sin control de crecimiento (- ctrl) = medio de ensayo y sustancia en la mayor concentración probada, esto es para asegurarse de que la sustancia sola no genere un cambio de color del medio de ensayo, iii) control de gentamicina para cada cepa

55 Luego, se añadieron 100 μ L de microorganismos y las placas se agitaron suavemente a 500 rpm por 30 segundos antes de la incubación a 35°C y 90% de HR en el incubador de CO₂ ajustado a 5% de CO₂. Luego de 48 y 72 h de incubación, se midió la OD y se realizaron evaluaciones oculares. También se midió el pH para todas las diluciones, n = 1, pH = 6,8 a 7,1.

60 Se realizaron ensayos de microdilución MIC por triplicado para evaluar los valores MIC para GDA contra *G. vaginalis* (CAMHB) y *L. Crispatus* (IsoS-M.R.S.) luego de 48 h de incubación a 5% de CO₂ y *L. Iners* cultivadas bajo condiciones anaeróbicas luego de 120 h (Tabla 7).

Tabla 9. Concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) para GDA Contra *G. vaginalis* (CAMHB), *L. crispatus* (IsoS-M.R.S.), y *L. iners* (CAMHB).

Cepa	Identificación CCUG	MIC (g/mL)
<i>G. vaginalis</i>	CCUG 3717	0,001
<i>L. crispatus</i>	CCUG 44128	0,0078
<i>L. iners</i>	CCUG 44025	0,0078

- 5 El valor de la concentración inhibitoria mínima (MIC) para GDA contra *Gardnerella vaginalis* es mucho menor que el valor MIC para GDA contra *Lactobacillus iners* y *Lactobacillus Crispatus*. Por lo cual, GDA es más eficiente contra *Gardnerella vaginalis* que contra los benignos *Lactobacillus iners* y *Lactobacillus crispatus*.

10 *Ejemplo 14: Ensayo MIC para GDA en Escherichia coli, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Acetinobacter baumanii, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Estreptococos Beta-Hemolíticos de los Grupos C y G, y Porphyromonas gingivalis.*

Cepas

- 15 Aerobios:

Escherichia coli CCUG 3274/ATCC 10536

20 *Staphylococcus epidermidis* CCUG 23118

Staphylococcus aureus CCUG 15915/ATCC 29213

Pseudomonas aeruginosa (PAO1) CCUG 56489 / ATCC 15692

- 25 *Acetinobacter baumanii* CCUG 57035

Aerobios fastidiosos:

30 *Streptococcus pyogenes* CCUG 47803/ATCC 700294

Streptococcus agalactiae CCUG 29376

Grupos de Estreptococos Beta-Hemolíticos C, *Streptococcus dysgalactiae ss equisimilis* CCUG 4211

- 35 Grupos de Estreptococos Beta-Hemolíticos G, *Streptococcus dysgalactiae ss equisimilis* CCUG 7975

Anaerobio:

40 *Porphyromonas gingivalis* CCUG 25893 / ATCC 33277

Preparación de los inóculos

Todas las cepas se recuperaron de microbancos y se hicieron placas de estrías y subcultivos. Los aerobios en placas TSA, los aerobios fastidiosos en placas de sangre de caballo y los anaerobios en placas FAA.

- 45 Durante todo el estudio, los aerobios se cultivaron en condiciones aerobias, los fastidiosos al 5% de CO₂ y los anaerobios en condiciones anaerobias estrictas a 37°C. En el momento de la prueba, se suspendieron en 5 mL de solución salina, en tubos de 10 mL que contenían 10 perlas de vidrio de 3 mm de diámetro, trozos de colonias seleccionadas en placas de agar de 18 a 24 horas para los aerobios y los aerobios fastidiosos.

- 50 Los anaerobios se suspendieron en Concept 400 y el diluyente fue caldo Brucella reducido suplementado con hemina (5 µg/mL), vitamina K1 (1 µg/mL) y sangre de caballo lisada (5%). A continuación, las suspensiones celulares se agitaron enérgicamente en vórtex durante 1 minuto para obtener una suspensión turbia. Cada suspensión de aerobios y aerobios fastidiosos se ajustó para igualar la DO 0,28 a 475 nm utilizando un espectrofotómetro, que se correlaciona aproximadamente con 1-3 x 10⁸ UFC/mL con la mayoría de las especies.

55 En el caso de los anaerobios, la medición de la DO resultó difícil debido a la utilización de sangre en el medio de cultivo. Por ello, se suspendió hasta igualar a 0,5 Mc Farland estándar y se comprobó la densidad celular del inóculo mediante recuento en placa. Los aerobios y los aerobios fastidiosos se diluyeron 10 veces más en solución salina para que la concentración del inóculo fuera igual a 1,5 -3,0 X 10⁷ UFC/mL.

- 60 Las diferentes suspensiones de bacterias aerobias y aerobias fastidiosas se transfirieron a los respectivos pocillos de una placa de 96 pocillos. *A. baumannii*, *E. coli* y *P. aeruginosa* se colocaron en una fila, los

Staphylococci spp. se colocaron en una segunda fila y los aerobios fastidiosos se colocaron en una tercera fila de la placa. Los anaerobios se transfirieron desde un depósito de pipeta multicanal de 25 mL.

Preparación de la Microdilución y el ensayo MIC

5

Las preparaciones de microdilución y los ensayos MIC fueron llevados a cabo como en el ejemplo 13. Los ensayos de microdilución MIC se llevaron a cabo en triplicado para evaluar los valores MIC para glucono- δ -lactona (GDA) (Tabla 10).

- 10 **Tabla 10.** Concentraciones inhibidoras Mínimas (MIC) para GDA contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acetinobacter baumanii*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, Estreptococo Beta-Hemolítico Grupos C y G, y *Porphyromonas gingivalis*.

Cepa	Identificación CCUG	MIC (g/mL)
<i>A. baumannii</i>	CCUG 57035	0,0031
<i>E. coli</i>	CCUG 3274	0,0063
<i>P. aeruginosa</i>	CCUG 56489	0,0031
<i>S. aureus</i>	CCUG 15915	0,0063
<i>S. epidermidis</i>	CCUG 23118	0,0031
<i>S. agalactiae</i>	CCUG 29376	0,0031
Estreptococo Beta-Hemolítico Grupo C	CCUG 4211	0,0016
Estreptococo Beta-Hemolítico Grupo G	CCUG7975	0,0031
<i>S. pyogenes</i>	CCUG 47803	0,0031
<i>P. gingivalis</i>	CCUG 25893	0,0031

15

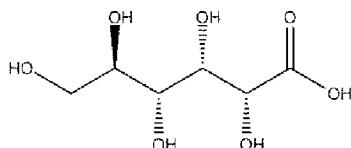
El valor de la concentración inhibitoria mínima (MIC) para GDA de *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acetinobacter baumanii*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, Estreptococo Beta-Hemolítico Grupos C y G y *Porphyromonas gingivalis* es por lo general menor que el valor MIC para GDA contra *Lactobacillus iners* y *Lactobacillus Crispatus* (Ejemplo 13). Por lo cual GDA es más eficiente contra estos patógenos que contra los benignos

20

Lactobacillus y el *Lactobacillus crispatus*.

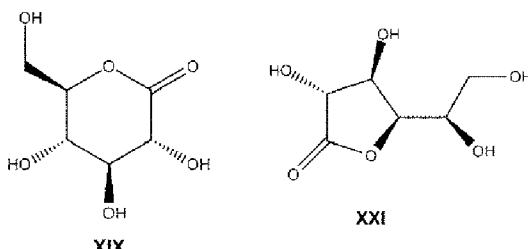
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula XX,



5

o una lactona del mismo, como un compuesto de fórmula XIX o XXI,



10

para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección bacteriana seleccionada del grupo que consiste en *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Prevotella* spp, *Enterococos*, *Bacteroides* spp, *Peptostreptococcus* spp, *Porphyromonas gingivalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acetinobacter baumanii*, *Streptococcus pyogenes*, *Estreptococos beta hemolíticos* del grupo C, *Estreptococos beta hemolíticos* del grupo G-, y/o infección por *Streptococcus agalactiae*.

15

2. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto es de Fórmula XIX o Fórmula XX.

20

3. El compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la infección microbiana es una infección urogenital.

4. El compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la infección microbiana es una infección vaginal.

25

5. El compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la infección bacteriana es vaginosis bacteriana.

30

6. El compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la infección se selecciona del grupo que consiste en:

a. dermatitis y/o eczema, como la dermatitis seborreica;

b. una infección secundaria de dermatitis o eczema

35

c. acné o afecciones acneiformes, como rosácea, dermatitis perioral o dermatitis periorbital

d. furunculosis

40

e. carbunculosis

f. foliculitis

g. impétigo

45

h. erisipela

i. periodontitis;

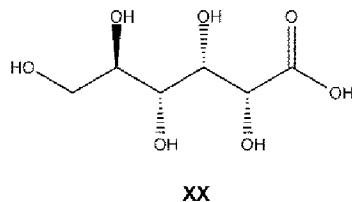
50

j. infección secundaria a la colonización de bacterias multirresistentes estreptococos del grupo A o B, como cuando la colonización es oral, nasal o anogástrica

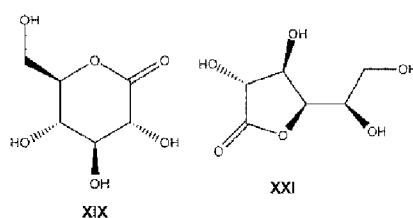
- k. dermatitis estreptocócica perianal;
- l. dermatitis intertriginosa;
- 5 m. paronquia;
- n. infección de heridas cutáneas infectadas
- o. una infección secundaria a uñas encarnadas o ampollas de los pies una infección se asocia a heridas de pie diabético;
- 10 p. infección secundaria a la mordedura de un animal
- q. infección secundaria a picaduras de insectos, mosquitos, tics, eritema migratorio o linfadenosis benigna cutánea;
- 15 r. una infección secundaria de herpes simple, como el herpes simple oral o genital; una infección secundaria de herpes zóster o varicela zóster;
- 20 s. blefaritis;
- t. conjuntivitis
- u. vaginitis; y
- 25 v. cervicitis.

7. El compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la infección es una infección en un mamífero, preferiblemente un humano, tal como una mujer, por ejemplo una mujer embarazada.

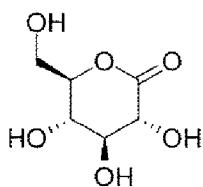
8. Un compuesto de fórmula XX,



35 o una lactona del mismo, tal como un compuesto de fórmula XIX o XXI,

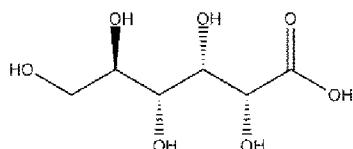


- 40 para su uso en el tratamiento de la vaginosis bacteriana, en la que la vaginosis bacteriana está causada por Gardnerella vaginalis, Mobiluncus spp, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis, Prevotella spp, Enterococci, Bacteroides spp, Peptostreptococcus spp, Porphyromonas gingivalis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Acetinobacter baumanii, Streptococcus pyogenes, Estreptococos beta hemolíticos del grupo C, Estreptococos beta hemolíticos del grupo G, y/o Streptococcus agalactiae.
- 45 9. El compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 u 8, en donde el compuesto es glucono-δ-lactona (Fórmula XIX),



XIX

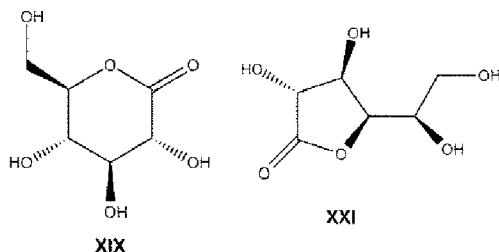
10. Un compuesto de Fórmula XX,



5

XX

o una lactona del mismo, tal como un compuesto de Fórmula XIX o XXI,



10

en donde el compuesto de Fórmula XX, XIX o XXI, se oligo/polimeriza para formar un oligo/polímero,

para su uso en el tratamiento y/o prevención de una infección bacteriana seleccionada del grupo que consiste en *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Prevotella* spp, *Enterococci*, *Bacteroides* spp, *Peptostreptococcus* spp, *Porphyromonas gingivalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acetinobacter baumanii*, *Streptococcus pyogenes*, Beta-Hemolytic Streptococci Group C, Beta-Hemolytic Streptococci Group G, y/o *Streptococcus agalactiae* infection.

11. El compuesto para uso según la reivindicación 10, en donde el oligómero o polímero comprende además ácido láctico.

12. El compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el compuesto está en una composición farmacéutica, en donde la composición farmacéutica comprende de 5 a 99 % en peso, tal como de 10 a 95 % en peso, tal como de 15 a 95 % en peso, tal como de 20 a 90 % en peso, tal como de 40 a 95 % en peso, tal como de 40 a 95 % en peso, tal como de 50 a 95 % en peso del compuesto de Fórmula XX o una lactona del mismo; y/o en la que la composición farmacéutica comprende no más del 10 % en peso de agua, tal como no más del 5 % en peso de agua.

13. El compuesto para uso según la reivindicación 12, en donde la composición farmacéutica se formula como tampón, vagitorio, aerosol vaginal, copa vaginal, gel vaginal, inserto vaginal, parche vaginal, anillo vaginal, esponja vaginal, suppositorio vaginal, crema vaginal, emulsión vaginal, espuma vaginal, loción vaginal, pomada vaginal, polvo vaginal, champú vaginal, solución vaginal, aerosol vaginal, suspensión vaginal, comprimido vaginal, varilla vaginal, disco vaginal, dispositivo vaginal y cualquier combinación de los mismos, o en los que la composición está presente en un artículo sanitario, como un tampón, una compresa, una compresa o pañal de incontinencia o un salva slip.

14. Un compuesto de Fórmula XX o una lactona del mismo para su uso en la prevención del parto prematuro causado por vulvovaginitis bacteriana.

40 15. El compuesto para uso según la reivindicación 14, en donde el compuesto se administra por vía vaginal.

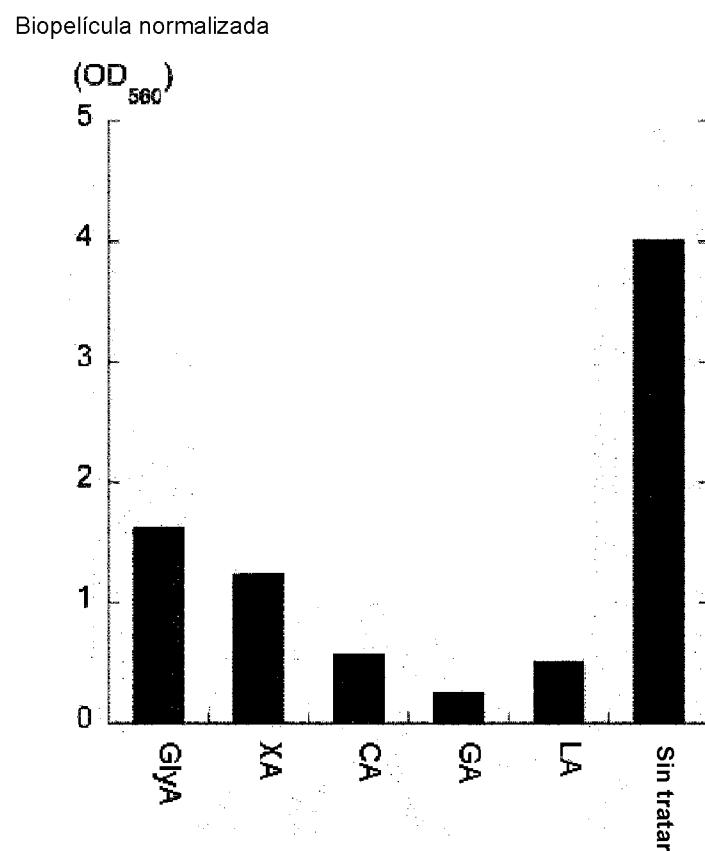


Figura 1

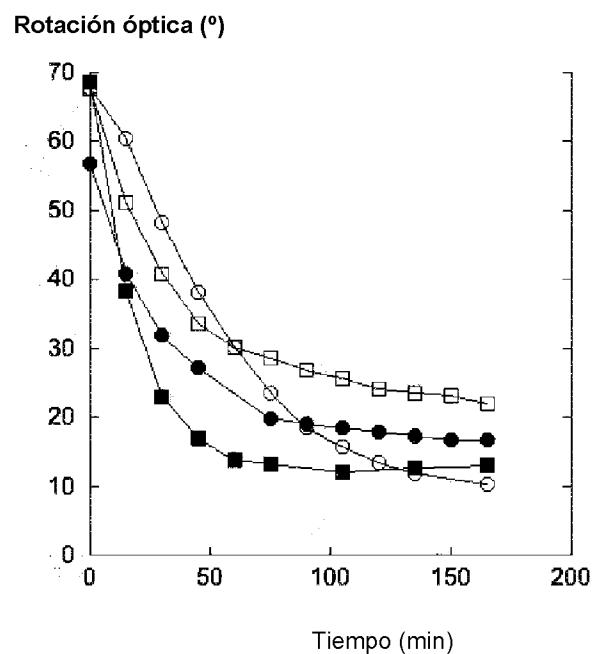


Figura 2

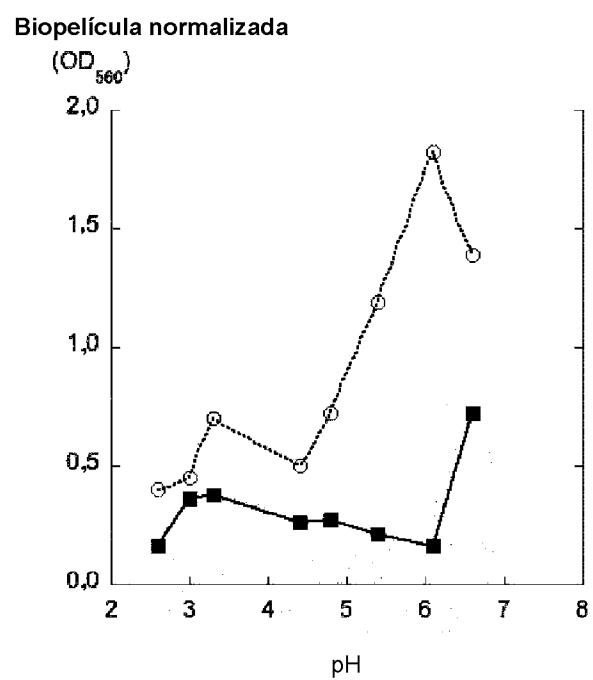


Figura 3

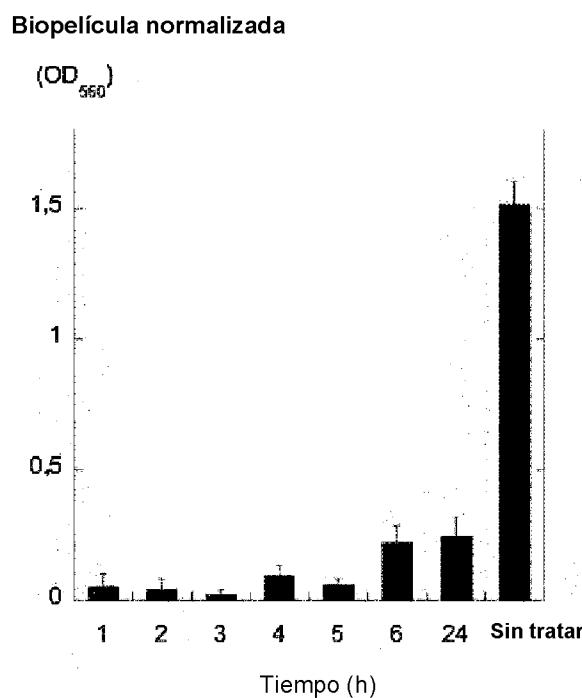
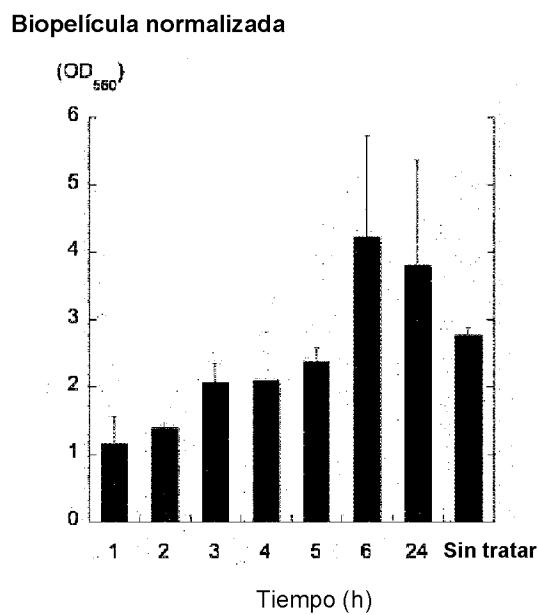
A**B**

Figura 4

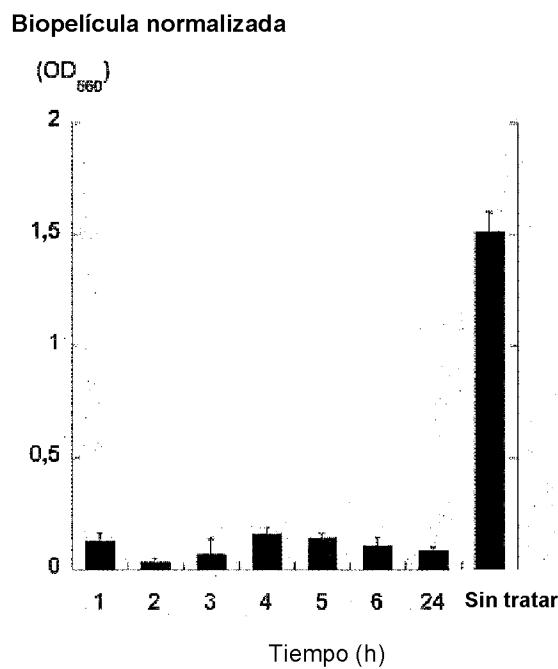
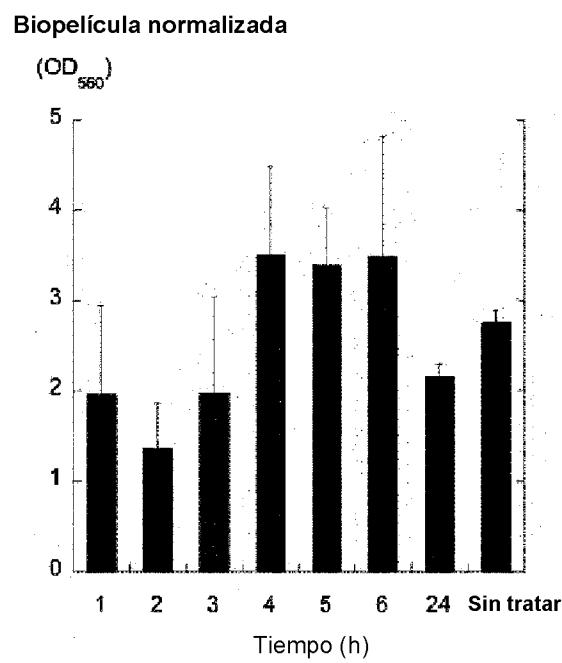
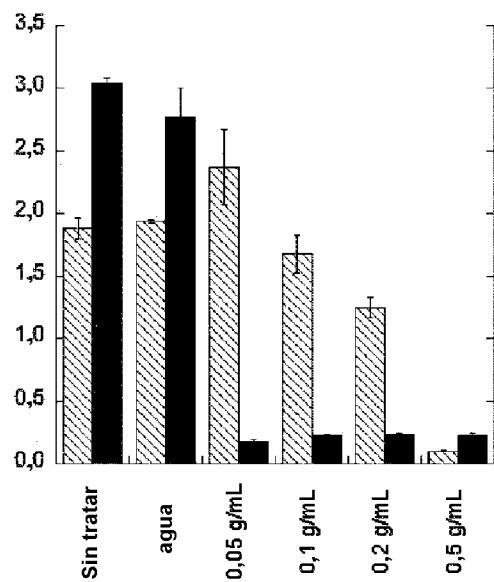
A**B**

Figura 5

A



B

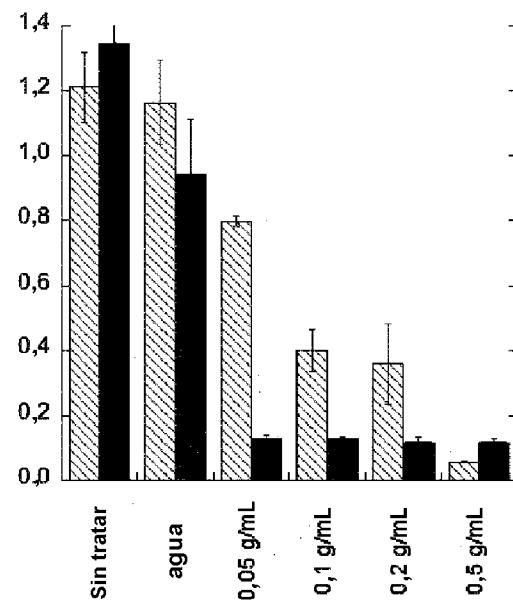


Figura 6

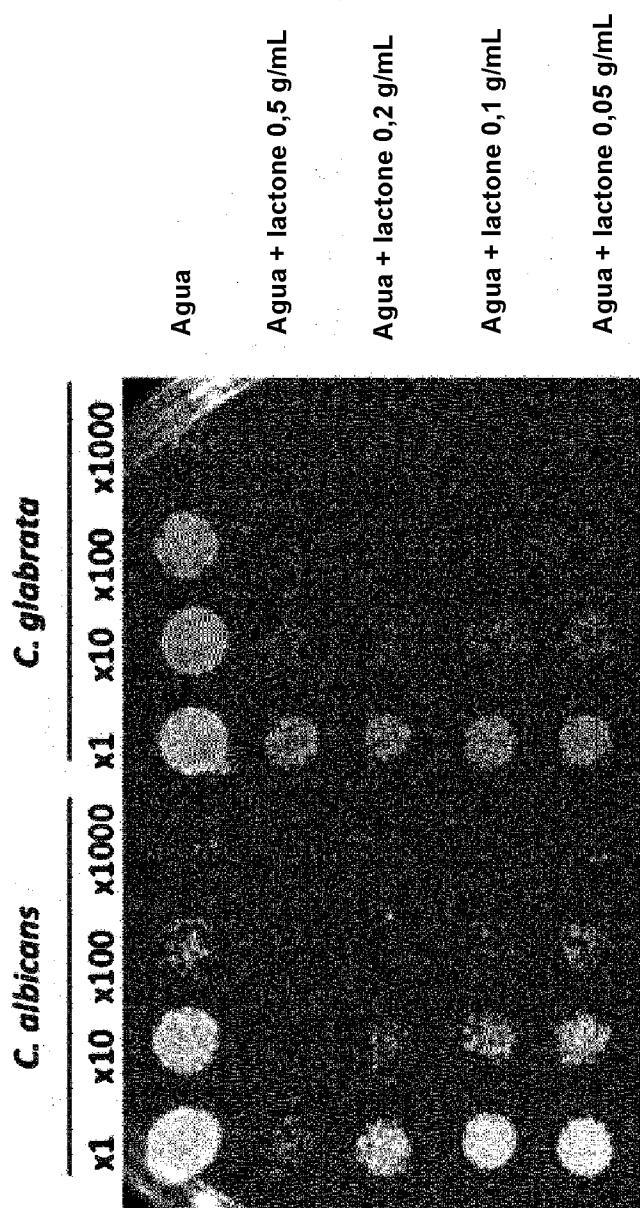


Figura 7

A

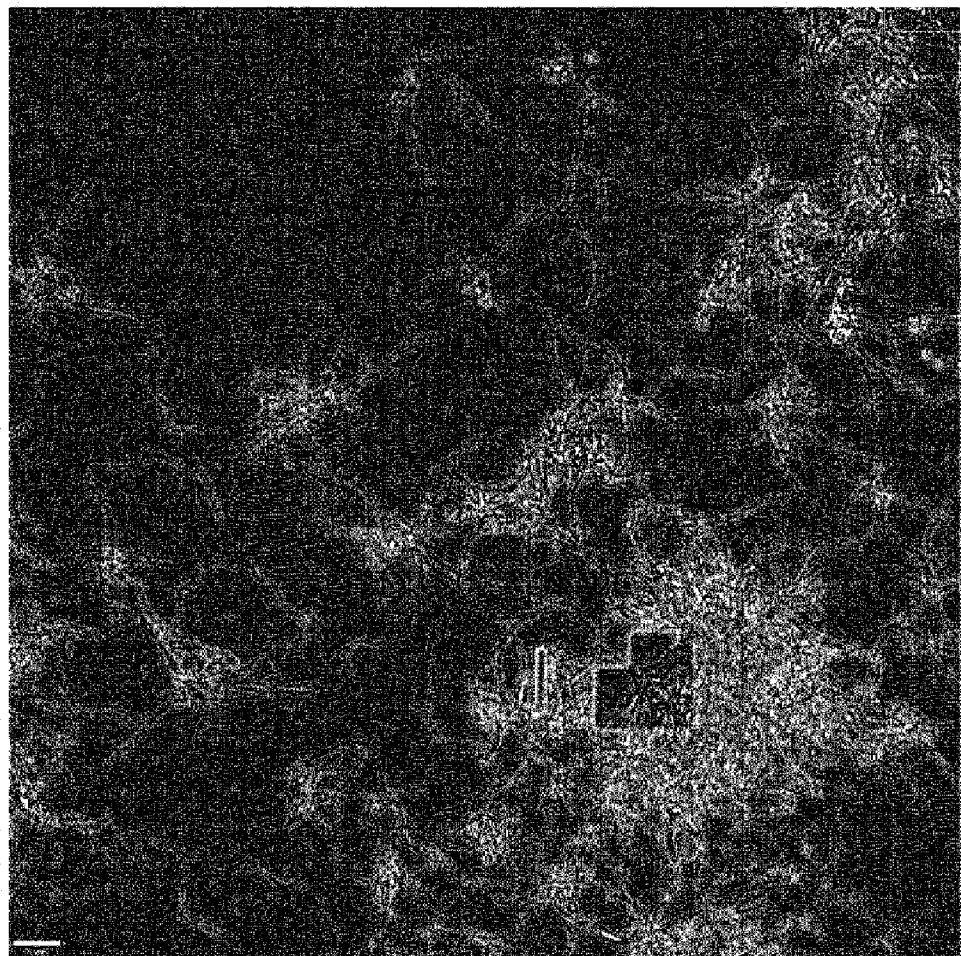


Figura 8

B

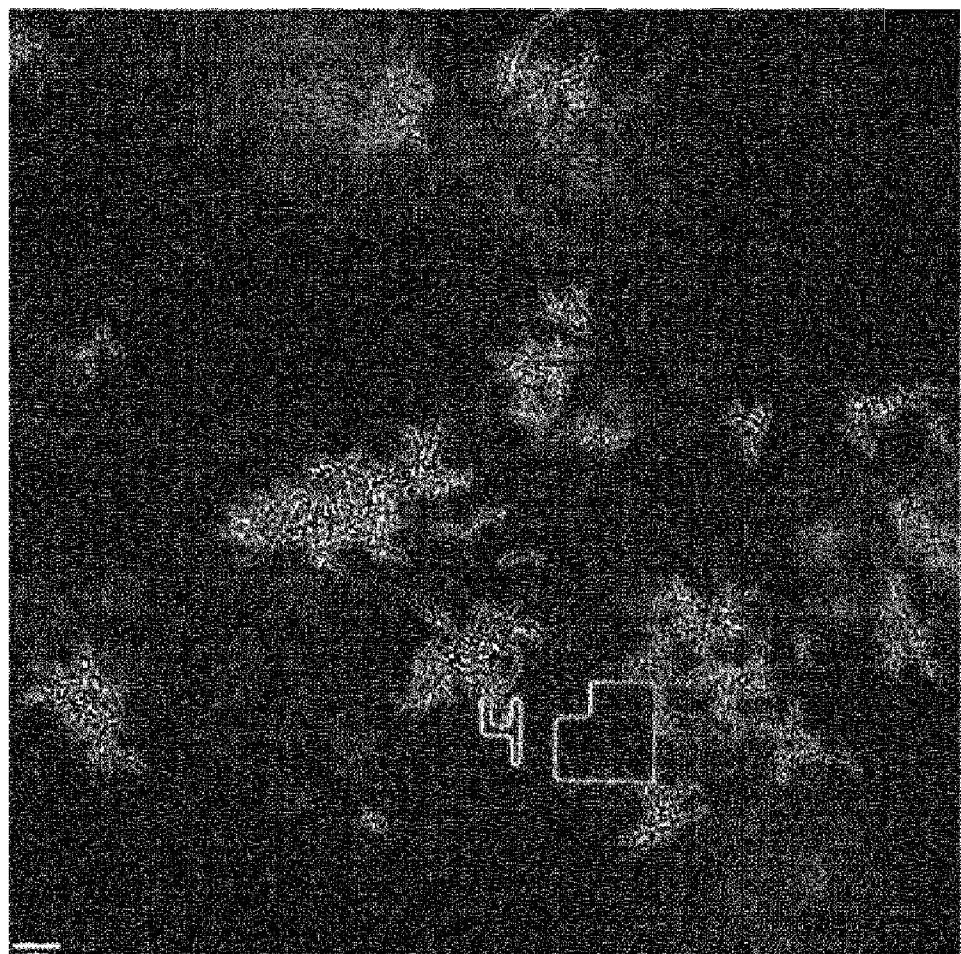


Figura 8 cont.

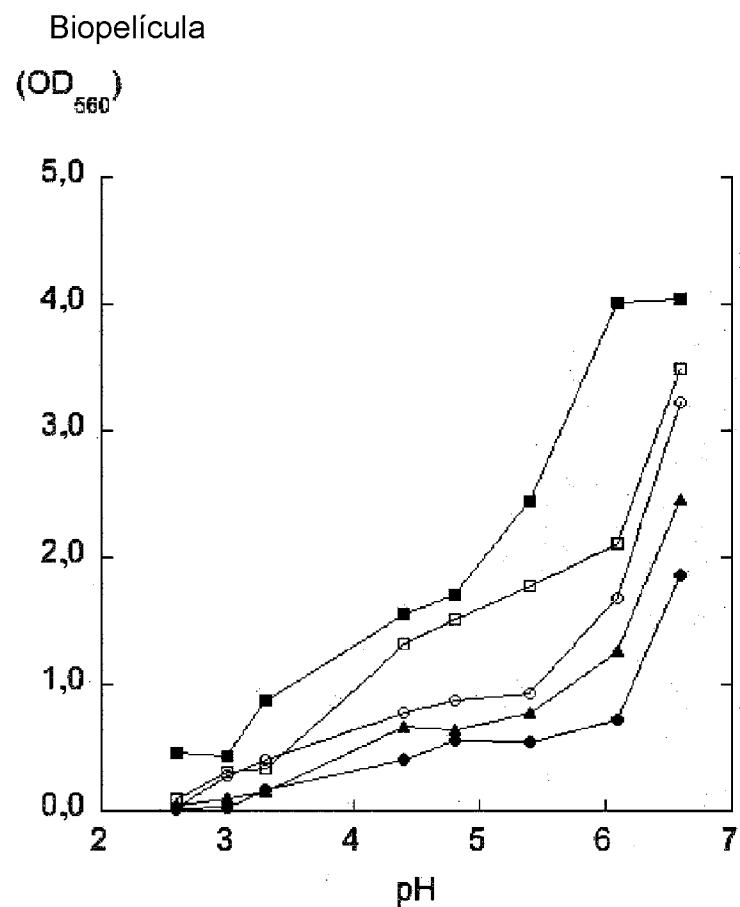


Figura 9