

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 003 133**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 15/02 (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: **17.11.2021** **PCT/GB2021/052973**
87 Fecha y número de publicación internacional: **27.05.2022** **WO22106819**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2021** **E 21815631 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2024** **EP 4247334**

54 Título: **Composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de una condición asociada a una reducción del número de lactobacilos en la vagina**

30 Prioridad:

17.11.2020 GB 202018068

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2025

73 Titular/es:

UCL BUSINESS LTD (100.00%)
University College London, Gower Street
London WC1E 6BT, GB

72 Inventor/es:

LONG, PAUL;
SUTCLIFFE, ALASTAIR y
TULEU, CATHERINE

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 3 003 133 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 farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de una condición asociada a una reducción del número de lactobacilos en la vagina

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende glucógeno para su uso en la prevención o el tratamiento de condiciones asociadas con una reducción del número de lactobacilos en la vagina de un sujeto en relación con un sujeto sano, por ejemplo, una infección vaginal o una inflamación vaginal, tales la vaginosis bacteriana, vaginitis, candidiasis vulvovaginal o infección por estreptococos del Grupo B, o un método para la prevención o el tratamiento de dicha condición o de las secuelas resultantes de la misma con la composición.

Antecedentes de la invención

La vaginosis bacteriana (VB) es la infección vaginal más común en las mujeres en edad reproductiva de todo el mundo y se asocia a importantes consecuencias adversas, tales como un mayor riesgo de aborto espontáneo tardío o parto prematuro (1, 2), endometritis posparto (3), y también una mayor probabilidad de contraer enfermedades de transmisión sexual, tal como el VIH (4). Las tasas de prevalencia comunicadas oscilan entre el 10 y el 40 % en un momento dado, dependiendo de la población estudiada. Sin embargo, los métodos subóptimos de diagnóstico y un alto porcentaje de pacientes asintomáticas sugieren que la prevalencia real de la VB puede ser muy superior (5). La VB se asocia a un mayor volumen de flujo vaginal con un olor fétido, a pescado.

La causa exacta de la VB sigue siendo desconocida en la gran mayoría de los casos, pero las alteraciones tanto de la inmunidad local del hospedero como de la microflora del tracto genital parecen contribuir a la patogénesis de la VB (6). En condiciones normales, las bacterias *Lactobacillus* predominan en la vagina y se cree que controlan el crecimiento de otros microorganismos produciendo peróxido de hidrógeno y ácido láctico a partir del glucógeno vaginal para mantener la acidez vaginal entre 4 y 5 de pH. *Lactobacillus* es un género de bacterias Gram-positivas, anaerobias facultativas o microaerófilas, en forma de bastoncillos, no formadoras de esporas.

Sin embargo, en las mujeres con VB los lactobacilos vaginales normales son sustituidos por un crecimiento excesivo de otros anaerobios con una disminución concomitante del número de lactobacilos. Datos recientes sugieren un papel primordial de la *Gardnerella vaginalis* como un agente etiológico específico y quizá de transmisión sexual en la VB (7-9), como postularon inicialmente Gardner y Dukes en 1955 (10). Por lo tanto, aunque en las mujeres con VB pueden encontrarse lactobacilos productores de ácido (11), su número puede no ser suficiente para superar a *Gardnerella vaginalis*, que a su vez sustituye a los lactobacilos como microflora dominante a medida que el pH vaginal aumenta hasta aproximadamente 7,8-8,2 (12). Por el contrario, numerosos estudios han demostrado que, incluso cuando no se produce una reducción significativa del número de lactobacilos, pequeñas disminuciones pueden ser suficientes para permitir el crecimiento excesivo de levaduras, tales como las especies de *Candida*, que provocan un descenso del pH por debajo de 4 consistente con el síntoma de candidiasis vulvovaginal ((27)-(32)).

A menudo, las mujeres que experimentan los síntomas de la VB se quejan de un olor fétido, a pescado, y de un flujo vaginal excesivo lo suficientemente desagradable como para que estas mujeres busquen tratamiento médico. Los tratamientos tradicionales se han centrado clásicamente en los antibióticos de prescripción metronidazol y clindamicina. El metronidazol como tratamiento oral de 7 días tiene una tasa de curación del 80-90 % al cabo de 1 mes. Los efectos secundarios incluyen náuseas, calambres abdominales y un sabor metálico. El paciente debe abstenerse de la ingesta de alcohol, ya que puede producir efectos antabus. No se recomienda en el primer trimestre de embarazo. El metronidazol también está disponible en geles vaginales, por ejemplo, METROGELVAGINAL®, pero a pesar de su uso común, los geles vaginales no son ideales. Para que sean eficaces, los geles deben aplicarse una o dos veces al día durante un periodo de cinco días, normalmente por la noche. La clindamicina como tratamiento oral de 7 días tiene los mismos efectos que el metronidazol y sus efectos secundarios son menores, aunque es posible que se produzca diarrea y la preocupación por la colitis por *Clostridium difficile* ha impedido su uso generalizado (13, 14). A pesar de la elevada tasa de curación, una proporción significativa de mujeres sufre recaídas y recurrencias de la VB, independientemente de que el tratamiento aplicado haya sido oral o intravaginal (15, 16). Por ejemplo, un ensayo doble ciego, cruzado y controlado con placebo ha demostrado que el tratamiento intravaginal con un gel de metronidazol al 0,75 % (p/v) dio lugar a una tasa de recurrencia de aproximadamente el 15 % un mes después del tratamiento (17).

Los antibióticos son un tratamiento temporal para la VB. Los antibióticos pueden eliminar las bacterias que causan la VB, pero al mismo tiempo también alteran el equilibrio natural de la flora bacteriana de la vagina, lo que puede ser perjudicial a largo plazo y provocar otras infecciones, incluyendo la candidiasis.

Canesbalance® y BalanceActiv® son productos comerciales que afirman reducir los síntomas de la VB. Estas fórmulas están compuestas de ácido láctico y glucógeno. Como estas fórmulas son ácidas, pueden causar irritación

e incluso hemorragias. La acidez de estas fórmulas tiene por objeto provocar un rápido descenso del pH vaginal, reducir el crecimiento excesivo de bacterias patógenas y favorecer el rebrote de lactobacilos tolerantes al ácido. Estas fórmulas, por lo tanto, no son una cura y sólo ofrecen, en el mejor de los casos, cierto alivio temporal en algunas mujeres. Este rebrote será sólo de los serotipos de lactobacilos más tolerantes al ácido y de crecimiento más rápido (quizá dominados por un único serotipo o sólo unos pocos), que pueden no persistir a lo largo del tiempo, lo que dará lugar a la sustitución por el sobrecrecimiento patógeno y a la reaparición de los síntomas.

Muchas mujeres sanas consideran que los síntomas de la VB indican una falta de higiene adecuada, más que un problema médico, y a menudo utilizan duchas vaginales compradas sin receta, en lugar de acudir al médico. La idea de lavar el flujo maloliente con una ducha ácida puede tener un atractivo simplista. Sin embargo, desde el punto de vista médico, se desaconsejan las duchas vaginales, ya que los estudios han demostrado una asociación entre éstas y la enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), el embarazo ectópico, la infertilidad tubárica y la reducción de la fertilidad (18-21). También se han aconsejado diferentes medidas alternativas, incluyendo el yogur vivo o los preparados de *Lactobacillus acidophilus*, aunque los estudios realizados hasta la fecha aún no han demostrado los beneficios del uso de probióticos (15). En la patente de EE. UU. No. 6,440,949 se sugiere el uso de uno o más sacáridos (pero no glucógeno) en formulaciones prebióticas ácidas como un método para disminuir el pH vaginal. En un ensayo clínico realizado en Dinamarca, la patente probó diferentes concentraciones de sacáridos, pero ninguna de las concentraciones mostró una disminución significativa del pH y, además, ninguna de las concentraciones eliminó las bacterias causantes del mal olor.

EP1072269B1 divulga el uso de glucógeno (solo a una concentración de entre 2,5 % y 17 % p/v y junto con otros polisacáridos) en un gel de ácido láctico como un tratamiento para la VB; aunque se informó de que los beneficios clínicos eran escasos.

Por lo tanto, en vista de que la VB es actualmente la forma más prevalente de infección vaginal en las mujeres en edad reproductiva, existe una necesidad real e inmediata de nuevas composiciones que aborden las deficiencias de los tratamientos de la VB actualmente disponibles. Por ejemplo, sería deseable disponer de un tratamiento intravaginal que redujera la tasa de recurrencia de la VB tras un tratamiento exitoso; con beneficios adicionales de reducción de complicaciones ginecológicas, tal como el parto prematuro. También es necesario proporcionar nuevos tratamientos para otras infecciones e inflamaciones vaginales.

Breve descripción de la invención

En un aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de una condición asociada a una reducción del número de lactobacilos en la vagina de un sujeto en relación con un sujeto sano, en donde la composición comprende de 1,3 a 1,7 % p/v de glucógeno y menos de 0,1 % p/v de ácido láctico.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que la composición de la invención provoca un aumento significativo del número de lactobacilos en la vagina de un sujeto tratado, lo que conduce al tratamiento eficaz de una serie de infecciones e inflamaciones vaginales, por ejemplo, la vaginosis bacteriana, la vaginitis, la candidiasis vulvovaginal o los estreptococos del Grupo B.

En una realización especialmente preferida, la composición no contiene ácido láctico, es decir, la composición contiene 0 % p/v de ácido láctico.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende además agua y un derivado de la celulosa, opcionalmente de 94 a 97 % p/v de agua y de 2 a 5 % p/v de un derivado de la celulosa. Típicamente, la composición farmacéutica comprende de 1,3 a 1,7 % p/v de glucógeno, opcionalmente de 1,4 a 1,6 % p/v de glucógeno, agua y un derivado de la celulosa. Típicamente, la composición farmacéutica comprende de 1,3 a 1,7 % p/v de glucógeno, opcionalmente de 1,4 a 1,6 % p/v de glucógeno, y un hidrogel acuoso que comprende un derivado de la celulosa.

En una realización particularmente preferida, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 1,5 % p/v de glucógeno.

Proporcionar la cantidad correcta de glucógeno en la composición farmacéutica es especialmente importante para conseguir el efecto terapéutico.

Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, se entiende que una composición farmacéutica que comprende de 1,3 a 1,7 % p/v, preferiblemente de 1,4 a 1,6 % p/v, más preferiblemente de aproximadamente 1,5 % p/v de glucógeno, proporciona una concentración óptima de glucógeno tal que actúa como una fuente de carbono para los lactobacilos, ayudando a su crecimiento. A concentraciones más bajas, por ejemplo, 1 % p/v de glucógeno, la concentración de carbono no es suficiente para favorecer un buen crecimiento del *Lactobacillus*. Concentraciones más altas, por ejemplo 2 % p/v de glucógeno, o 2,5 a 17 % p/v como se divulga en EP1072269B1 pueden inhibir realmente el crecimiento bacteriano. La inhibición del crecimiento bacteriano a altas concentraciones de sacáridos

es bien conocida, y los sacáridos pueden utilizarse como conservantes, por ejemplo, en mermeladas.

Típicamente, el glucógeno puede obtenerse a partir de una fuente animal, opcionalmente en donde el glucógeno es de ostra, mejillón o bovino.

5 Típicamente, el derivado de celulosa es un éter de celulosa. El éter de celulosa puede ser metilcelulosa (MC), hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), etilcelulosa (EC), hidroxietilcelulosa (HEC), carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC), o combinaciones de las mismas. Preferiblemente, el éter de celulosa es hidroxipropil metilcelulosa.

10 El pH de la composición farmacéutica puede ser de 5,7 a 6,7. Preferiblemente, el pH de la composición farmacéutica es de 6,0 a 6,2.

Normalmente, el producto farmacéutico se presenta en forma de hidrogel.

15 La composición farmacéutica puede ser un pesario vaginal.

La composición farmacéutica puede ser mucoadhesiva, por ejemplo, puede comprender una película o gel mucoadhesivo o un sistema precursor líquido cristalino gelificante mucoadhesivo *in situ*.

20 La composición farmacéutica puede comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

La composición farmacéutica puede comprender además uno o más agentes terapéuticos adicionales. El uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden seleccionarse entre un antibiótico, un agente antibacteriano, un agente antifúngico, un agente antiparasitario, un agente antivirico, un agente antiséptico y un agente antiinflamatorio.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la prevención o el tratamiento de una condición asociada a una reducción del número de lactobacilos en la vagina de un sujeto en relación con un sujeto sano, comprendiendo el método el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una composición farmacéutica como la definida anteriormente.

30 En una realización de la composición farmacéutica para uso o método de la invención el uso o método comprende proporcionar un aumento en el número de lactobacilos en la vagina del sujeto en relación con un sujeto no tratado con la condición. En una realización de la composición farmacéutica para uso o método de la invención, el uso o método comprende restaurar el número de lactobacilos en la vagina a un nivel normal, es decir, la naturaleza individualizada del microbioma vaginal hace que la respuesta a la composición farmacéutica sea específica para cada sujeto, proporcionando a cada paciente su propia "terapia personalizada del microbioma". Los lactobacilos pueden ser lactobacilos endógenos, es decir, normalmente presentes en la vagina de un sujeto sano. Los lactobacilos pueden comprender *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus johnsonii* o combinaciones de los mismos. La fermentación del glucógeno como única fuente de carbono por parte de los lactobacilos no sólo proporciona una nutrición que permite el restablecimiento de los lactobacilos a un nivel normal, sino que los productos extremos de la fermentación (ácido láctico, peróxido de hidrógeno) provocan un restablecimiento del pH. En el caso de la vaginosis bacteriana, el pH desciende de alcalino a ligeramente ácido. Se ha demostrado ampliamente que el ácido láctico inhibe el crecimiento de las especies de *Candida* causantes de la candidiasis vulvovaginal. Por lo tanto, un restablecimiento del número de lactobacilos aumenta la concentración de ácido láctico en la vagina, inhibiendo el crecimiento de las especies patógenas de *Candida* (33).

40 La condición que debe prevenirse o tratarse suele ser una infección vaginal, una inflamación vaginal o sus complicaciones, opcionalmente una infección vaginal o inflamación vaginal recurrente. La complicación puede ser un parto prematuro, el parto de un feto muerto, una infección vaginal posparto o una inflamación vaginal.

En realizaciones preferidas de la invención, la condición que debe prevenirse o tratarse es vaginosis bacteriana, vaginitis, candidiasis vulvovaginal o infección por estreptococos del Grupo B.

55 En una realización, el sujeto a tratar está embarazada.

En una realización preferida, la condición que debe prevenirse o tratarse es la infección por estreptococos del Grupo B y el sujeto está embarazada.

60 En realizaciones de la composición de uso o método de la invención la condición a prevenir o tratar está asociada con un aumento del número de bacterias patógenas o levaduras en la vagina de un sujeto en relación con un sujeto sano, opcionalmente bacterias *Gardnerella vaginalis* o *Streptococcus* del Grupo B o una especie de levadura *Candida*, opcionalmente *Candida albicans*.

65 Típicamente, la composición farmacéutica es adecuada para la administración intravaginal.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los recuentos promedio de colonias para un rango de concentraciones de glucógeno del Paciente 1. Ocho colonias del paciente se cultivaron cada una en un medio con un 0 % p/v de glucógeno durante 72 horas. A continuación, se incubaron 10 microlitros de esta dilución durante 96 horas en cada concentración de glucógeno y, posteriormente, se sembraron en agar selectivo de Lactobacillus por triplicado $n = 24$. Las barras de error muestran la desviación del valor real (media) con las muestras que muestran significación marcadas con un asterisco (*).

La Figura 2 muestra los recuentos promedio de colonias para un rango de concentraciones de glucógeno del Paciente 2. Se cultivaron tres colonias del paciente, cada una en un medio con un 0 % p/v de glucógeno durante 72 horas. A continuación, se incubaron 10 microlitros de esta dilución durante 72 horas en cada concentración de glucógeno y, posteriormente, se sembraron en agar selectivo de Lactobacillus por triplicado $n = 9$.

La Figura 3 muestra los recuentos promedio de colonias para un rango de concentraciones de glucógeno del Paciente 3. Se cultivaron tres colonias del paciente, cada una en un medio con un 0 % p/v de glucógeno durante 72 horas. A continuación, se incubaron 10 microlitros de esta dilución durante 72 horas en cada concentración de glucógeno y, posteriormente, se sembraron en agar selectivo de Lactobacillus por triplicado $n = 9$.

Las Figuras 4A y 4B muestran un gráfico circular de las proporciones relativas de las especies bacterianas en la vagina de una paciente (4A) antes del tratamiento con la composición de la invención y (4B) después del tratamiento con la composición de la invención según lo determinado por la secuenciación de amplicones de ARNr 16 S.

Descripción detallada

En un aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de una condición asociada a una reducción del número de lactobacilos en la vagina de un sujeto en relación con un sujeto sano, en donde la composición comprende de 1,3 a 1,7 % p/v de glucógeno y menos de 0,1 % p/v de ácido láctico.

Un experto en la técnica conocería una serie de condiciones asociadas a una reducción del número de lactobacilos en la vagina de un sujeto en relación con un sujeto sano, por ejemplo, la infección vaginal o la inflamación vaginal, en particular la vaginosis bacteriana, la vaginitis o la infección por estreptococos del Grupo B.

Un experto en la técnica también sabría cómo medir el número de lactobacilos en la vagina de un sujeto. Por ejemplo, se puede tomar una torunda de la vagina del sujeto y utilizarla para inocular un medio adecuado para el crecimiento de los lactobacilos. Tras la incubación, las bacterias crecidas se cultivan en placas de agar específicas para lactobacilos y se incuban anaeróbicamente a 37 °C durante un periodo de tiempo adecuado. A continuación, se cuenta el número de colonias bacterianas. El número de lactobacilos suele expresarse en unidades formadoras de colonias (UFC). Los lactobacilos son los microorganismos más prevalentes y a menudo numéricamente dominantes en la vagina, con $10^7 - 10^8$ UFC mL^{-1} de flujo vaginal en mujeres premenopáusicas sanas (véase, Farage MA, Miller KW, Sobel JD (2010), Dynamics of the vaginal ecosystem-hormonal influences. Infect Dis Res Treat 3:1-15, y Boris S, Barbés C (2000) Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. Microbes Infect 2:543-546). La UFC es una unidad utilizada para estimar el número de bacterias viables en una muestra. Viable se define como la capacidad de multiplicarse mediante fisión binaria en las condiciones controladas. El recuento con unidades formadoras de colonias requiere cultivar los microbios y cuenta sólo las células viables, en contraste con el examen microscópico que cuenta todas las células, vivas o muertas. La apariencia visual de una colonia en un cultivo celular requiere un crecimiento significativo, y al contar las colonias no se sabe con certeza si la colonia surgió de una célula o de un grupo de células. Expresar los resultados como unidades formadoras de colonias refleja esta incertidumbre. Típicamente, la composición farmacéutica de la invención trata condiciones vaginales en donde las UFC de lactobacilos vaginales se reducen significativamente en relación con sujetos sanos. La composición farmacéutica de la invención provoca un aumento significativo del número de lactobacilos vaginales, es decir, un aumento significativo de las UFC de lactobacilos en relación con los sujetos no tratados que padecen la condición vaginal.

Por lo tanto, en una realización preferida, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de la infección vaginal o la inflamación vaginal, opcionalmente vaginosis bacteriana, vaginitis o infección por estreptococos del Grupo B, en donde la composición comprende de 1,3 a 1,7 % p/v de glucógeno y menos de 0,1 % p/v de ácido láctico.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que la composición de la invención provoca un aumento significativo del número de lactobacilos en la vagina de un sujeto tratado, lo que conduce al tratamiento eficaz de una serie de infecciones e inflamaciones vaginales, por ejemplo, vaginosis bacteriana o vaginitis. Se entiende que los lactobacilos de la superficie epitelial vaginal utilizan el glucógeno como fuente de alimento, produciendo ácido láctico que mantiene el entorno a un pH más bajo y disuade a otros tipos de bacterias. El contenido en glucógeno del tejido vaginal humano se trata en Gregoire, A. T. et al, Fertility and Sterility, Vol. 22, No. 1, enero de 1971. Sin embargo, aunque en el estado de la técnica se han descrito composiciones que contienen glucógeno para el tratamiento de infecciones vaginales, tal como la VB, mediante la alteración de la microflora de la vagina, el

glucógeno se suele utilizar en combinación con otro principio activo, tal como el ácido láctico u otro sacárido, o bien se utiliza a una concentración significativamente mayor.

Proporcionar la cantidad correcta de glucógeno en la composición farmacéutica es especialmente importante para conseguir el efecto terapéutico.

Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, se entiende que una composición farmacéutica que comprende de 1,3 a 1,7 % p/v, preferiblemente de 1,4 a 1,6 % p/v, más preferiblemente de aproximadamente 1,5 % p/v de glucógeno, proporciona una concentración óptima de glucógeno tal que actúa como una fuente de carbono para los lactobacilos, ayudando a su crecimiento. A concentraciones más bajas, por ejemplo 1 % p/v de glucógeno, la concentración de carbono no es suficiente para favorecer un buen crecimiento del *Lactobacillus*. Concentraciones más altas, por ejemplo, 2 % p/v de glucógeno, o 2,5 a 17 p/v% como se divulga en EP1072269B1 pueden inhibir realmente el crecimiento bacteriano. La inhibición del crecimiento bacteriano a altas concentraciones de sacáridos es bien conocida, y los sacáridos pueden utilizarse como conservantes, por ejemplo, en mermeladas.

Típicamente, el glucógeno puede obtenerse a partir de una fuente animal, opcionalmente en donde el glucógeno es de ostra, mejillón o bovino.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende además agua y un derivado de la celulosa, opcionalmente de 94 a 97 % p/v de agua y de 2 a 5 % p/v de un derivado de la celulosa.

Típicamente, la composición farmacéutica comprende o consiste en 1,3 a 1,7 % p/v de glucógeno, opcionalmente 1,4 a 1,6 % p/v de glucógeno, agua y un derivado de la celulosa. Por ejemplo, preferiblemente la composición farmacéutica comprende o consiste en 1,3 a 1,7 % p/v de glucógeno, opcionalmente 1,4 a 1,6 % p/v de glucógeno, y un hidrogel acuoso que comprende un derivado de la celulosa.

En una realización particularmente preferida, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 1,5 % p/v de glucógeno.

Una ventaja clave de la presente invención es que la composición farmacéutica puede formarse y lograr un efecto terapéutico utilizando sólo tres componentes clave: glucógeno, un derivado de la celulosa y agua, aunque, por supuesto, pueden estar presentes otros componentes. Es probable que esta sencilla composición proporcione menos efectos secundarios, por ejemplo, irritación y hemorragias, que las composiciones del estado de la técnica.

La composición farmacéutica comprende menos de 0,1 % p/v de ácido láctico, opcionalmente menos de 0,05 % p/v de ácido láctico. La composición puede contener trazas de ácido láctico, pero en la realización más preferida la composición no contiene ácido láctico, es decir, contiene 0 % p/v de ácido láctico. Se conocen composiciones del estado de la técnica que comprenden ácido láctico para tratar la VB, por ejemplo, las composiciones descritas en EP1072269B1, y las formulaciones Canesbalance® y Balance Active® disponibles en el mercado. El ácido láctico se incluye en estas formulaciones para disminuir el pH de la composición. Cuando se administran a los pacientes, estas fórmulas provocan un rápido descenso del pH vaginal, reduciendo el crecimiento excesivo de bacterias patógenas y favoreciendo el rebrote de lactobacilos tolerantes al ácido. Sin embargo, estas composiciones altamente ácidas que contienen ácido láctico pueden causar irritación y hemorragias en los pacientes. Además, las composiciones que contienen ácido láctico normalmente sólo permiten el rebrote de los serotipos de lactobacilos más tolerantes al ácido y de crecimiento más rápido, que pueden no persistir en el tiempo, lo que da lugar a la sustitución por bacterias patógenas y a la reaparición de los síntomas.

La composición de la invención no es altamente ácida, y no comprende más que trazas de ácido láctico, y preferiblemente está libre de ácido láctico, evitando la irritación y el sangrado causados por las formulaciones ácidas de la técnica anterior.

Además, la composición farmacéutica de la invención tiene una estabilidad y una vida en mostrador superiores a los preparados de *Lactobacillus* de la técnica anterior.

El glucógeno puede obtenerse de un organismo marino, por ejemplo, una ostra. El glucógeno puede ser de tipo II. El glucógeno procedente de una fuente de organismo marino está disponible comercialmente; por ejemplo, el glucógeno de tipo II de la ostra está disponible en Sigma Aldrich, número de catálogo G8751. El glucógeno también puede proceder de otras fuentes animales marinas (tales como variedades de mejillones) o terrestres (incluyendo el músculo o el hígado de mamíferos), pero no de una fuente vegetal. El glucógeno es un polisacárido multiramificado de glucosa que actúa como una forma de almacenamiento de energía en bacterias (así como en humanos, animales y hongos). Por lo tanto, se entiende que el glucógeno aportado en las composiciones de la invención proporciona una fuente de energía o de carbono para los lactobacilos, lo que les permite prosperar. El glucógeno es un biopolímero ramificado formado por cadenas lineales de residuos de glucosa con una longitud de cadena promedio de aproximadamente 8-12 unidades de glucosa. Las unidades de glucosa están unidas linealmente por enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$ de una glucosa a la siguiente. Las ramificaciones están unidas a las cadenas de las que se desprenden por enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow6)$ entre la primera glucosa de la nueva

ramificación y una glucosa de la cadena madre.

El derivado de celulosa puede ser cualquier polímero que contenga celulosa. Típicamente, el derivado de celulosa es un éter de celulosa. El éter de celulosa puede ser metilcelulosa (MC), hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), etilcelulosa (EC), hidroxietilcelulosa (HEC), carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC) , o combinaciones de las mismas. Preferiblemente, el éter de celulosa es hidroxipropil metilcelulosa. También puede utilizarse una combinación de hidroxipropil metilcelulosa y metilcelulosa. Los éteres de celulosa están disponibles comercialmente, por ejemplo, Metalose[®] 90SH-400 de Shin Etsu. El derivado de celulosa también puede ser sulfato de celulosa (UsherCell).

El pH de la composición farmacéutica puede ser de 5,7 a 6,7. El pH de la composición puede ser de 6,0 a 6,5 o de 6,0 a 6,3. Preferiblemente, el pH de la composición farmacéutica es de 6,0 a 6,2.

Normalmente, el producto farmacéutico se presenta en forma de hidrogel. Los hidrogeles comprenden una red reticulada de polímeros hidrófilos, tales como los éteres de celulosa. Los hidrogeles poseen la capacidad de absorber una gran cantidad de agua e hincharse, manteniendo su estructura tridimensional.

La composición farmacéutica puede ser un pesario vaginal, típicamente un pesario vaginal de hidrogel. En realizaciones alternativas, la composición farmacéutica puede ser un comprimido, una suspensión o dispersión líquida, un polvo seco, una pomada tópica, una crema, una espuma, un gel, nanopartículas poliméricas, polímeros bioadhesivos, una película de disolución rápida, un supositorio o un aerosol. La composición farmacéutica puede aplicarse a un material base, por ejemplo, un material de algodón o gasa, tal como un tampón.

La composición farmacéutica puede administrarse directamente en la vagina o puede administrarse utilizando un dispositivo sólido, por ejemplo, un aplicador.

La composición farmacéutica puede ser mucoadhesiva. Se sabe que los preparados comerciales tradicionales para el tratamiento de las condiciones vaginales residen en la cavidad vaginal durante un periodo de tiempo relativamente corto debido a la acción de autolimpieza del tracto vaginal, y a menudo requieren múltiples dosis diarias para garantizar el efecto terapéutico deseado. La composición de la presente invención es preferiblemente mucoadhesiva, es decir, es capaz de adherirse a la mucosa vaginal. La naturaleza mucoadhesiva de la composición prolonga el tiempo de residencia de la composición farmacéutica en la cavidad vaginal. Los éteres de celulosa, tal como HPMC, son polímeros típicamente mucoadhesivos.

La composición farmacéutica para uso de la invención puede comprender o consistir en una película mucoadhesiva, un gel o un sistema precursor líquido cristalino gelificante mucoadhesivo *in situ*.

La composición farmacéutica para uso puede comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, por ejemplo, tensoactivos fisiológicamente tolerables, disolventes, emolientes, colorantes, fragancias, gelificantes, emulsionantes, agentes amortiguadores, aglutinantes, antioxidantes, desintegrantes, agentes suspensores, agentes quelantes y similares, que son bien conocidos en la técnica. Los posibles excipientes figuran en la Tabla II de "Compendium of Pharmaceutical Excipients for Vaginal Formulations", S. Garg et al, Pharmaceutical Technology Drug Delivery 2001.

La composición farmacéutica puede estar exenta de conservantes; por ejemplo, la composición puede contener menos de 0,1 % p/v de conservantes.

La composición farmacéutica puede comprender además uno o más agentes terapéuticos adicionales. El uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden seleccionarse entre un antibiótico, un agente antibacteriano, un agente antifúngico, un agente antiparasitario, un agente antivírico, un agente antiséptico y un agente antiinflamatorio.

El uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden seleccionarse entre:

agentes antibacterianos, tales como C31G, trimetoprima, sulfametoxazol y cloromicetina;
agentes antisépticos, tal como gluconato de clorhexidina;
agentes antibióticos, tales como eritromicina, penicilinas, cefalosporinas y sus derivados, ampicilina, meticilina y doxiciclina;
agentes antiinflamatorios, tales como naproxeno, indometacina e hidrocloridato de hidrocortisona;
agentes antiparasitarios, tal como tiabendazol;
agentes antiprotozoarios, tales como metronidazol y clorhidrato de cloroquina;
agentes antivirales, tales como sulfato de dextrano y otros polisacáridos sulfatados, escualamina y vidarabina;
y agentes antifúngicos, tales como ketoconazol, flucitosina, itraconazol, anfotericina B, nistatina, nitrato de butoconazol y clotrimazol.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la prevención o el tratamiento de una condición

asociada a una reducción del número de lactobacilos en la vagina de un sujeto en relación con un sujeto sano, comprendiendo el método el paso de administrar a un sujeto que lo necesite una composición farmacéutica como la definida anteriormente.

5 El sujeto puede ser un animal humano o no humano.

En una realización de la composición farmacéutica para uso o método de la invención el uso o método comprende proporcionar un aumento en el número de lactobacilos en la vagina del sujeto en relación con un sujeto no tratado con la condición. En una realización, el aumento del número de lactobacilos se consigue durante un periodo de al
10 menos 48 horas, opcionalmente 72 horas. En una realización de la composición farmacéutica para uso o método de la invención el uso o método comprende restaurar el número de lactobacilos en la vagina a un nivel normal, es decir, restaurar el número de lactobacilos en la vagina del sujeto a un número de lactobacilos encontrado en un sujeto sano. El número de lactobacilos en un sujeto sano depende del paciente, pero una mujer premenopáusica sana puede tener 10^7 - 10^8 UFC de lactobacilos mL⁻¹ de flujo vaginal.

Los métodos para medir el número de lactobacilos en la vagina se han discutido anteriormente y serían conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, se puede tomar una torunda de la vagina del sujeto y utilizarla para
15 inocular un medio adecuado para el crecimiento de los lactobacilos. Tras la incubación, las bacterias que crecieron se cultivan en placas específicas para lactobacilos y se incuban durante un periodo de tiempo adecuado. A continuación, se cuenta el número de colonias bacterianas. El número de lactobacilos se expresa típicamente en unidades formadoras de colonias (UFC). Los lactobacilos pueden ser lactobacilos endógenos, es decir, normalmente presentes en la vagina de un sujeto que esté sano. Se entenderá que la microflora vaginal puede
20 variar significativamente entre individuos, y puede haber una variación significativa en el número y tipo de lactobacilos y otros microorganismos presentes en la cavidad vaginal entre individuos. Sin embargo, los lactobacilos pueden comprender *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus johnsonii* o combinaciones de los mismos.

La condición que debe prevenirse o tratarse suele ser una infección vaginal, una inflamación vaginal o sus complicaciones. La condición puede ser una infección vaginal recurrente o una inflamación vaginal. Una infección
30 o inflamación vaginal recurrente es aquella en la que los síntomas reaparecen a pesar de la reducción o eliminación inicial de los síntomas, por ejemplo, los síntomas de infección o inflamación reaparecen al cabo de uno, dos o tres meses. Una infección puede reaparecer debido a que, aunque la población de bacterias patógenas se reduzca significativamente tras un tratamiento inicial, permitiendo el rebrote de las bacterias beneficiosas, tales como los lactobacilos, las bacterias patógenas no se eliminarán por completo y volverán a crecer con el tiempo, provocando
35 una reaparición de la infección.

La composición de la invención es especialmente adecuada para tratar infecciones recurrentes porque se entiende que favorece el rebrote de cualquier lactobacilo, no sólo los que son tolerantes al ácido, tales como los que se encuentran tras el tratamiento con las composiciones farmacéuticas que contienen ácido láctico de la técnica
40 anterior. Al favorecer el rebrote de un rango más amplio de lactobacilos, el rebrote de bacterias patógenas o levaduras es menos probable, lo que previene la reaparición de una infección, tal como VB o candidiasis vulvovaginal.

La composición farmacéutica puede utilizarse para prevenir o tratar las complicaciones de la infección vaginal o la inflamación vaginal, tal como el parto o nacimiento prematuro, el parto de un feto muerto, la infección vaginal o la inflamación vaginal posparto. Es bien sabido que las infecciones vaginales, tal como la VB, proporcionan un mayor riesgo de parto prematuro, nacimiento, muerte fetal, aborto espontáneo en el primer trimestre, opcionalmente en mujeres sometidas a FIV, infección del líquido amniótico, corioamnionitis, endometritis tras el parto o el aborto, infecciones tras la histerectomía, enfermedad inflamatoria pélvica e infección/inflamación posparto (véase, por
45 ejemplo, Romero, R. et al. (2001). "The role of infection in preterm labour and delivery," Journal of Pediatric and Perinatal Epidemiology, 15(2), pp.41-56., Warr AJ, et al, "Sexually transmitted infections during pregnancy and subsequent risk of stillbirth and infant mortality in Kenya: a prospective study", BMJ 2018;0:1-7. doi:10.1136/sextans-2018-053597, Baqui et al, "Prevalence of and risk factors for abnormal vaginal flora and its association with adverse pregnancy outcomes in a rural district in north-east Bangladesh", Acta Obstet Gynecol Scand. 2018;1-11, y Paavonen, J. et al, "Bacterial Vaginosis and Desquamative Inflammatory Vaginitis", N Engl J
50 Med 2018; 379:2246-2254).

En realizaciones preferidas de la invención, la condición que debe prevenirse o tratarse es vaginosis bacteriana, vaginitis, candidiasis vulvovaginal o infección por estreptococos del Grupo B.

En las realizaciones de la composición de uso o método de la invención la condición a prevenir o tratar está asociada con un aumento del número de bacterias patógenas, opcionalmente bacterias *Gardnella vaginalis* o levaduras en la vagina de un sujeto en relación con un sujeto sano. Las bacterias o levaduras patógenas son cualquier bacteria o levadura que pueda causar una enfermedad o condición médica.

Típicamente, la composición farmacéutica es adecuada para la administración intravaginal. La composición

farmacéutica puede administrarse mientras el paciente está en decúbito supino, normalmente por la noche.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para preparar una composición farmacéutica, en donde el método comprende:

- 5 (a) calentar el agua a aproximadamente 80 °C
- (b) añadir gradualmente un derivado de la celulosa al agua calentada bajo agitación en una cantidad que proporcione una disolución acuosa que contenga de 2 a 5 % p/v del derivado de la celulosa
- (c) enfriar la disolución acuosa para formar un gel
- 10 (d) proporcionar por separado una disolución acuosa de glucógeno entre 1 y 5 °C;
- (e) mezclar el gel con la disolución acuosa de glucógeno para obtener la composición farmacéutica, en donde la composición farmacéutica comprende de 1,3 a 1,7 % p/v de glucógeno, opcionalmente de 1,4 a 1,6 % p/v, opcionalmente aproximadamente 1,5 % p/v.

15 El derivado de celulosa puede ser cualquier derivado de celulosa descrito anteriormente, por ejemplo, HPMC. La agitación se consigue normalmente agitando la disolución, por ejemplo, con un agitador magnético. En el paso (e), el mezcla es muy lento, o es un mezclado gradual del gel con la disolución acuosa de glucógeno. El producto directo del método es una realización preferida de la composición utilizada en la composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento de la invención. La invención se describirá a continuación mediante ejemplos, que tienen por objeto ayudar a un experto en la técnica a llevar a cabo la invención y no pretenden en modo alguno
20 limitar el alcance de la misma.

Ejemplo 1

25 Este estudio se basó en una variación dentro del sujeto, por lo que sólo se inscribió a un paciente en el estudio tras completar los cuestionarios de cribado y dar su consentimiento. La paciente fue diagnosticada con VB utilizando tres de los criterios de Amsel (prueba de Whiff positiva, secreción homogénea de color blanco grisáceo y presencia de células clave). Este método es bien conocido por un experto en la técnica. Se tomó un hisopo del paciente y se inoculó en flujo vaginal artificial (AVF) en donde la fuente de carbono se sustituyó por glucógeno.

30 Formulación en gel

El gel se preparó con las siguientes concentraciones de glucógeno, 0, 0,5, 1,0, 1,5 y 5 % p/v en frascos de vidrio de 100 ml para medios. En este método se utilizaron tanto procesos fríos como calientes de fabricación de gel, en los que se calentaron 60 mL de agua a 80 °C a los que se añadieron gradualmente 2,5 g del polímero semisintético, hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) (Metolose® 90SH-400) mientras se agitaba continuamente la disolución en un
35 agitador magnético de placa caliente. Se añadió glucógeno a un matraz aforado de 20 mL en las cantidades relativas y se enrasó con agua fría, colocándose también en un agitador magnético. A continuación, se mezcló el gel formulado y se dejó enfriar a temperatura ambiente. A continuación, se añadió el glucógeno disuelto a la muestra de gel y los 20 mL restantes de agua fría también se añadieron gradualmente. A continuación, se etiquetaron todas las muestras, se esterilizaron en autoclave y se introdujeron en el refrigerador.

Preparación del medio de crecimiento bacteriano

45 Se prepararon 3 L (144 agares) de Agar Rogosa añadiendo 20,5 g del medio de cultivo en 6 frascos de vidrio de 500 mL a los que se añadió 1,3 mL de ácido acético glacial, antes de enrasar hasta 250 mL con agua destilada. A continuación, las muestras se introdujeron en el autoclave antes de verterlas en las placas en condiciones estériles.

Preparación del flujo vaginal artificial

50 Se prepararon dos flujos vaginales artificiales (AVF), uno que contenía carbono (control) y otro que no. Se prepararon 300 mL del AVF que no contenía carbono añadiendo las cantidades relativas de ingredientes indicadas en la tabla 1 y enrasando hasta 300 mL con agua destilada. El mismo procedimiento se llevó a cabo para el segundo AVF, pero en 100 mL con la adición de la cantidad de carbono indicada en la Tabla 1, antes de introducir ambos flujos en el autoclave. Dentro de una campana de humos estéril, se añadieron 10 mL del AVF de control a
55 ocho tubos de muestras Sterilin, se etiquetaron y se colocaron en el refrigerador. A continuación, se añadieron también 5 mL del segundo AVF a ocho tubos diferentes para cada concentración de glucógeno, incluyendo el blanco, antes de añadir 5 mL de la concentración correspondiente de los geles preparados, etiquetarlos y colocarlos en el refrigerador.

Tabla 1. Cantidades relativas de los ingredientes utilizados para preparar ambos AVF		
Ingrediente	Cantidad (g) por 300mL	Cantidad (g) por 100mL
Peptona	1,5	0,5
Extracto de levadura	0,75	0,25

Tabla 1. Cantidades relativas de los ingredientes utilizados para preparar ambos AVF		
Ingrediente	Cantidad (g) por 300mL	Cantidad (g) por 100mL
Acetato de sodio	0,75	0,25
Fosfato dipotásico	0,3	0,1
Sulfato de amonio	0,3	0,1
Sulfato de magnesio	0,03	0,01
Fuente de carbono	-	1,5

Subcultivo de muestras bacterianas

Los hisopos extraídos de pacientes diagnosticados positivamente con VB mediante tres de los criterios de Amsel (prueba de Whiff positiva, secreción homogénea de color blanco grisáceo y presencia de células clave) se incubaron en un caldo que contenía un 1,5 % p/v de glucógeno y glucosa durante 3-4 días anaeróbicamente a 37 °C para favorecer el crecimiento de las cepas bacterianas de *Lactobacilli*. A continuación, se inoculó una muestra de 10 µL en tres placas específicas para lactobacilos y se incubó anaeróbicamente durante 3-4 días adicionales.

Subcultivo en muestras de gel, colocación en placas y recuento de colonias

Se inocularon diferentes colonias de las colonias bacterianas cultivadas en cada uno de los caldos de control que contenían carbono utilizando un bucle de inoculación de 10 µL y se incubaron durante 3 días anaeróbicamente. A continuación, se inocularon 10 µL de las bacterias cultivadas en los 5 caldos de muestras de gel, incluyendo el blanco, y se incubaron durante 4 días. A continuación, las bacterias crecidas se cultivaron en placas específicas para lactobacilos colocadas por triplicado para cada concentración de gel y se incubaron durante 3 días en anaerobiosis antes de ser contadas.

Recuentos de colonias bacterianas

Todas las colonias bacterianas cultivadas se contaron en un contador de colonias Stuart SC6. La Figura 1 muestra el promedio de los recuentos bacterianos para cada concentración de glucógeno en gel, obtenidos a partir de las ocho colonias inoculadas a partir de los hisopos de los pacientes. Es evidente que la concentración de glucógeno con el recuento bacteriano más elevado es del 1,5 % p/v; este resultado es consistente con las ocho colonias. Las barras de error de desviación estándar muestran también la desviación de cada recuento bacteriano respecto al valor medio (valor verdadero).

Se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) para determinar la desviación entre los recuentos y si la variable (concentración de gel) tiene o no un efecto sobre los recuentos bacterianos. Cuando el valor *f* es mayor que el valor crítico *f*, se rechaza la hipótesis nula. La hipótesis nula es que la variable tiene un efecto sobre el recuento de colonias bacterianas. Cuando se rechaza la hipótesis nula, debe aceptarse la hipótesis alternativa, que es que la variable no tiene efecto sobre el recuento de colonias. Se comprobó que para las colonias uno, dos, tres y seis, el valor crítico *f* era inferior al valor *f*, rechazando la hipótesis nula y aceptando la alternativa de que la concentración de gel no tiene efecto sobre el recuento de colonias. Por otra parte, las colonias cuatro, cinco, siete y ocho, aceptaron todas la hipótesis nula debido a que el valor crítico *f* fue superior al valor *f*, lo que sugiere que existe una correlación evidente entre la variable y el recuento de colonias.

Ejemplo 2

El estudio se repitió con 2 pacientes más, cuyos resultados se muestran en las Figuras 2 y 3. Para los pacientes 2 y 3 se utilizó el mismo protocolo que para el paciente 1, con la excepción de que se cultivaron tres colonias en lugar de ocho colonias de cada paciente, y el caldo de control inoculado se incubó durante un periodo de tiempo más corto (2 días en lugar de 3 días). Además, las formulaciones probadas contenían 0, 0,5, 1, 1,5, 2 y 2,5 % p/v de glucógeno. En resumen, se inocularon diferentes colonias de las colonias bacterianas cultivadas en cada uno de los caldos de control que contenían carbono utilizando un bucle de inoculación de 10 µL y se incubaron anaeróbicamente durante 2 días (no 3 días como en el ejemplo 1). A continuación, se inocularon 10 µL de las bacterias cultivadas en los 5 caldos de muestras de gel, incluyendo el blanco, y se incubaron durante 4 días. A continuación, las bacterias crecidas se cultivaron en placas específicas para lactobacilos colocadas por triplicado para cada concentración de gel y se incubaron durante 3 días en anaerobiosis antes de ser contadas.

Los ejemplos 1 y 2 demuestran que la composición de la invención que comprende glucógeno tiene la capacidad de restaurar la flora vaginal, en donde la composición que comprende 1,5 % p/v de glucógeno logra los recuentos más altos de la especie bacteriana que típicamente domina el entorno vaginal en mujeres sanas, *Lactobacillus*. El restablecimiento de esta especie bacteriana está asociado al tratamiento de la VB y, por lo tanto, las composiciones de la invención que comprenden de 1,3 a 1,7 % p/v de glucógeno, óptimamente 1,5 % p/v de glucógeno, pueden

proporcionar un tratamiento no antibiótico eficaz de la VB y otras infecciones e inflamaciones vaginales. Puede observarse en las Figuras 1 a 3 que las composiciones de la invención que comprenden 1,5 % p/v de glucógeno proporcionan un recuento de lactobacilos mucho mayor que las composiciones fuera del alcance de la reivindicación que comprenden 0,5, 1,0, 2,0, 2,5 o 5,0 % p/v de glucógeno. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, se entiende que un 1,5 % p/v de glucógeno proporciona una concentración óptima de glucógeno tal que actúa como fuente de carbono para los lactobacilos, favoreciendo su crecimiento. A concentraciones más bajas, por ejemplo, 1 % p/v de glucógeno, la concentración de carbono no es suficiente para favorecer un buen crecimiento del *Lactobacillus*. Concentraciones más altas, por ejemplo, 2 % p/v de glucógeno, o 2,5 a 17 p/v% como se divulga en EP1072269 pueden inhibir realmente el crecimiento bacteriano.

Ejemplo 3 - Comparación con la composición disponible en el mercado (gel para VB Canesbalance®)

Materiales y métodos

Valoración microbiológica del rendimiento de los pesarios *in vitro*: Se tomaron dos hisopos vaginales de lados opuestos de la vagina de cada paciente. A continuación, se inocularon los dos hisopos vaginales en 10 mL de líquido de simulación vaginal o, 5 mL de líquido de simulación vaginal en donde la fuente de carbono se había sustituido por 5 mL de la composición pesaria de la invención (formulación en gel del Ejemplo 1 que comprende 1,5 % p/v de glucógeno). El líquido de simulación vaginal o flujo vaginal artificial se ha descrito previamente en D.H. Owen y D.F. Katz, "A Vaginal Fluid Simulant", Contraception, 1999; 59; 91-95, y M. S. J. Tomas y M. E. Nader-Macias, "Effect of a medium simulating vaginal fluid on the growth and expression of beneficial characteristics of potentially probiotic lactobacilli", Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, 2007.

El líquido de simulación vaginal (o flujo vaginal artificial) contenía glucosa (ajustada a una concentración final del 1,5 %), peptona (10,0), extracto de levadura (5,0), acetato de sodio (5,0), fosfato dipotásico (2,0), sulfato de amonio (2,0), sulfato de magnesio (0,2), sulfato de manganeso (0,1), Tween 80 (1 ml), pH 4,5. Ambos caldos se incubaron anaeróticamente y sin agitación a 37 °C durante 72 horas. A continuación, los caldos se subcultivaron en agar de selección de lactobacilos (agar Rogosa). Tras 96 horas de incubación anaeróbica a 37 °C, se comparó el número de colonias visibles en las placas de agar. Sólo los lactobacilos pueden crecer en el agar Rogosa y esto se confirmó mediante microscopía óptica de las colonias teñidas con Gram, que dieron una morfología consistente con los lactobacilos. El número de bacterias recuperadas tras la incubación inicial en el líquido de simulación vaginal dará una indicación del número de lactobacilos residuales presentes durante la enfermedad activa de la VB. Esperábamos que el número de bacterias recuperadas tras la incubación inicial en el líquido de simulación vaginal, en donde la fuente de carbono fue sustituida por el pesario, mostraría un desplazamiento hacia un mayor número de *Lactobacillus* spp. si el glucógeno actuaba como prebiótico en la formulación del pesario.

Resultados

La tabla 2 que figura a continuación muestra el número de bacterias recuperadas tras 96 horas de incubación en medios específicos para lactobacilos tras el pretratamiento de los hisopos durante 72 horas en flujo vaginal artificial, nuestra formulación o la marca líder del mercado Canesbalance®.

El flujo vaginal artificial contiene glucosa como la única fuente de carbono, por lo que debería permitir el crecimiento de todos los tipos de bacterias muestreadas de la paciente, incluyendo los lactobacilos. Nuestra formulación contiene glucógeno como única fuente de carbono y sólo debería fomentar el rebrote de la población residual de lactobacilos, si esta población aún existe en la flora vaginal enferma. Canesbalance® contiene glucógeno (y ácido láctico) y debería, al igual que nuestra formulación; actuar como prebiótico para favorecer el rebrote de los lactobacilos residuales.

Los resultados muestran que se recuperaron significativamente ($p < 0,05$) más lactobacilos tras la preincubación de los bastoncillos en la formulación de sólo glucógeno de la invención en comparación con el flujo vaginal artificial y, sorprendentemente, Canesbalance®. Esto sugiere que la formulación de la invención puede fomentar un rebrote significativo de los lactobacilos que permanecen durante un episodio de enfermedad. La escasa variación de los resultados entre pacientes era la esperada de una población de pacientes seleccionada aleatoriamente, lo que sugiere que la mayoría de los pacientes responderían de la misma manera si se utilizara nuestra formulación como un tratamiento.

Tabla 2

Número de paciente	Número medio de lactobacilos n=3 ($10^4 \times \text{UFC mL}^{-1}$)	
	Flujo vaginal artificial	Formulación de sólo glucógeno
1	0,2	3,6
2	0,6	3,7

Número de paciente	Número medio de lactobacilos n=3 ($10^4 \times \text{UFC mL}^{-1}$)	
	Flujo vaginal artificial	Formulación de sólo glucógeno
3	0	1,1
4	0	1,1
Promedio	0,2	2,4
	Canesbalance®	
		Formulación de sólo glucógeno
5	0	3,3
6	0	1,2
7	0	3,2
8	0	0
9	0	0,05
10	0	0
11	0	0
12	0	3,8
13	0	1,2
14	0	0
15	0	1,4
16	0	4,2
17	0	10,4
18	0	9
Promedio	0	2,7

Ejemplo 4 - La adición de ácido láctico inhibe el crecimiento de lactobacilos

Se preparó una formulación de gel de acuerdo con el Ejemplo 1 que comprendía 1,5 % p/v de glucógeno. Se preparó una formulación de gel comparativa de acuerdo con el Ejemplo 1 que contenía 1,5 % p/v de glucógeno, pero con la adición de ácido láctico a una concentración de 225 mg por 5 mL. La formulación comparativa tenía un pH de 3,5. La formulación comparativa tenía la misma concentración de ácido láctico y el mismo pH que el producto comercial Canesbalance®. La tabla 3 demuestra que la adición de ácido láctico a la formulación de la invención inhibe el crecimiento de lactobacilos.

Tabla 3		Número medio de lactobacilos n=3 ($10^4 \times \text{UFC mL}^{-1}$)	
Número de paciente	Formulación de sólo glucógeno (invención)	Formulación de sólo glucógeno + ácido láctico	
21	2,9	0,3	
22	2,3	0	
23	3,9	0	

Ejemplo 5 - Fuente de carbono bacteriana

Los hisopos se incubaron en líquido de simulación vaginal o en líquido de simulación vaginal en combinación con la formulación en gel de la invención (1,5 % p/v de glucógeno), y los caldos se depositaron en agar sangre y se incubaron aeróbicamente durante 72 horas a 37 °C (el agar sangre favorece la proliferación de la mayoría de las bacterias, incluyendo las bacterias asociadas a la VB; se utilizaron condiciones aeróbicas porque es poco probable que crezcan lactobacilos, pero cualquier colonia que mostrara signos de hemólisis alfa de se excluyó de los recuentos como posible lactobacilo). Si los recuentos bacterianos fueran más altos para la formulación de la invención que para el control, esto sugeriría que otras bacterias estaban utilizando la formulación de la invención como una fuente de carbono y compitiendo con los lactobacilos (es decir, no siendo inhibidas por los lactobacilos). No fue así, y la tabla 4 muestra que el número medio de bacterias fue inferior en presencia de la formulación de

gel de la invención que en el control, lo que significa que las bacterias distintas de los lactobacilos no estaban utilizando la formulación de la invención como una fuente de carbono.

Tabla 4

Agar de sangre	Media n=3 (10 ⁴ x UFC mL ⁻¹)	
Número de paciente	Control	Formulación de sólo glucógeno (invención)
24	2,7	0,7
25	4,1	3,7

Ejemplo 6 - Parámetros fisicoquímicos indicativos de que la formulación de la invención favorece el recrecimiento de lactobacilos

La Tabla 5 indica que la administración de la formulación en gel de la invención que contiene 1,5 % p/v de glucógeno produce mejoras en el pH vaginal, la concentración de ácido láctico y la concentración de peróxido de hidrógeno en relación con la administración de una formulación de control.

Tabla 5

Número de paciente	pH (> 4,5 indica VB)		Concentración de ácido D-láctico mM (saludable ~ 100 mM)		Concentración de peróxido de hidrógeno µM (saludable ~ 100 µM)	
	Control	Formulación de sólo glucógeno (invención)	Control	Formulación de sólo glucógeno (invención)	Control	Formulación de sólo glucógeno (invención)
24	5,5	4,2	0	45	0	0
25	5,2	3,8	22,5	90	0	88

Ejemplo 7 - Alteración de la población bacteriana vaginal

Las Figuras 4A y 4B muestran un gráfico circular de las proporciones relativas de las especies bacterianas en la vagina de una paciente (4A) antes del tratamiento con la composición de la invención y (4B) después del tratamiento con la composición de la invención según lo determinado por la secuenciación de amplicones de la región hipervariable V1/V2 del gen ARNr 16 S bacteriano (Ravel J, et al. Microbioma vaginal de mujeres en edad reproductiva (Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108:4680-4687. doi: 10.1073/pnas.1002611107). Puede observarse que la proporción de lactobacilos aumenta de 71,4 % (pretratamiento) a 85,4 % (postratamiento). La proporción de enterococos disminuye de 24,7 % (pretratamiento) a 12,9 % (postratamiento).

Ejemplo 8 - Tratamiento de la infección por estreptococos del Grupo B en pacientes embarazadas

Se reclutó a pacientes embarazadas de las que se sabía que estaban colonizadas por estreptococos del Grupo B. El método de detección del transporte de estreptococos del Grupo B siguió las normas del Reino Unido para las investigaciones microbiológicas, Public Health England: Bacteriology B 58 Issue no: 3,1 Fecha de emisión: 26,06,18 - como se muestra en la Tabla 6 a continuación.

Los resultados de los recuentos de colonias dependientes del cultivo de estreptococos del Grupo B (GBS) procedentes de hisopos incubados en el caldo LIM de control frente al caldo LIM más 1,5 % p/v de glucógeno figuran en la Tabla 7. Se contaron las colonias después de la incubación en agar cromogénico y los resultados de 10 de las 12 pacientes muestran una reducción significativa ($p \leq 0,05$) en el número de hisopos incubados en la formulación de la invención que contiene 1,5 % p/v de glucógeno, lo que proporciona pruebas de que habría una reducción en el transporte de GBS en mujeres embarazadas si la formulación de la invención se utiliza como tratamiento.

Tabla 6

Detalles clínicos / Condiciones	Muestra	Medios estándar	Incubación			Cultivos leídos	Organismo(s) objetivo
			Temp °C	Atmos	Tiempo		
Transporte de estreptococos del Grupo B	Hisopos vaginales y anorrectales	Caldo LIM (5mL) [†] : Caldo Todd-Hewitt suplementado con 10 µg/mL de colistina -	35-37	5 % CO ₂	18-24 h	N/A	

Detalles clínicos / Condiciones	Muestra	Medios estándar	Incubación			Cultivos leídos	Organismo(s) objetivo
			Temp °C	Atmos	Tiempo		
	bajos maternos	o 8 µg/mL de gentamicina y 15 µg/mL de ácido nalidixico					
		Posteriormente, subcultivo a:				18-24 h	Estreptococos del Grupo B
		Agar de sangre	35-37	5 % CO ₂	24-48 h	y	
		o				48hr	
		Agar selectivo	35-37	Ambiente	24-48 h	18-24 h	
		o					
		Agar cromogénico	35-37	Ambiente	24-48 h	18-24 h	
†El frasco debe contener un volumen de caldo suficiente para cubrir los hisopos							

Tabla 7		Número medio de colonias de GBS n=9 (10 ⁴ x UFC mL ⁻¹)	
No. de paciente	Control	Formulación de la invención	
1	4,7	0,29	
2	2,7	0,6	
3	4,9	2,2	
4	0,85	0,4	
5	0,46	0,11	
6	5,22	2,35	
7	4,39	1,83	
8	2,8	1,74	
9	4,5	1,99	
10	4,78	1,25	
11	0,66	0,41	
12	2,23	2,14	

Para cada uno de los pacientes del 1 al 10, P <0,05.

5 Referencias

- (1) Eschenbach D A, Gravett M G, Chen K C, Hoyme U B, Holmes K K. Bacterial vaginosis during pregnancy. An association with prematurity and postpartum complications. Scand J Urol Nephrol Suppl. 1984; 86:213-222.
- (2) Hillier S L, Nugent R P, Eschenbach D A, et al. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. N Engl J Med. 1995; 333(26):1737-1742.
- (3) Watts D H, Eschenbach D A, Kenny G E. Early postpartum endometritis: the role of bacteria, genital mycoplasmas, and Chlamydia trachomatis. Obstet Gynecol. Enero 1989; 73(1):52-60.
- (4) Martin H L, Richardson B A, Nyange P M, et al. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. J Infect Dis. Diciembre 1999; 180(6):1863-1868.
- (5) Koumans E H, Kendrick J S. Preventing adverse sequelae of bacterial vaginosis: a public health program and research agenda. Sex Transm Dis. Mayo 2001; 28(5):292-297.
- (6) Witkin, S. S., I. M. Linhares, P. Giraldo, y W. J. Ledger. 2007. An altered immunity hypothesis for the development of symptomatic bacterial vaginosis. Clin Infect Dis 44:554-7.
- (7) Fredricks D N, Fiedler T L, Thomas K K, Mitchell C M, Marrazzo J M. Changes in Vaginal Bacterial

Concentrations with Intravaginal Metronidazole Therapy for Bacterial Vaginosis as Assessed by Quantitative PCR. *J Clin Microbiol. Ene.* 14, 2009.

(8) Josey W E, Schwebke J R. The polymicrobial hypothesis of bacterial vaginosis causation: a reassessment. *Int J STD AIDS.* Marzo 2008; 19(3):152-154.

(9) Schwebke J R, Rivers C, Lee J. Prevalence of *Gardnerella vaginalis* in Male Sexual Partners of Women With and Without Bacterial Vaginosis. *Sex Transm Dis.* Sep. 10, 2008.

(10) Gardner H L, Dukes C D. *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. *Am J Obstet Gynecol.* Mayo 1955; 69(5):962-976.

(11) Aroutcheva, A. A., J. A. Simoes, K. Behbakht, y S. Faro. 2001. *Gardnerella vaginalis* isolated from patients with bacterial vaginosis and from patients with healthy vaginal ecosystems. *Clin Infect Dis* 33:1022-7.

(12) Rosenstein, I. J., et al, Relationship between hydrogen peroxide producing strains of lactobacilli and vaginosis associated with bacterial species in pregnant women, *Eur. J. Clin. Microbial. Infect. Dis.* 1997, 6:517-22.

(13) Amsel, R., et al., Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations, *Am. J. Med* 1983, 74:14-22;

(14) Larsson, P. G., Treatment for bacterial vaginosis: an update on the expected cure rate, *Int'l J. of STD & AIDS* 1997, 8:35-6.

(15) Larsson, P. G. Treatment of bacterial vaginosis. *Int. J. STD AIDS* 1992; 3: 239-247.

(16) Wilson, 2004, *Sex Transm Infect* 80:8-11.

(17) Véase, Hillier et al., Junio 1993, "Efficacy of Intravaginal 0,75% Metronidazole Gel for the Treatment of Bacterial Vaginosis," *Obstet Gynecol* 81(6):963-967

(18) Scholes, D., et al., Vaginal douching as a risk factor for acute pelvic inflammatory disease, *Obstet. Gynecol.* 1993, 81:601-6;

(19) Darling J. R., et al., Vaginal douching and the risk of tubal pregnancy, *Epidemiology* 1991, 2:40-8;

(20) Kendrick, J. S., et al., Vaginal douching and the risk of ectopic pregnancy among black women, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1997, 176:991-7;

(21) Baird, D. D., et al., Vaginal Douching and reduced fertility, *Am. J Public Health* 1996, 86:844-50.

(22) Warr AJ, et al. Sexually transmitted infections during pregnancy and subsequent risk of stillbirth and infant mortality in Kenya: a prospective study. *BMJ* 2018;0:1-7. doi:10.1136/sextrans-2018-053597

(23) Baqui et al. Prevalence of and risk factors for abnormal vaginal flora and its association with adverse pregnancy outcomes in a rural district in north-east Bangladesh *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2018;1-11.

(24) Bianchi-Jassir et al Preterm Birth Associated With GBS Maternal Colonization worldwide: Systematic review and meta -analyses. *CID* 2017;65 (Suppl 2)

(25) Lin FY, Weisman LE, Troendle J, Adams K. Prematurity is the major risk factor for late-onset group B *Streptococcus* disease. *J Infect Dis* 2003; 188:267-71.

(26) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2011;108:4680-4687

(27) B. Vitali, C. Pugliese, E. Biagi, M. Candela, S. Turroni, G. Bellen, G. G. G. Donders, P. Brigidi, Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. *Appl. Environ. Microb.* 2020, 73(18), 5731-5741.

(28) V. D. Mijac, S. V. Dukic, N. Z. Opavski, M. K. Dukic, L. T. Ranin, Hydrogen peroxide producing lactobacilli in women with vaginal infections. *Eur. J. Obstet. Gyn. R. B* 2006, 129(1), 69-76.

(29) E. Biagi, B. Vitali, C. Pugliese, M. Candela, G.G.G. Donders, P. Brigidi, Quantitative variations in the vaginal bacterial population associated with asymptomatic infections: a real-time polymerase chain reaction study. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 2009, 28, 281-285.

(30) L. Akimoto-Gunther, P. de Souza Bonfim-Mendonca, G. Takahachi, M. M. T. Irie, S. Miyamoto, M. E. Lopes Consolaro, T. I. E. Svidzinsk, Highlights regarding host predisposing factors to recurrent vulvovaginal candidiasis: chronic stress and reduced antioxidant capacity. *PLoS One* 2016, 11(7), e0158870. DOI:10.1371/journal.pone.0158870.

(31) C. Ceccarani, C. Foschi, C. Parolin, A. D'Antuono, V. Gaspari, C. Consolandi, L. Laghi, T. Camboni, B. Vitali, M. Severgnini, A. Marangoni, Diversity of vaginal microbiome and metabolome during genital infections. *Sci. Rep.* 2019, 9, 14095. DOI:10.1038/s41598-019-50410-x.

(32) X. Zhou, R. Westman, R. Hickey, M. A. Hansmann, C. Kennedy, T. W. Osborn, L. J. Forney, Vaginal microbiota of women with frequent vulvovaginal candidiasis. *Infect. Immun* 2009, 77(9), 4130-4135. DOI:10.1128/IAI.00436-09.

(33) Allonsius, C.N., Vandenheuvel, D., Oerlemans, E.F.M. et al. Inhibition of *Candida albicans* morphogenesis by chitinase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Sci Rep* 9, 2900 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39625-0>.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de una condición asociada a una reducción del número de lactobacilos en la vagina de un sujeto en relación con un sujeto sano, en donde la composición comprende de 1,3 a 1,7 % p/v de glucógeno y menos de 0,1 % p/v de ácido láctico, opcionalmente en donde la composición no contiene ácido láctico.
2. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, que comprende además agua y un derivado de la celulosa, opcionalmente en donde la composición comprende de 94 a 97 % p/v de agua y de 2 a 5 % p/v de un derivado de la celulosa, en donde el derivado de la celulosa es cualquier polímero que comprende celulosa.
3. La composición farmacéutica de conformidad con cualquier reivindicación anterior para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la composición comprende un hidrogel acuoso que comprende un derivado de celulosa, en donde el derivado de celulosa es cualquier polímero que comprende celulosa.
4. La composición farmacéutica de conformidad con cualquier reivindicación anterior para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la composición comprende de 1,4 a 1,6 % p/v de glucógeno, opcionalmente aproximadamente 1,5 % p/v de glucógeno, opcionalmente en donde el glucógeno se puede obtener de una fuente animal, además opcionalmente en donde el glucógeno es de ostra, mejillón o bovino.
5. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el derivado de celulosa es un éter de celulosa, opcionalmente en donde el éter de celulosa es metilcelulosa (MC) hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), etilcelulosa (EC), hidroxietilcelulosa (HEC), carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC), o combinaciones de las mismas, además opcionalmente en donde el éter de celulosa es hidroxipropil metilcelulosa.
6. La composición farmacéutica de conformidad con cualquier reivindicación anterior para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el pH de la composición es de 5,7 a 6,7, opcionalmente en donde el pH de la composición es de 6,0 a 6,2.
7. La composición farmacéutica de conformidad con cualquier reivindicación anterior para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que se presenta en forma de hidrogel y/o pesario vaginal.
8. La composición farmacéutica de conformidad con cualquier reivindicación anterior para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que es mucoadhesiva, opcionalmente en donde la composición comprende una película mucoadhesiva, un gel o un sistema precursor cristalino líquido gelificante *in situ* mucoadhesivo.
9. La composición farmacéutica de conformidad con cualquier reivindicación anterior, que comprende además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y/o comprende además uno o más agentes terapéuticos adicionales, opcionalmente en donde el uno o más agentes terapéuticos adicionales se seleccionan entre un antibiótico, un agente antibacteriano, un agente antifúngico, un agente antiparasitario, un agente antiviral, un agente antiséptico y un agente antiinflamatorio.
10. La composición farmacéutica para uso de conformidad cualquier reivindicación anterior, en donde el uso comprende proporcionar un aumento del número de lactobacilos en la vagina del sujeto en relación con un sujeto no tratado con la condición, opcionalmente en donde el aumento del número de lactobacilos se consigue durante un periodo de al menos 48 horas y/o en donde el uso comprende restaurar el número de lactobacilos en la vagina a un nivel normal.
11. La composición farmacéutica para uso de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde el uso comprende alcanzar un pH normal de la vagina del sujeto de 3,8 a 4,5.
12. La composición farmacéutica para uso de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde la condición que debe prevenirse o tratarse es una infección vaginal, una inflamación vaginal o una complicación de las mismas, opcionalmente una infección o inflamación vaginal recurrente, además opcionalmente en donde la complicación es parto prematuro, parto de un feto muerto, infección vaginal posparto o inflamación vaginal, además opcionalmente aún en donde la condición que debe prevenirse o tratarse es vaginosis bacteriana, vaginitis, candidiasis vulvovaginal o infección por estreptococos del Grupo B.
13. La composición farmacéutica para uso de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde el sujeto a tratar está embarazada.
14. La composición farmacéutica para uso de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en donde la condición que debe prevenirse o tratarse está asociada con un aumento del número de bacterias patógenas o levaduras en la vagina de un sujeto en relación con un sujeto sano, opcionalmente bacterias *Gardnerella vaginalis*

o *Streptococcus* del Grupo B o una especie de levadura *Candida*, opcionalmente *Candida albicans*.

15. La composición farmacéutica de conformidad cualquier reivindicación anterior para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la composición es adecuada para la administración intravaginal.

5

DIBUJOS

FIGURA 1

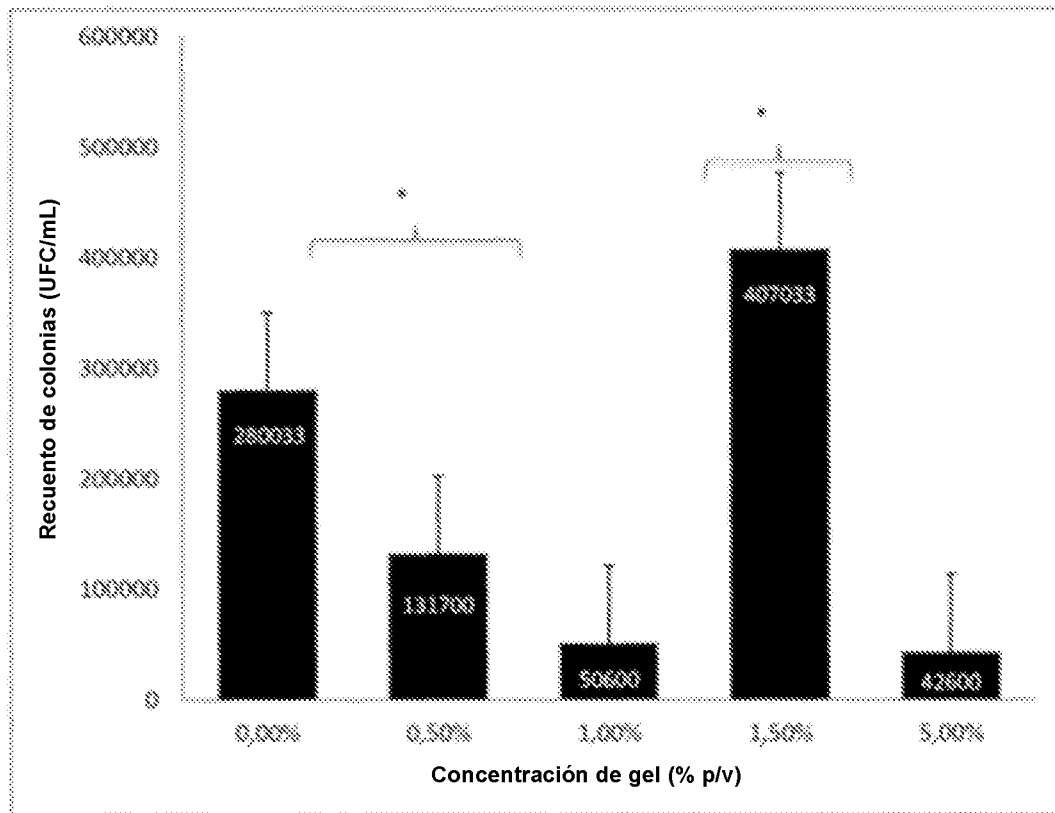


FIGURA 2

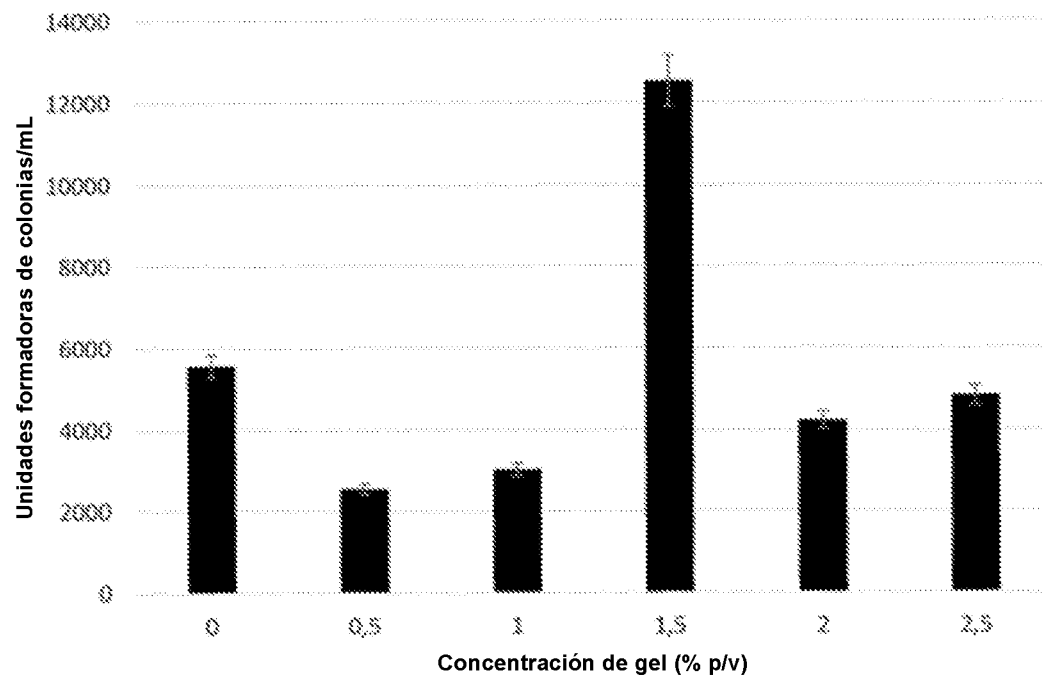


FIGURA 3

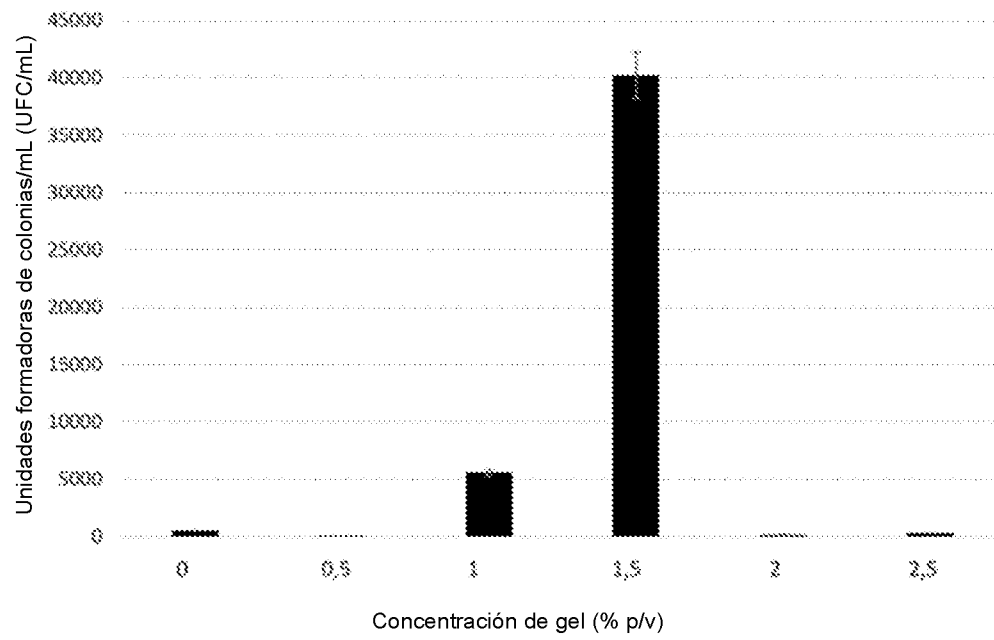


FIGURA 4

