

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 307**

51 Int. Cl.:

A61K 35/747 (2015.01)

A61K 38/40 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

A23L 33/19 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.04.2021 PCT/EP2021/060394**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.10.2021 WO21214139**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2021 E 21725707 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024 EP 4138870**

54 Título: **Composición para su uso en el tratamiento de infecciones por Streptococcus del grupo B (GBS)**

30 Prioridad:
21.04.2020 EP 20170598

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2024

73 Titular/es:
**BIOFARMA S.R.L. (100.0%)
Via Castelliere, 2
33036 Mereto Di Tomba, IT**

72 Inventor/es:
TERRUZZI, CARLO

74 Agente/Representante:
RUO, Alessandro

Observaciones:

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

ES 2 988 307 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición para su uso en el tratamiento de infecciones por *Streptococcus* del grupo B (GBS)

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al campo de las infecciones bacterianas, en concreto, a las infecciones por *Streptococcus* del grupo B (GBS, por sus siglas en inglés) durante y después del embarazo.

10 [0002] La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende una cepa de *Lactobacillus acidophilus*, una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* y lactoferrina en el tratamiento preventivo y/o curativo de infecciones por *Streptococcus* del grupo B (GBS).

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 [0003] *Streptococcus agalactiae* o *Streptococcus* del grupo B (GBS) es una causa importante de morbilidad y mortalidad tanto para las madres como para los recién nacidos en todo el mundo. El tracto gastrointestinal representa un reservorio natural de GBS desde el que esta bacteria podría trasladarse y colonizar la vagina. Estudios realizados en los EE. UU. muestran que el 10-35 % de las mujeres embarazadas son portadoras asintomáticas de GBS. La colonización podría ser un evento ocasional, crónico o intermitente. El factor de riesgo más importante para la infección neonatal es la presencia de la bacteria patógena en el tracto urogenital de la madre durante el parto y después del paso del feto por el canal de parto. Alternativamente, las bacterias patógenas pueden llegar al líquido amniótico por vía ascendente después de la ruptura de las membranas, aunque este último evento no es necesario para la colonización bacteriana.

25 [0004] Con respecto a la patogenia de la infección neonatal tardía, se supone que la transmisión es horizontal. Entre los factores responsables de la infección, pueden mencionarse el contacto estrecho con la madre, la lactancia materna y la transmisión nosocomial.

30 [0005] El principal problema relacionado con la presencia del GBS en el tracto urogenital y gastrointestinal de las madres está representado por la colonización asintomática. De hecho, con frecuencia se encuentra bacteriuria asintomática durante el embarazo. Entre las formas asintomáticas, las manifestaciones clínicas en mujeres embarazadas incluyen corioamnionitis, cistitis, pielonefritis y bacteriemia febril, así como fiebre y endometritis en el puerperio. Asimismo, este agente patógeno puede estar relacionado con un parto prolongado, la rotura prematura de membranas (PROM, por sus siglas en inglés) y el parto prematuro (PPT, por sus siglas en inglés). Con menos frecuencia, está vinculado a la infección de la herida quirúrgica después de una cesárea, los abscesos pélvicos, la tromboflebitis séptica pélvica y la osteomielitis.

40 [0006] Al nacer, el 50-65 % de los recién nacidos de madres colonizadas presentan GBS en el conducto auditivo externo, la faringe, el ombligo y el tracto anorrectal.

[0007] Aproximadamente el 98 % de los recién nacidos que muestran signos de colonización no desarrollan la infección; no obstante, esta infección ocurre en el 1-2 % de los casos.

45 [0008] El GBS puede provocar dos manifestaciones clínicas diferentes: infección neonatal precoz y tardía. La primera (infección precoz) se produce dentro de los primeros 7 días después del nacimiento y su síntoma principal es la dificultad respiratoria. La neumonía y la septicemia son las manifestaciones clínicas más comunes, mientras que el 5-10 % de los recién nacidos presenta meningitis. La infección precoz es 10 veces más frecuente en niños prematuros.

50 [0009] La infección tardía se produce entre 7 días y 3 meses después del nacimiento. Dichos pacientes por lo general nacen prematuros y con frecuencia desarrollan meningitis, septicemia e infecciones osteoarticulares. Más del 20 % de los recién nacidos que sobreviven a la meningitis provocada por GBS desarrollan daños neurológicos permanentes, tales como sordera neurosensorial, retraso mental, ceguera cortical. La tasa de mortalidad en los EE. UU. ha disminuido significativamente durante las últimas 3 décadas: del 50 % en 1970 al 6 % en 1990; datos más recientes de los CDC muestran una tasa más baja.

55 [0010] El diagnóstico en la mujer embarazada se realiza mediante:

- Ensayo de cultivo para la búsqueda de la bacteria patógena a partir de una torunda vaginal o anorrectal;
- Prueba de urocultivo.

[0011] El diagnóstico en el recién nacido se realiza mediante:

- 65 - Ensayo de cultivo para la búsqueda de la bacteria patógena a partir de una torunda nasofaríngea o auditiva;
- Hemocultivo;

- Examen del líquido cefalorraquídeo.

[0012] Hoy en día, el procedimiento más eficaz para reducir la incidencia de infección neonatal precoz es el cribado de mujeres embarazadas para identificar la bacteria patógena (sin ningún síntoma) y la terapia antibiótica intraparto. Esta última parece ser la mejor manera de prevenir complicaciones maternas, infección y eventos neonatales. Podría realizarse sobre la base de un cribado de cultivo durante las semanas 35.^a a 37.^a del embarazo o teniendo en cuenta factores de riesgo tanto prenatales como intraparto tales como:

- Colonización rectal vaginal durante las semanas 35.^a - 37.^a del embarazo;
- Parto prematuro;
- Sin resultados de la torundas, teniendo en cuenta los antecedentes médicos y, en particular: parto prematuro (<37 semanas), pPROM, PROM de más de 18 horas, fiebre durante el parto (>38 °C o 100 °F), el recién nacido anterior resultó positivo para GBS, urocultivo de la madre positivo para GBS.

[0013] La terapia antibiótica oral durante el embarazo, antes del parto, está indicada únicamente en caso de antecedentes de GBS en muestras de orina mientras que la vaginitis provocada por GBS no es una indicación para el tratamiento.

[0014] La profilaxis intraparto debe realizarse administrando penicilina o ampicilina cada 4 horas hasta el parto. El tratamiento antibiótico del recién nacido con riesgo de infección debe realizarse sólo después del diagnóstico y de las manifestaciones clínicas de la infección.

[0015] Todavía no existe una vacuna disponible contra la infección por GBS. Russo *et al.* 2018, ARCH GYNECOL. OBSTET., vol. 298(1), págs.139-145, usa cápsulas orales de *L. acidophilus* GLA-14, LMGS 29159 y *L. rhamnosus* HN001 y lactoferrina en combinación, para tratar la vaginosis bacteriana.

[0016] En vista de la actual falta de tratamiento para el GBS, que permitiría evitar complicaciones e infecciones a la madre y al recién nacido, cada vez es más evidente la necesidad e importancia del desarrollo de un tratamiento alternativo al uso de terapia antibiótica durante el embarazo y el parto.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0017] El problema que subyace a la presente invención es el de poner a disposición tratamientos para la prevención y el tratamiento de infecciones por *Streptococcus* del grupo B durante y después del embarazo.

[0018] Este problema se resuelve mediante el presente hallazgo mediante el uso de una composición que comprende una cepa de *Lactobacillus acidophilus*, una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* y lactoferrina en el tratamiento preventivo y/o curativo de infecciones por *Streptococcus* del grupo B (GBS) durante o después del embarazo, en donde la cepa de *L. acidophilus* tiene una región 16s que tiene al menos un 95 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1. Como se describirá adicionalmente en la descripción detallada de la invención detallada, la composición de la presente invención tiene las ventajas de permitir el tratamiento de dichas infecciones por *Streptococcus agalactiae* sin el uso de antibióticos.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0019] Las características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada que se publica a continuación, de los Ejemplos proporcionados con fines ilustrativos y de las Figuras 1 y 2 adjuntas, en donde:

Figura 1A, 1B y 1C: muestran gráficos que publican la inhibición del crecimiento del GBS (10^6 UFC) después de diferentes tratamientos con *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, la mezcla de ambos lactobacilos y la mezcla en combinación con lactoferrina (en el intervalo de 0,1 a 10 mg/ml). Ambas cepas de lactobacilos (*L. acidophilus* LMG S-29159 y *L. rhamnosus* SD5675) se usaron a 10^7 UFC como se describe en el Ejemplo 7. Las Figuras 1A, 1B y 1C muestran la inhibición del crecimiento de GBS después de 6, 12 y 24 horas, respectivamente.

Figura 2: muestra un gráfico que publica el crecimiento de GBS en presencia de lactoferrina (Lf).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0020] La presente invención se refiere a una composición que comprende una cepa de *Lactobacillus acidophilus*, una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* y lactoferrina, en donde la cepa de *L. acidophilus* tiene una región 16s que tiene al menos un 95 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de infecciones por *Streptococcus* del grupo B (GBS) durante y después del embarazo. La composición anterior comprende una cepa de *Lactobacillus acidophilus*, una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* y lactoferrina se usa en la preparación de un medicamento para el tratamiento preventivo y/o curativo de infecciones por *Streptococcus* del grupo B (GBS). Los lactobacilos, tales como, por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus*, son microorganismos que ejercen varios efectos beneficiosos para la salud humana cuando se administran en cantidad

adecuada. Por este motivo, se consideran probióticos.

[0021] *Lactobacillus* spp. representa la categoría de microorganismos que es predominante en el ecosistema vaginal sano. Los lactobacilos contribuyen a la homeostasis vaginal equilibrando las diferentes poblaciones bacterianas a través de la producción de sustancias antimicrobianas capaces de impedir el crecimiento de microorganismos patógenos. Además, también producen ácido láctico, que mantiene el pH vaginal fisiológico bajo, contribuyendo por lo tanto a un ambiente vaginal sano. Las alteraciones en la composición microbiana del ecosistema vaginal están relacionadas con varios resultados adversos para la salud, tales como la vaginosis bacteriana (VB) y la vaginitis aeróbica (VA).

[0022] La lactoferrina (Lf) es un componente natural y seguro de la mayoría de los fluidos biológicos exocritos, incluyendo lágrimas, leche, saliva y secreciones vaginales, y merece atención como posible agente terapéutico. La Lf es una glicoproteína multifuncional de unión al hierro de ~80 kDa y constituye uno de los principales componentes inmunomoduladores del sistema inmunitario innato. Otras actividades biológicas de la Lf descritas en la bibliografía científica incluyen la actividad antimicrobiana contra una amplia gama de bacterias, hongos, protozoos y virus patógenos, además de la actividad antiinflamatoria y transportadora de hierro. Al igual que otros glicoconjugados de la leche, la Lf actúa como un receptor soluble mimético que inhibe la unión del patógeno a la superficie de células mucosas. A pesar del amplio espectro de las actividades antimicrobianas e inmunomoduladoras de la Lf mencionadas anteriormente, se sabe relativamente poco sobre la capacidad de la Lf para modular el crecimiento de las bacterias vaginales.

[0023] Sin limitarse a ninguna teoría, el mecanismo de acción responsable de la prevención de la infección por GBS en mujeres es el efecto directo debido al efecto antimicrobiano de la composición de la invención en el intestino. De hecho, el intestino representa el reservorio de muchos microbios patógenos que provocan enfermedades en los seres humanos, tales como infecciones genitourinarias inferiores. La composición de los presentes inventores es capaz de reducir drásticamente la proliferación del GBS y, en consecuencia, su migración y colonización del tracto urogenital inferior.

[0024] En estudios experimentales anteriores de los presentes inventores se descubrió que una combinación de lactobacilos (es decir, *L. acidophilus* y *L. rhamnosus*) ejercía efectos antimicrobianos mediante la inhibición de la proliferación y el crecimiento de algunos patógenos específicos y bacterias oportunistas. En particular, los presentes inventores demostraron que la combinación de probióticos indujo un efecto significativo sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, que se consideran la causa más común de infecciones del tracto urinario inferior. Por el contrario, no se sabe nada sobre los efectos de este complejo contra GBS.

[0025] Basándose en la evidencia mencionada anteriormente, los presentes inventores investigaron la capacidad de lactobacilos seleccionados, principalmente *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus*, solos o en combinación, y en presencia o ausencia de Lf, preferentemente lactoferrina bovina, sobre el crecimiento y la proliferación de GBS.

[0026] Sorprendentemente, los inventores descubrieron que combinando una cepa de *Lactobacillus acidophilus*, una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* y lactoferrina en una composición, la composición tenía un efecto sinérgico sobre el GBS.

[0027] Los resultados que se muestran en las Figuras 1 y 2 y que se describen en el Ejemplo 7 muestran que ni *Lactobacillus acidophilus* ni *Lactobacillus rhamnosus*, inhibieron el crecimiento de GBS ni solos ni en combinación después de 6 horas de incubación. Puede observarse una ligera inhibición para *L. acidophilus* después de 12 horas, mientras que la lactoferrina sola no ejerce efectos inhibidores significativos en ninguno de los tiempos de incubación.

[0028] Los resultados de las Figuras 1 y 2 se obtuvieron con las cepas *L. acidophilus* LMG S-29159 y *L. rhamnosus* SD5675.

[0029] El experto habitual en la materia sabe, que pueden obtenerse los mismos resultados usando diferentes cepas de *L. acidophilus* y *L. rhamnosus*, puesto que con mucha frecuencia diferentes cepas bacterianas pueden tener variaciones genéticas muy discretas y, al mismo tiempo, tener la misma actividad. El experto en la materia también sabe que una misma cepa bacteriana puede tener un número de depósito diferente y/o un nombre comercial diferente.

[0030] Los inventores han descubierto sorprendentemente que las cepas de *Lactobacillus acidophilus* que derivan de la cepa La-14 de *Lactobacillus acidophilus* (tales como *L. acidophilus* L MGS-29159 y *L. acidophilus* GLA-14), permiten obtener una composición con los efectos descritos en la presente invención.

[0031] En particular, el *Lactobacillus acidophilus* con actividad sorprendente puede identificarse comparando la secuencia génica de ARNr 16s.

[0032] La región de 500 pares de bases de la región 16s en *L. acidophilus* LMGS-29159, *L. acidophilus* La-14 y *L. acidophilus* GLA-14 se describe en la SEQ ID NO: 1:

TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATG
 CAAGTCGAGCGAGCTGAACCAACAGATTCCTTCGGTGATGACGTTGGGAACG
 CGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCCATAGTCTGGGA
 TACCACTTGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGATCGCATGATCAG
 CTTATAAAAGGCGGCGTAAGCTGTGCTATGGGATGGCCCCGCGGTGCATTAG
 CTAGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGA
 GACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTACGGGAGGCA
 GCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTG
 AGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAG
 GTAGTAACTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTAC
 GTGCCAGCAGCCGCGGTA.

- 5 **[0033]** Cualquier combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y lactoferrina con una cepa de *L. acidophilus* que tiene una secuencia génica de ARNr 16s con una región 16s que tiene una identidad del 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, permite obtener una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 **[0034]** Por lo tanto, la presente invención proporciona el uso de una composición que comprende una cepa de *Lactobacillus acidophilus*, en donde dicha cepa de *Lactobacillus acidophilus* tiene una región 16s que tiene al menos un 95 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, en combinación con una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* y lactoferrina. Cuando se combinaron entre sí, el efecto inhibitor de las cepas de *Lactobacillus* resultó más fuerte y apareció antes y se potenció significativamente en combinación con Lf, destacando un efecto sinérgico. En un aspecto preferido, la invención proporciona el uso de una composición que comprende una cepa de *Lactobacillus acidophilus* que tiene una región 16s que tiene al menos un 95 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* y lactoferrina, en donde dicha cepa de *Lactobacillus acidophilus* y dicha cepa de *Lactobacillus rhamnosus* están cada una independientemente del otro en una concentración total en un intervalo de 10^7 a 10^{12} UFC/dosis, preferentemente 10^9 UFC/dosis. En un aspecto adicional, en la composición de la invención la cepa de *Lactobacillus acidophilus* que tiene una región 16s que tiene al menos un 95 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 se elige del grupo que consiste en el número de depósito LMG S-29159 (Colecciones Coordinadas Belgas de Microorganismos o BCCM/LMG de la Universidad de Gante en Bélgica) (equivalente a *L. acidophilus* La-14 y *L. acidophilus* GLA-14) y la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* se elige del grupo que consiste en *L. rhamnosus* depositado con el número de depósito SD5675 (ATCC, equivalente a *L. rhamnosus* HN001) y otras bacterias acidolácticas pertenecientes a la misma especie, tales como, pero sin limitarse a , las cepas *L. rhamnosus* Lr-32, *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* GR-1 y *L. rhamnosus* SP-1.
- 15 **[0035]** En un aspecto preferido, en la composición de la invención la cepa de *Lactobacillus acidophilus* que tiene una región 16s que tiene al menos un 95 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 es *Lactobacillus acidophilus* depositado con el número de depósito LMG S-29159 y dicha cepa de *Lactobacillus rhamnosus* es *Lactobacillus rhamnosus* depositado con el número de depósito SD5675.
- 20 **[0036]** En la composición de la invención, la cepa de *Lactobacillus acidophilus* tiene una región 16s que tiene al menos un 95 %, preferentemente al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, aún más preferentemente la región 16s es la SEQ ID NO: 1.
- 25 **[0037]** En un aspecto adicional más, en la composición de la invención, dicha lactoferrina, preferentemente lactoferrina bovina, está en una concentración total en un intervalo de 5 mg/dosis a 300 mg/dosis, preferentemente 50 mg/dosis.
- 30 **[0038]** De acuerdo con otro aspecto, la invención descrita proporciona el uso de una composición que comprende una cepa de *Lactobacillus acidophilus*, que tiene una región 16s que tiene al menos un 95 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* y lactoferrina, dicha composición puede comprender además al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en: minerales, vitaminas, probióticos, prebióticos, proteínas o cualquier mezcla de los mismos.
- 35 **[0039]** Preferentemente, dichos minerales se seleccionan del grupo que consiste en calcio, fósforo, cobre, magnesio, potasio, hierro, selenio, sodio, cinc, manganeso, cloruro y yodo, dichas vitaminas se seleccionan del grupo que consiste en vitamina A, vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (niacina), vitamina B6, vitamina B8 (biotina), vitamina B12, vitamina C, vitamina D, vitamina E y ácido fólico, dichos probióticos son *Bifidobacterium* o bacterias acidolácticas seleccionadas del grupo que consiste en *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*,
- 40
- 45
- 50

Lactobacillus bifidus, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus helveticus* y dichas proteínas se seleccionan de suero y caseína.

5 [0040] En un aspecto más preferido, la invención se refiere al uso de una composición que comprende *Lactobacillus acidophilus* que tiene una región 16s que tiene al menos un 95 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 en un intervalo de 10^7 a 10^{12} UFC/dosis, *Lactobacillus rhamnosus* en un intervalo de 10^7 a 10^{12} UFC/dosis, lactoferrina en un intervalo de 5 mg/dosis a 300 mg/dosis y excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 [0041] Dichos excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser, pero sin limitación, hidroxipropilmetilcelulosa, almidón, estearato de magnesio y dióxido de silicio. El experto habitual en la materia conoce otros excipientes que pueden preparar las composiciones de acuerdo con los Ejemplos.

15 [0042] En otro aspecto, la composición que comprende una cepa de *Lactobacillus acidophilus* que tiene una región 16s que tiene al menos un 95 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 y una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, así como lactoferrina, puede usarse en una dosificación diaria en el intervalo de 10^7 a 10^{12} UFC/dosis, preferentemente 10^9 UFC/dosis donde la relación entre *L. acidophilus* y *L. rhamnosus* varía entre 20:1 y 2:1, preferentemente 4:1 y *L. acidophilus* siempre es mayor que *L. rhamnosus*.

20 [0043] La lactoferrina, preferentemente lactoferrina bovina, puede usarse en una dosificación diaria en el intervalo de 5 mg/dosis a 300 mg/dosis, preferentemente 50 mg/dosis.

25 [0044] Esta dosificación se usa en el ensayo clínico multicéntrico en curso de los presentes inventores con 410 mujeres embarazadas distribuidas aleatoriamente en 2 grupos de acuerdo con el tratamiento (fármaco verdadero o placebo). Tomarán una cápsula de formulación al día desde la semana 32.^a a la 37.^a del embarazo. Cada cápsula contiene 5×10^9 UFC de mezcla de lactobacilos (es decir, *L. acidophilus* que tiene una región 16s que tiene al menos un 95 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 y *L. rhamnosus*) y 50 mg de lactoferrina. En un aspecto preferido, la composición para su uso de acuerdo con la presente invención es para la administración oral, en donde dicha composición está en forma sólida, líquida, elegida del grupo que consiste en un comprimido, una cápsula, un
30 polvo, un granulado, un sobrecito alargado de tipo *stick* soluble, una suspensión líquida.

[0045] La composición descrita en el presente documento se usa ventajosamente en la prevención y/o el tratamiento de infecciones por *Streptococcus* del grupo B (GBS) que se producen durante o después del embarazo. Diversas formas de realización y aspectos de la presente invención como se han descrito anteriormente en el presente documento y como se reivindican en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran respaldo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

40 [0046] A continuación se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas formas de realización de la invención.

Ejemplo 1.

45 Preparación de la composición de acuerdo con la invención (cápsulas)

[0047] La composición de acuerdo con la invención se preparó pesando cada materia prima que son *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, lactoferrina, sales de magnesio de ácidos grasos y dióxido de silicio en un taller con humedad controlada en el intervalo del 20-30 %. Después de esto, cada ingrediente se tamiza y se introduce en la máquina mezcladora y se mezcla en presencia de nitrógeno con el fin de eliminar el máximo oxígeno posible. La mezcla (polvo) se carga en una tolva de una máquina encapsuladora para la producción de cápsulas de HPMC en condiciones ambientales controladas (temperatura y humedad). Después del llenado, las cápsulas se transportan a la máquina de formación de blíster para su acondicionamiento primario en blísteres de aluminio/aluminio o frascos adecuados.

55 Composición

[0048]

60 Lactoferrina 54,3 mg
L. acidophilus+*L. rhamnosus*: 5×10^9 UFC
 Hidroxipropilmetilcelulosa 80 mg
 Almidón 53,6 g
 Sales de magnesio de ácidos grasos 5 mg
 Dióxido de silicio 3,7 mg

65

Ejemplo 2.

Preparación de la composición de acuerdo con la invención (comprimidos recubiertos de 1 g)

[0049]

- 5 Lactoferrina 60 mg
L. acidophilus 20×10^9
L. rhamnosus 5×10^9
Fosfatos de calcio 300 mg
10 Celulosa microcristalina 150 mg
Sales de magnesio de ácidos grasos 10 mg
Dióxido de silicio 5 mg
Agente de recubrimiento 50 mg

- 15 **[0050]** Una mezcla de hidroxipropilmetilcelulosa con diferente viscosidad (200 mg) y metilcelulosa 125 mg

Ejemplo 3.

Preparación de la composición de acuerdo con la invención (sobrecito de 2 g)

20 **[0051]**

- Lactoferrina 100 mg
L. acidophilus 10×10^9
25 *L. rhamnosus* 2×10^9
Maltodextrina 1780 mg
Dióxido de silicio 20 mg

Ejemplo 4.

- 30 Preparación de la composición de acuerdo con la invención (sobrecito alargado de tipo *stick* oral - listo para usar de 1,5 g)

[0052]

- 35 Lactoferrina 50 mg
L. acidophilus 15×10^9
L. rhamnosus 5×10^9
Fructo-oligosacáridos 1000 mg
40 Sorbitol 335 mg
Dióxido de silicio 15 mg

Ejemplo 5.

- 45 Preparación de la composición de acuerdo con la invención (10 ml de suspensión en aceite)

[0053]

- 50 Lactoferrina 30 mg
L. acidophilus 6×10^9
L. rhamnosus 3×10^9
Aceite de girasol hasta 10 ml
Mono-diglicéridos de ácidos grasos 5 mg
55 Vitamina E 15 mg

Ejemplo 6.

Preparación de la composición de acuerdo con la invención (suspensión líquida)

60 **[0054]**

- Vial de 10 ml
Tapón: Lactoferrina 25 mg; Mezcla de lactobacilos 15×10^9 (*L. acidophilus*; *L. rhamnosus*) 75 mg, dióxido de silicio 5 mg
65 Vial: agua, fructosa, sorbato de potasio, benzoato de sodio, aroma, ácido cítrico.

Ejemplo 7.

Análisis *in vitro* de la actividad de la composición de la invención: ensayo de co-cultivo líquido.

5 **[0055]** Se evaluó la capacidad de *L. acidophilus* y *L. rhamnosus*, solos y en combinación con lactoferrina, para interferir en el crecimiento del GBS mediante un ensayo de co-cultivo líquido.

10 **[0056]** Se almacenaron cepas de *Lactobacillus* (*L. acidophilus* LMG S-29159 y *L. rhamnosus* SD5675) en extracto de levadura y leche (MYE, por sus siglas en inglés) a -80 °C.

15 **[0057]** Antes de los experimentos, cada cepa se transfirió del cultivo madre congelado al caldo MRS (De Man Rugosa Sharpe) incubado a 37 °C en condiciones sin agitación. Se cultivó *Streptococcus agalactiae* en caldo de infusión cerebro-corazón (BHI, por sus siglas en inglés).

20 **[0058]** La prueba de co-cultivo se realizó incubando en un medio definido que simula las secreciones del tracto genital (DMSGTS, por sus siglas en inglés) (capaz de sostener el crecimiento tanto de probióticos como de patógenos) diferentes concentraciones de las cepas probióticas (10⁷ y 10⁸ UFC/ml), solas o en combinación, con diferentes concentraciones (10⁶ y 10⁷ UFC/ml) del patógeno diana. Las cepas probióticas se probaron solas y en combinación con lactoferrina en las siguientes concentraciones finales: 0,1-1-5-10 mg/ml.

25 **[0059]** Los controles se realizaron inoculando DMSGTS únicamente con la bacteria.

30 **[0060]** Para comprobar si el patógeno se inhibió o destruyó, se diluyeron 0,05 ml de suspensiones de cocultivo y se sembraron en medio de agar específico. Después de un período de incubación a 37 °C durante 6-24 h, se evaluó el crecimiento bacteriano. La ausencia de crecimiento se interpretó como actividad microbicida (inhibición del 100%).

35 **[0061]** El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student para datos independientes. Los datos se expresaron como media y DT y los valores de P < 0,05 se consideraron significativos.

40 Resultados

[0062] Los resultados de los experimentos realizados con *L. acidophilus* LMG S-29159 y *L. rhamnosus* SD5675 se muestran en las figuras 1 y 2.

45 **[0063]** Los lactobacilos mostraron diferentes efectos sobre el crecimiento del GBS cuando se probaron solos. En particular, *L. acidophilus* provocó una ligera inhibición del crecimiento después de 12 horas de incubación con la bacteria patógena. Por el contrario, *L. rhamnosus* no redujo el crecimiento bacteriano después de 6 ni de 12 horas, y se mostró una ligera inhibición después de 24 horas. La lactoferrina no afectó significativamente al crecimiento de GBS (fig. 2). Sorprendentemente, cuando se añadió Lf a la mezcla de lactobacilos, el complejo ejerció una inhibición más marcada, lo que fue significativo ya después de 6 horas de incubación.

50 **[0064]** Este efecto fue independiente del recuento de probióticos inicial (se obtuvieron resultados similares con 10⁷ y 10⁸ UFC/ml).

55 Conclusiones

[0065] Los resultados que se muestran en las Figuras 1 y 2 demuestran claramente la eficacia de la composición de acuerdo con la invención (formulación de los 2 lactobacilos, *L. acidophilus* LMG S-29159 y *L. rhamnosus* SD5675, en combinación con lactoferrina) para prevenir y reducir el crecimiento de la bacteria patógena de GBS.

60 **[0066]** Ni *Lactobacillus acidophilus* ni *Lactobacillus rhamnosus*, inhibieron el crecimiento de GBS solos ni en combinación después de 6 horas de incubación. Puede observarse una ligera inhibición para *L. acidophilus* después de 12 horas, mientras que la lactoferrina sola no ejerce efectos inhibidores significativos en ninguno de los tiempos de incubación.

65 **[0067]** Sorprendentemente, el efecto de la combinación de lactobacilos se vio potenciado por la lactoferrina, destacando un efecto sinérgico.

[0068] Teniendo en cuenta que el GBS es una de las bacterias más comunes y patógenas que provocan afecciones graves tanto en mujeres embarazadas como principalmente en recién nacidos, la composición de la presente invención puede representar un enfoque alternativo potencial para la prevención y el tratamiento de la infección por GBS durante el embarazo.

Ejemplo 8.

Estudio clínico en curso

- 5 **[0069]** Se está realizando un ensayo clínico multicéntrico, con doble ocultación, aleatorizado y controlado con placebo, con el fin de evaluar la eficacia de la composición de acuerdo con la invención en la prevención de la infección por GBS en mujeres embarazadas.
- 10 **[0070]** El estudio comenzará solo después de obtener la aprobación por escrito del Comité de Ética Independiente en los sitios respectivos y la comunicación al Ministerio de Salud italiano. El ensayo se realizará de conformidad con la Declaración de Helsinki, (Fortaleza, Brasil, octubre de 2013) y las Buenas prácticas clínicas.
- 15 **[0071]** Se inscribirán 410 mujeres embarazadas (de la semana 32.^a a la 37.^a del embarazo) y se dividirán aleatoriamente en 2 grupos (fármaco verdadero o placebo) de acuerdo con el tratamiento. El reclutamiento se realizará en la Universidad de Módena (coordinadora), la Universidad de Milán y la Universidad de Reggio Emilia.
- 20 **[0072]** Se reclutarán todas las mujeres que sean adultas (>18 años) y que estén embarazadas con bajo riesgo obstétrico y con torunda rectal-vaginal positiva para GBS; embarazo dentro de la semana 33.^a y previsión de parto vaginal.
- [0073]** Los criterios de exclusión incluyen mujeres embarazadas con orina positiva para GBS; mujeres con antecedentes de bebés con septicemia temprana; uso de antibióticos un mes antes de la inscripción; incapacidad para comprender el estudio y firmar el consentimiento informado.
- 25 **[0074]** El criterio de valoración primario es la tasa de mujeres embarazadas con colonización por GBS (portadoras) en el cribado previo al parto (semana 35-37.^a).
- [0075]** Los criterios de valoración secundarios incluyen la tasa de mujeres tratadas con antibióticos durante el parto; la tasa de mujeres con rotura precoz de membranas; la puntuación de Apgar > 8 a los 5[^] minutos; la tasa de recién nacidos que reciben antibióticos durante las primeras 48 horas de vida; la tasa de recién nacidos con septicemia temprana por GBS; y la seguridad y tolerabilidad del producto en investigación/placebo.
- 30 **[0076]** El tratamiento consiste en la administración oral de 1 cápsula al día del producto en investigación (ambos lactobacilos en combinación con lactoferrina) o de placebo desde la semana 32.^a a la 37.^a del embarazo. Cada cápsula de fármaco verdadero contiene 5×10^9 UFC de lactobacilos (es decir, *L. acidophilus* y *L. rhamnosus*) y 50 mg de lactoferrina.
- 35 **[0077]** Durante el estudio, se recogerán torundas rectales y vaginales de cada mujer para el análisis de GBS de acuerdo con la práctica clínica actual. Se realizará una visita de seguimiento después del parto con el fin de evaluar la colonización por GBS en los recién nacidos.
- 40 **[0078]** Además, en un subgrupo de 20 mujeres por cada centro, se recogerá una torunda vaginal adicional durante la evaluación de la semana 35-37.^a. Se usará para demostrar la colonización vaginal de 2 cepas de lactobacilos incluidas en el producto en investigación y para evaluar la microbiota vaginal y los perfiles de citocinas mediante un enfoque molecular (extracción y aislamiento de ADN bacteriano de las torundas; secuencia de ADN_r 16S; análisis por RT-PCR).
- 45 **[0079]** La seguridad se evaluará registrando eventos adversos.
- 50 **[0080]** Todos los datos se mostrarán como frecuencias absolutas o relativas. Los criterios de valoración primarios y secundarios se compararán entre los dos brazos del estudio mediante el uso de un ensayo Z de 2 colas. A partir de la descripción anterior y de los ejemplos indicados anteriormente, las ventajas obtenidas mediante la composición descrita y obtenida de acuerdo con la presente invención son evidentes.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cepa de *Lactobacillus acidophilus*, una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* y lactoferrina para el uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de infecciones por *Streptococcus* del grupo B (GBS),
5 en donde dichas infecciones por *Streptococcus* del grupo B (GBS) se producen durante o después del embarazo, y en donde dicha cepa de *Lactobacillus acidophilus* tiene una región 16s que tiene al menos un 95 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha cepa de *Lactobacillus acidophilus*
10 y dicha cepa de *Lactobacillus rhamnosus* están cada una independientemente del otro en una concentración total en un intervalo de 10^7 a 10^{12} UFC/dosis, preferentemente 10^9 UFC/dosis.
3. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha cepa de
15 *Lactobacillus acidophilus* se elige del grupo que consiste en *L. acidophilus* depositado con el número de depósito LMG S-29159, *L. acidophilus* GLA-14, *L. acidophilus* La 14.
4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha cepa de
20 *Lactobacillus rhamnosus* se elige del grupo que consiste en *L. rhamnosus* depositado con el número de depósito SD5675, *L. rhamnosus* Lr-32, *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* GR-1 y *L. rhamnosus* SP-1.
5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha cepa de
Lactobacillus acidophilus tiene una región 16s que tiene un 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 1.
6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha cepa de
25 *Lactobacillus acidophilus* se deposita con el número de depósito LMG S-29159 y dicha cepa de *Lactobacillus rhamnosus* se deposita con el número de depósito SD5675.
7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha lactoferrina,
30 preferentemente lactoferrina bovina, está en una concentración total en un intervalo de 5 mg/dosis a 300mg/dosis, preferentemente 50 mg/dosis.
8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además
35 al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en: minerales, vitaminas, probióticos, prebióticos, proteínas o cualquier mezcla de los mismos.
9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de la reivindicación 8, en donde dichos
40 minerales se seleccionan del grupo que consiste en calcio, fósforo, cobre, magnesio, potasio, hierro, selenio, sodio, cinc, manganeso, cloruro y yodo, dichas vitaminas se seleccionan del grupo que consiste en vitamina A, vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (niacina), vitamina B6, vitamina B8 (biotina), vitamina B12, vitamina C, vitamina D, vitamina E y ácido fólico, dichos probióticos se seleccionan del grupo que consiste en *Bifidobacterium* o bacterias acidolácticas seleccionadas del grupo que consiste en *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus iners* y dichas proteínas se seleccionan de suero y caseína.
- 45
10. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende
Lactobacillus acidophilus en un intervalo de 10^7 a 10^{12} UFC/dosis, *Lactobacillus rhamnosus* en un intervalo de 10^7 a 10^{12} UFC/dosis, lactoferrina en un intervalo de 5mg/dosis a 300 mg/dosis y excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 50
11. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha
composición se usa en una dosificación diaria en el intervalo de 10^7 hasta 10^{12} UFC/dosis, preferentemente 10^9 UFC/dosis en combinación con lactoferrina en el intervalo de 5 mg/dosis a 300 mg/dosis, preferentemente 50 mg/dosis.
- 55
12. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicha
composición es para la administración oral.
- 60
13. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicha
composición está en forma sólida, líquida o semilíquida, elegida del grupo que consiste en un comprimido, una cápsula, un polvo, un granulado, un sobrecito alargado de tipo *stick* soluble, una suspensión líquida.

FIGURA 1A

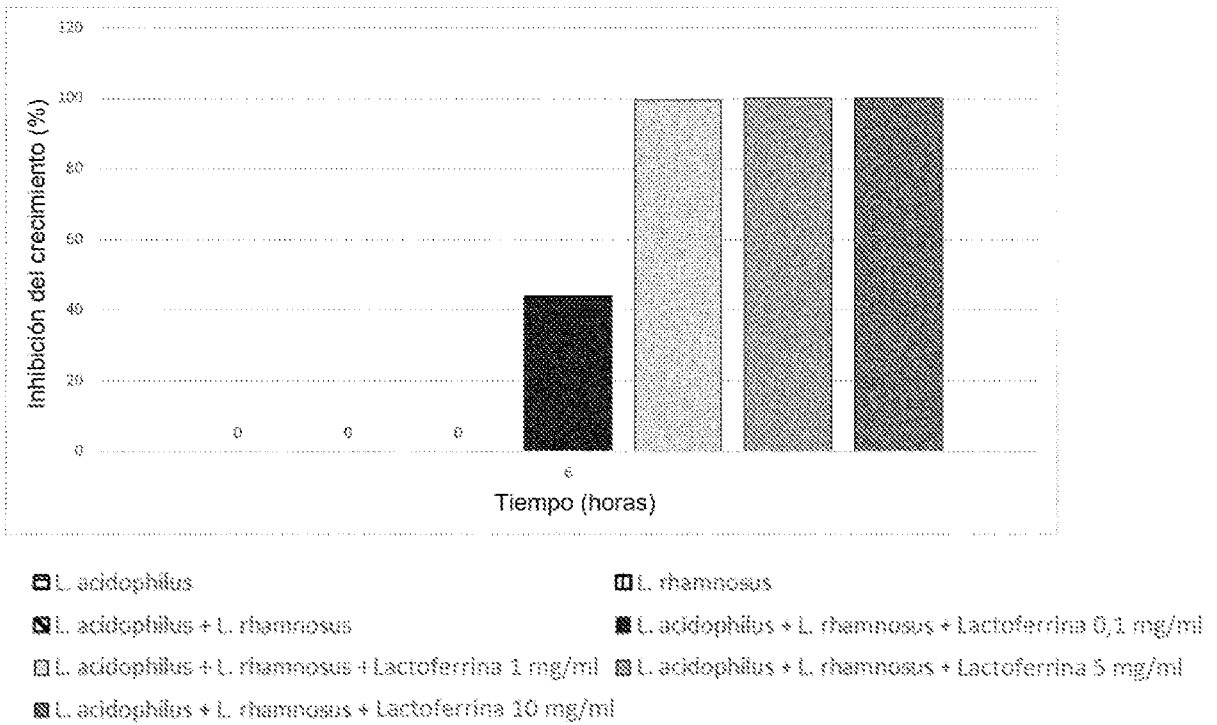
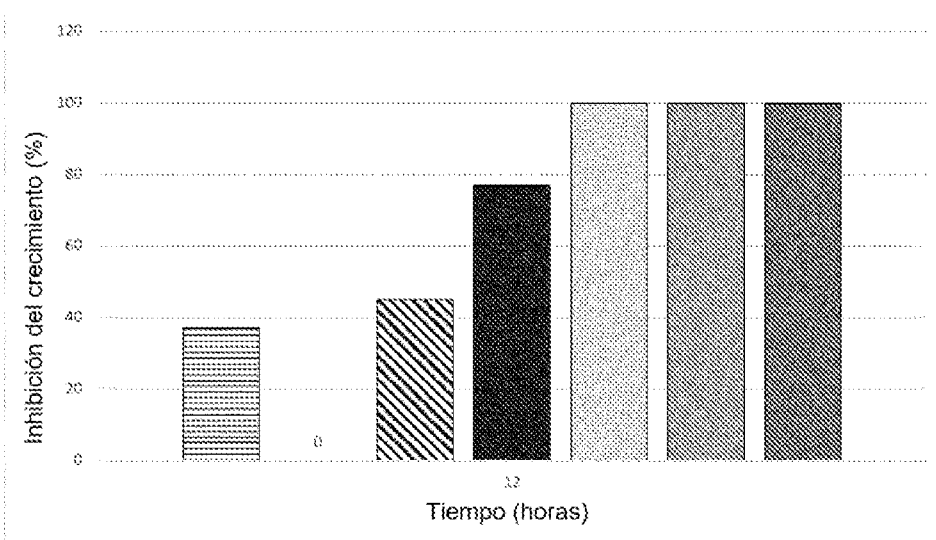


FIGURA 1B



- ▣ L. acidophilus
- ▣ L. rhamnosus
- ▣ L. acidophilus + L. rhamnosus
- ▣ L. acidophilus + L. rhamnosus + Lactoferrina 0,1 mg/ml
- ▣ L. acidophilus + L. rhamnosus + Lactoferrina 1 mg/ml
- ▣ L. acidophilus + L. rhamnosus + Lactoferrina 5 mg/ml
- ▣ L. acidophilus + L. rhamnosus + Lactoferrina 10 mg/ml

FIGURA 1C

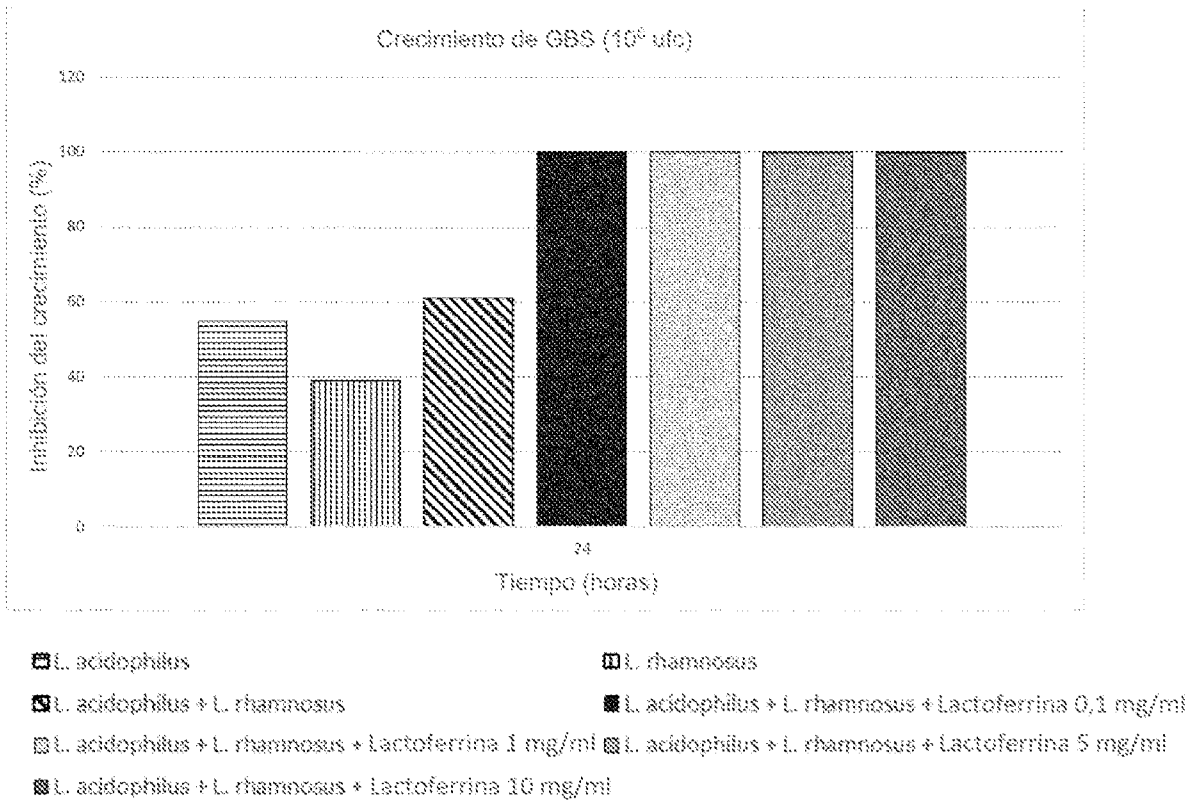


FIGURA 2

