

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 119**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 14/34</b>	(2006.01)	<b>A61P 31/04</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/15</b>	(2006.01)	<b>A61P 37/04</b>	(2006.01)
<b>A61Q 17/04</b>	(2006.01)		
<b>A61K 35/74</b>	(2015.01)		
<b>A61P 15/02</b>	(2006.01)		
<b>A61P 17/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 17/02</b>	(2006.01)		
<b>A61P 17/10</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/12</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/22</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2015 PCT/IB2015/055377**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16009377**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2015 E 15753192 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3049430**

54 Título: **Fracción parietal del Propionibacterium granulosum que tiene acción inmunomoduladora**

30 Prioridad:

**16.07.2014 IT MI20141298**

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

**19.06.2019**

73 Titular/es:

**DEPOFARMA S.P.A. (100.0%)  
Via Terragliol 67  
31022 Preganziol (Treviso), IT**

72 Inventor/es:

**DALLA ZORZA, PAOLA y  
DALLA ZORZA, ALESSANDRA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones:**

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

ES 2 717 119 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**

Fracción parietal del *Propionibacterium granulosum* que tiene acción inmunomoduladora

## 5 Campo técnico

La presente invención se relaciona en términos generales con una fracción parietal de *Propionibacterium granulosum*, obtenida por deslipidación y trituración controlada de la cepa DSM20458.

## 10 Estado de la técnica

Es bien sabido que la administración de algunas bacterias puede estimular la respuesta inmune de un cuerpo. Sin embargo, la administración de un microorganismo completo provoca efectos secundarios que impiden su uso.

15 A lo largo del tiempo se ha observado que las fracciones bacterianas, generalmente de tipo parietal insoluble, derivadas de algunos microorganismos, tales como, por ejemplo, micobacterias y corinebacterias, son capaces de estimular el sistema inmunitario, pero sin generar efectos secundarios dañinos, como los que se pueden encontrar cuando se administra la bacteria completa (ver, por ejemplo, Tian XX et al. *Anticancer Res* 1999, 237-243; Werner et al. *Biomedicine* 1975, 440-452).

20 Es conocido en particular el aislamiento de fracciones insolubles de *Corynebacterium granulosum*; estas realizan una serie de acciones sobre diferentes comportamientos del sistema inmunitario, tal como, inter alia, aumentar la respuesta de anticuerpos en sujetos inmunodeprimidos, aumentar la producción de citoquinas y ejercer una acción antitumoral en tumores injertados. Dichas fracciones se pueden obtener mediante deslipidación y trituración mecánica de las bacterias iniciales, como se ilustra, por ejemplo, por Bizzini et al. En el *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, Vol.2, No1, 1984, pp 144-153. También se han aislado otras fracciones que se originan a partir de diferentes cepas bacterianas (ver, por ejemplo, T. Metianu et al. FR80.08976 e IT20658), pero, en cualquier caso, la mayoría de este tipo de fracciones han demostrado ser agentes inmunomoduladores efectivos capaces de activar una respuesta de anticuerpos solo si se formula y se administra parenteralmente.

25 También existen formulaciones conocidas que comprenden fracciones parietales insolubles funcionalizadas o bioprotegidas adecuadamente capaces de actuar como agentes inmunomoduladores también cuando se administran por vía oral (véase, por ejemplo, IT22693). Sin embargo, este tipo de fracciones requiere modificaciones estructurales que generalmente se llevan a cabo al final de la etapa de trituración.

30 Por ejemplo, el documento TV2005A000026 describe la funcionalización, con quitosano, de una fracción parietal insoluble de *Propionibacterium acnes* obtenida de la cepa ATCC11827 con el fin de obtener un agente bioprotegido que tiene actividad inmunomoduladora.

35 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de encontrar una fracción bacteriana parietal inmunomoduladora no específica que pueda realizar su acción incluso sin funcionalizaciones y/o bioprotecciones particulares (por ejemplo, formando complejos con un portador), y es aplicable tópicamente, por ejemplo, en forma de una crema, pomada o gel.

40 Los solicitantes han encontrado ahora que es posible obtener una fracción parietal dotada de una alta actividad inmunomoduladora y que tiene un efecto inhibitorio sobre los síntomas asociados con trastornos por deslipidación y trituración controlada de cepas DSM20458 de *Propionibacterium granulosum*. La fracción parietal libre así obtenida se puede usar en la preparación de un medicamento para uso tópico dotado de un alto poder inmunoestimulante y un efecto inhibitorio sobre los síntomas de una amplia gama de patologías.

## 50 Objetivo de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones. Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una fracción parietal obtenida por deslipidación y trituración de la cepa de *Propionibacterium granulosum* DSM20458 en donde la deslipidación se realiza tratando bacterias inactivadas con una mezcla alcohólica durante 8-10 horas y la trituración se lleva a cabo mediante sonicación o preferiblemente por agitación a velocidades de entre 3.000 y 5.000 rpm.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende dicha fracción parietal y un portador o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

60 Preferiblemente, la fracción parietal está en una mezcla con ácido hialurónico y/o policarbófilo.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, la composición se formula como ungüentos, pomadas, cremas, lociones, espumas y preferiblemente geles.

65

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a la fracción parietal o la composición farmacéutica para uso como un agente inmunomodulador y/o para reducir la picazón y/o ardor, preferiblemente en el tratamiento de alteraciones de la piel, preferiblemente seleccionadas entre dermatosis, queratosis actínica, acné y quemaduras solares.

5 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a la fracción parietal o la composición farmacéutica para uso en el tratamiento de vulvovaginitis fúngica o bacteriana.

10 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a la fracción parietal o la composición farmacéutica para uso en el tratamiento de infecciones virales, preferiblemente causadas por herpes simple o zoster, o virus del papiloma humano.

Preferiblemente, la fracción parietal o la composición farmacéutica es para administración tópica.

15 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un proceso para preparar la fracción parietal que comprende una etapa de deslipidación y posterior trituración de la cepa de *Propionibacterium granulosum* DSM20458, en donde la deslipidación se realiza tratando bacterias inactivadas con una mezcla alcohólica durante 8-10 horas y la trituración se lleva a cabo por sonicación o preferiblemente por agitación a velocidades de entre 3.000 y 5.000 rpm.

20 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: actividad fagocítica de las diversas fracciones parietales, con referencia al ejemplo 2, en donde: 1. es la fracción parietal de *P. granulosum* de la invención; 2. es la fracción parietal de *P. granulosum* complejada con quitosano; 3. es la fracción 7BVP; y 4. es la fracción 7BVP complejada con quitosano.

25 Figura 2: efecto de las fracciones 1-4 sobre la actividad destructora de los macrófagos.

Descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención

30 Las bacterias iniciales de la invención, *Propionibacterium granulosum* (que pertenecen a las colecciones DSM y que tienen el número 20458), se caracterizan porque: tienen forma de bastón, son anaerobias, no pirogénicas y Gram positivas, producen colonias lisas en placas de agar, no producen indol, no reducen los nitratos, no generan H<sub>2</sub>S, producen catálisis y fermentan glucosa, pero no manitol o lactosa. Dicha cepa se puede obtener de Leibniz Institute DSMZ.

35 La fracción parietal de la presente invención muestra una alta actividad inmunomoduladora y/o inhibidora de los síntomas también si se aplica tópicamente, sin que sea necesario realizar modificaciones estructurales adicionales o biofuncionalizaciones, como, por ejemplo, la conjugación a un portador, según se requiere en la técnica anterior para fracciones parietales obtenidas con métodos similares. De hecho, los solicitantes han notado que la fracción de la invención, obtenida por deslipidación y trituración controlada de la cepa DSM20458, puede formularse convenientemente en una composición para aplicación tópica directamente al final de la etapa de trituración como se describe con detalle a continuación. Las pruebas clínicas realizadas por el solicitante e incluidas en la parte experimental del presente documento han demostrado el hecho de que la fracción parietal de la invención muestra un efecto terapéutico local, combinado con una mejora sorprendente de los síntomas, en particular la picazón y las irritaciones de la piel en general. La presente fracción es capaz de realizar su función gracias también al hecho de que no es absorbida sustancialmente por la piel, lo que le permite exhibir una mayor acción local y una alta inhibición de los síntomas.

40 En el ejemplo 2, en particular, la actividad inmunoestimulante de los siguientes compuestos se compara mediante una prueba de fagocitosis: fracción parietal de la invención, fracción parietal de la invención conjugada con un portador, fracción parietal 7BVP y fracción parietal 7BVP conjugada con un portador. De la prueba se puede observar que la fracción de la invención utilizada como tal demuestra tener el mayor efecto inmunoestimulante. Se deduce que la ventaja decisiva de la nueva fracción radica no solo en su mayor actividad, sino también en el hecho de que no requiere formación de complejos con un portador, con el riesgo de inducir modificaciones estructurales.

45 Se verificó además (usando el Sistema de Reactivo de Griess) que la fracción de la invención es capaz de mejorar la capacidad de destrucción de los macrófagos mediante un aumento en la producción de NO<sub>2</sub>, como se indica, por ejemplo, en la figura 2.

50 Gracias a la alta actividad de la presente fracción parietal libre, es posible producir preparaciones farmacéuticas, por ejemplo, en forma de gel, para uso tópico, en una dosificación baja y que contienen pequeñas cantidades del ingrediente activo.

55 Como se mencionó anteriormente, la fracción parietal de *Propionibacterium granulosum* de la invención, que tiene actividad inmunomoduladora, se obtiene a través de un proceso que comprende la deslipidación y trituración controlada de la cepa DSM20458.

Los solicitantes han notado que, dependiendo de las condiciones experimentales utilizadas, es posible optimizar la actividad inmunomoduladora de la fracción obtenida. En cualquier caso, es preferible llevar a cabo dichas etapas bajo condiciones controladas, sobre todo en lo que se refiere a la trituración, para obtener una fracción formada por la asociación de una glicoproteína con un peptidoglicano parietal y que tenga una actividad de estimulación del sistema reticuloendotelial.

A este respecto y de acuerdo con una realización preferida, la deslipidación se realiza tratando bacterias muertas inactivadas de *Propionibacterium granulosum* DSM20458 con una mezcla alcohólica, preferiblemente éter:etanol, incluso más preferiblemente en una proporción 1:1, por un tiempo comprendido entre aproximadamente 8 y 10 horas. Al final del tratamiento, las bacterias se tratan con cloroformo y se resuspenden en una mezcla de cloroformo:metanol, preferiblemente en una proporción de 2:1. Las etapas preliminares para inactivar y matar las bacterias se pueden llevar a cabo utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, calentando y/o tratando con formaldehído.

La deslipidación es particularmente útil para favorecer la exposición de los sitios involucrados en la actividad. Al final de la deslipidación, las bacterias se someten típicamente a un proceso de secado, por ejemplo, por exposición al aire, y luego se someten a la etapa de trituración controlada.

A este respecto, la trituración puede tener lugar por sonicación o, preferiblemente, por agitación a baja velocidad. Las velocidades de agitación preferidas están comprendidas entre 3.000 y 5.000 rpm, más preferiblemente entre 3.000 y 3.500 rpm.

Quinientos mg de bacterias se suspenden en 20 ml de agua en un recipiente adecuado. La suspensión se hace enfriar sumergiendo el recipiente en un baño de hielo. Seguido de trituración, con 3 o 4 ciclos de uno o dos minutos. Entre un ciclo de trituración y otro, permitiendo que la suspensión se enfríe. Las paredes trituradas así obtenidas se recogen por centrifugación y las sales se eliminan por diálisis contra agua. El rendimiento final de las fracciones obtenidas está comprendido entre aproximadamente el 5 y el 15% del peso seco de las bacterias iniciales. El rendimiento máximo obtenible es igual al 20%.

Cabe señalar que la fracción parietal libre obtenida al final del proceso de la invención mantiene sustancialmente las propiedades inmunomoduladoras de la cepa bacteriana original sin cambios, al tiempo que garantiza las ventajas asociadas con el uso de una fracción bacteriana (en comparación con un microorganismo completo no tratado), tal como, por ejemplo, la ausencia de efectos secundarios, por ejemplo, la ausencia de un efecto pirogénico. Además, la fracción así obtenida puede usarse directamente por vía tópica sin la necesidad de funcionalizaciones adicionales o bioprotecciones (es decir, en forma libre), por ejemplo, modificaciones con quitosano o similares.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con una preparación farmacéutica que comprende la fracción parietal descrita anteriormente en una mezcla con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, preferiblemente para aplicación tópica. Ejemplos de preparaciones farmacéuticas de la invención son: ungüentos, pomadas, cremas, lociones, espumas y preferiblemente geles.

Ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables son emolientes, agentes gelificantes y similares, usados típicamente en el campo farmacéutico.

Ejemplos preferidos de excipientes usados en la preparación farmacéutica de la invención son el agente humectante ácido hialurónico y/o el agente formador de película/agente humectante policarbófilo.

A modo de ejemplo, la preparación farmacéutica en forma de gel de la invención se puede preparar mezclando una suspensión acuosa de la fracción de la invención como se describe anteriormente, con un agente gelificante adecuado, por ejemplo, seleccionado entre: pectina, goma arábiga, colapez, tragacanto, derivados de celulosa y similares.

Preferiblemente, la preparación farmacéutica de la invención contiene la fracción parietal en una cantidad de entre 0,001 y 0,01% p/p (entendido como el peso del ingrediente activo en relación con el peso total), preferiblemente entre 0,001% y 0,005% p/p.

La presente fracción parietal, o la composición farmacéutica asociada, es particularmente útil como agente inmunomodulador en el tratamiento de vulvovaginitis de origen fúngico (por ejemplo, causada por *Candida*) y/o de origen bacteriano, por ejemplo, causada por *Gardnerella*, en el tratamiento de infecciones virales causadas por HPV, herpes simple o zoster, o más en general, en el tratamiento tópico de alteraciones de la piel como dermatitis, queratosis actínica, infecciones y/o lesiones causadas por HPV, acné, quemaduras solares y similares. La presente fracción también es útil como agente antitumoral.

Se prefiere particularmente su uso en el tratamiento tópico de la vulvovaginitis fúngica y/o bacteriana o el tratamiento de la queratosis o infecciones actínicas y/o lesiones causadas por/asociadas con el HPV (virus del papiloma humano).

Gracias a su facilidad de uso y su persistencia local duradera, la acción inmunomoduladora de la presente fracción, o la composición farmacéutica asociada, es particularmente apreciable, junto con una acción de inhibición de síntomas

que ya es efectiva solo unos minutos después de la aplicación local, típicamente en reducir drásticamente la sensación de picazón.

5 La invención se describirá ahora en la siguiente parte experimental a modo de ilustración y por lo tanto, no a modo de limitación.

Parte experimental

Ejemplo 1

10 Proceso para preparar la fracción parietal inmunomoduladora de la invención, que se origina a partir de cepas de Propionibacterium acnes y granulosum (ATCC51277 o DSM20458).

15 Las bacterias Propionibacterium acnes y granulosum ATCC51277 o DSM20458 se cultivan en un fermentador bajo una anaerobiosis estricta en un medio adecuado y se recogen al final de la fase logarítmica de acuerdo con procedimientos conocidos. Luego se inactivan por calentamiento durante 1 hora a 60 °C o por tratamiento con formaldehído a una concentración final de 0,1%. Las bacterias muertas se lavan con agua y se someten a deslipidación en un aparato Soxhlet por suspensión de las bacterias en una mezcla de éter:etanol (1:1) durante aproximadamente 8 horas, y los tratamientos posteriores con cloroformo durante aproximadamente 8 horas y con una mezcla de cloroformo:metanol (2:1) durante aproximadamente 8 horas más.

20 Las bacterias secadas al aire se recogen y se resuspenden en agua, en proporciones de 500 mg de bacterias en 20 ml de agua. La suspensión se enfría con hielo y posteriormente se tritura con 3 o 4 ciclos Ultra-Turrax a una velocidad de entre 3.000 y 3.500 rpm.

25 Las paredes trituradas así obtenidas se recogen por centrifugación y las sales se eliminan por diálisis contra agua. El rendimiento final de las fracciones obtenidas es aproximadamente el 15% del peso seco de las bacterias iniciales.

Ejemplo 2 (comparativo)

30 Actividad de la fracción parietal de la invención obtenida de bacterias Propionibacterium granulosum de la cepa DSM2058 para estimular la fagocitosis y la destrucción en macrófagos J774 en comparación con la fracción parietal obtenida de bacterias Propionibacterium acnes de la cepa ATCC 11827 (fracción 7BVP), fracción 7BVP que complejada con quitosano y la fracción de la invención que forma complejos con quitosano.

35 El porcentaje de aumento en la actividad fagocítica de los macrófagos J774 de la fracción a la que se relaciona la patente se comparó con: la fracción de la patente que complejada con quitosano, la fracción 7BVP y la fracción 7BVP que forma complejos con quitosano, que tienen respectivamente el número 1,2,3,4 en la figura 1.

40 De la figura se puede deducir claramente que no solo la fracción en sí misma es altamente activa, sino que su formación de complejos con quitosano en realidad reduce su actividad. El comportamiento opuesto se observó para la fracción 3, cuya formación de complejos con quitosano (fracción 4) en contraste llevó a un aumento en la actividad.

45 El mismo comportamiento ocurre con respecto a la inducción de la producción de NO<sub>2</sub> por los macrófagos J774 después de la estimulación con diferentes fracciones parietales, como tales o complejadas con quitosano, como se muestra en la figura 2.

Ejemplo 3

50 Actividad inmunomoduladora de una composición farmacéutica de la invención (gel) en el tratamiento de la vulvovaginitis bacteriana o candidiasis

55 Después de la aplicación vulvovaginal tópica de un gel que contiene 0,001% p/p de la fracción parietal de la invención obtenida de Propionibacterium acnes y granulosum DSM20458 o ATCC51277, se observa una reducción inmediata en los síntomas asociados, como picazón y ardor. Estos síntomas desaparecen completamente después de aproximadamente 5 días de aplicaciones sucesivas. Se verificó además que la infección que inicialmente estaba presente desapareció después de aproximadamente 5-7 días de tratamiento.

60 También se verificó que la aplicación tópica del gel ejerce el mismo efecto sobre las infecciones por Candida que un tratamiento con 150 mg de fluconazol administrado por vía oral.

Se verificó además que los sujetos que no responden a 150 mg de fluconazol responden, en contraste, al tratamiento con el gel del ejemplo.

65 También se verificó que la aplicación tópica del gel ejerce el mismo efecto en las infecciones por Gardnerella que en el tratamiento con crema vaginal de Clindamicina al 2%.

Ejemplo 4

Actividad inmunomoduladora de una composición farmacéutica de la invención (gel) en el tratamiento del herpes simple o zoster.

5 Se encontró que un gel que contiene 0,001% de la fracción parietal de *Propionibacterium acnes* y *granulosum* de la cepa DSM20458 o ATCC51277 es eficaz en el tratamiento del herpes simple y el herpes zoster.

10 En ambos casos, su efectividad se verificó en términos de desaparición de los síntomas asociados, como picazón, dolor e inflamación, luego de la aplicación tópica del gel en las lesiones.

Ejemplo 5

Actividad inmunomoduladora de una composición farmacéutica de la invención (gel) en el tratamiento del acné juvenil.

15 Se encontró que un gel que contiene el 0,001% de la fracción parietal de la invención es eficaz en el tratamiento del acné juvenil. El tratamiento consiste en la aplicación diaria del gel sobre toda la cara. Una regresión importante de inflamación y comedones ocurrió después de aproximadamente una semana de tratamiento.

20 Ejemplo 6 (comparativo)

Efecto de la presente fracción parietal en la inhibición de los síntomas en comparación con una fracción obtenida de otra cepa bacteriana.

25 Se verificó que una preparación para uso tópico (gel) que contenía el 0,001% de la fracción parietal de la patente es activa para inhibir los síntomas asociados con las infecciones de candidiasis, como picazón y ardor, 5 minutos después de la aplicación. Este resultado no se obtuvo con una preparación que contiene el 0,001% de la fracción de 7BVP complejada con quitosano, que demuestra ser eficaz para inhibir los síntomas solo después del tercer día de tratamiento.

30 Ejemplo 7

35 Cuarenta sujetos fueron incluidos en el estudio. Siete de ellos no se sometieron al segundo examen por razones personales y no fueron encontrados durante el seguimiento. Los 33 sujetos restantes se sometieron a los exámenes previstos por el estudio. Los resultados reportados se refieren a los 33 sujetos que completaron el estudio.

40 En el segundo examen (2), ninguno de los 33 sujetos informó eventos adversos o intolerancia al tratamiento. Los 33 sujetos declararon que llevaron a cabo el tratamiento de acuerdo con las instrucciones recibidas e informaron la puntuación VAS diariamente durante el tratamiento y el producto no utilizado.

45 En base a un análisis del producto no utilizado, se calculó que los 33 sujetos habían llevado a cabo debidamente el tratamiento de acuerdo con las instrucciones recibidas. Una evaluación de cultivos a partir de frotis vaginales en el primer examen (1) mostró que, en 27 de los sujetos incluidos en el estudio, los gérmenes anaerobios característicos de la vulvovaginitis estaban presentes en las secreciones vaginales, mientras que en los 6 restantes el cultivo fue negativo. En todos los 33 casos, los síntomas vaginales y vulvares (picazón y ardor) disminuyeron significativamente en el transcurso del tratamiento y la reducción fue significativa a partir del tercer día de tratamiento (Tabla 1), sin ninguna diferencia significativa entre los sujetos que tuvieron un cultivo vaginal positivo (grupo A) o negativo (grupo B) en el primer examen (Tabla 2).

50 El eritema y la leucorrea vulvar también se redujeron significativamente en el segundo examen en comparación con el primer examen (Tabla 1) y no hubo diferencias entre el grupo con un frotis vaginal positivo (grupo A) o negativo (grupo B) en el primer examen (Tabla 2).

55 El grado de satisfacción fue alto ( $6 \pm 0,4$ ) (Tabla 1) y no fue significativamente diferente entre los sujetos con frotis vaginales positivos o negativos en el primer examen ( $5,8 \pm 0,4$  frente a  $5,7 \pm 0,30$ ;  $p > 0,05$ ).

60 En el segundo examen, el frotis vaginal fue negativo en 19 de los 27 sujetos que habían tenido un frotis vaginal positivo en el primer examen y continuó siendo negativo en los 6 sujetos que habían dado negativo anteriormente en el primer examen.

ES 2 717 119 T3

Tabla I

	Antes del tratamiento Examen 1	1er día de tratamiento	2do día de tratamiento	3er día de tratamiento	4to día de tratamiento	5to día de tratamiento	6to día Examen 2
Picazón vulvar (VAS)	7,3±0,5	7,0±0,5	6,5±0,5	5,4±0,7*	4,5±0,7*	3,3±0,5*	2,5±0,5*
Picazón vaginal (VAS)	7,3±0,4	7,1±0,4	6,6±0,5	5,3±0,7*	4,5±0,7*	3,3±0,5*	2,5±0,5*
Ardor Vulvar (VAS)	7,3±0,5	7,0±0,3	6,5±0,5	5,4±0,7*	4,5±0,7*	3,3±0,5*	2,5±0,5*
Ardor Vaginal (VAS)	7,2±0,4	7,0±0,3	6,6±0,5	5,4±10,7*	4,4±10,6*	3,3±10,6*	2,5±0,5*
Leucorrea (Puntuación de 1 a 4)	3,2±0,4	-	-	-	-	-	1,8±0,5*
Eritema (puntuación de 1 a 4)	3,1±0,3	-	-	-	-	-	1,6±0,6*
Satisfacción (puntaje de 1 a 6)							6,0±0,4

Tabla II

	Examen 1	Examen 2	NIVEL DE SIGNIFICACIÓN
Picazón vulvar (VAS)			
GRUPO A (27)	7,3±0,5	2,5±0,5*	p>0,05
GRUPO B (6)	7,3±0,5	2,3±0,5*	p>0,05
Picazón vaginal (VAS)			
GRUPO A (27)	7,2±0,4	2,5±0,5*	p>0,05
GRUPO B (6)	7,3±0,5	2,3±0,5*	p>0,05
Ardor Vulvar (VAS)			
GRUPO A (27)	7,3±0,4	2,5±0,5*	p>0,05
GRUPO B (6)	7,3±0,5	2,3±0,5*	p>0,05
Ardor Vaginal (VAS)			
GRUPO A (27)	7,2±0,4	2,5±0,5*	p>0,05
GRUPO B (6)	7,3±0,5	2,5±0,5*	p>0,05
Leucorrea (puntuación de 1 a 4)			
GRUPO A (27)	3,2±0,4	1,8±0,6*	p>0,05
GRUPO B (6)	3,1±0,4	1,5±0,5*	p>0,05
Eritema (puntuación de 1 a 4)			
GRUPO A (27)	3,2±0,4	1,6±0,6*	p>0,05
GRUPO B (6)	3,1±0,4	1,6±0,5*	p>0,05

Teniendo en cuenta los (6) sujetos con persistencia de un frotis negativo en el segundo examen más los (19) con un frotis negativo en el segundo examen, pero uno positivo en el primer examen (total de frotis negativos en el segundo examen: 25) (grupo D), frente a los (8) con la persistencia de un frotis positivo en el segundo examen (grupo C), los resultados obtenidos en los síntomas vulvovaginales se muestran en la Tabla 3.

5

Tabla III

	EXAMEN 1	EXAMEN 2	NIVEL DE SIGNIFICACIÓN
Picazón vulvar (VAS)			
GRUPO C (8)	7,3±0,5	2,2±0,4*	p>0,05
GRUPO D (25)	7,3±0,4	2,5±0,5*	p>0,05
Picazón vaginal (VAS)			
GRUPO C (8)	7,3±0,5	2,3±0,4*	p>0,05
GRUPO D (25)	7,2±0,4	2,5±0,5*	p>0,05
Ardor Vulvar (VAS)			
GRUPO C (8)	7,3±0,5	2,3±0,5*	p>0,05
GRUPO D (25)	7,2±0,4	2,5±0,5*	p>0,05
Ardor vaginal (VAS)			
GRUPO C (8)	7,3±0,5	2,3±0,5*	p>0,05
GRUPO D (25)	7,2±0,4	2,6±0,5*	p>0,05
Leucorrea (Puntuación de 1 a 4)			
GRUPO C (8)	3,3±0,4	1,9±0,4*	p>0,05
GRUPO D (25)	3,1±0,3	1,8±0,4*	p>0,05
Eritema (puntuación de 1 a 4)			
GRUPO C (8)	3,4±0,5	1,6±0,7*	p>0,05
GRUPO D (25)	3,1±0,3	1,6±0,5*	p>0,05

No se observaron diferencias significativas en la reducción de los síntomas vulvovaginales, leucorrea o eritema entre los dos grupos de sujetos (Tabla 3). El grado de satisfacción también fue alto y no difirió entre los dos grupos con resultados positivos o negativos para el frotis vaginal realizado en el segundo examen (5,6±0,5 frente a 5,8±0,4; p>0,05). En el grupo de sujetos tratados con crema de clindamicina al 2% (grupo control), se reclutaron 40 mujeres y se informó sobre la efectividad, tolerabilidad y satisfacción con el tratamiento a través de una entrevista telefónica. Los resultados, mostrados en la Tabla 4, resaltan una reducción en los síntomas con puntuaciones que no difieren de las de los sujetos tratados con la fracción de la presente invención.

10

15

Tabla IV

	Antes del tratamiento Examen 1	1er día de tratamiento	2do día de tratamiento	3er día de tratamiento	4to día de tratamiento	5to día de tratamiento	6to día de entrevista telefónica
Picazón vulvar (VAS)	7,4±0,6	7,0±0,6	6,8±0,4	5,8±0,7*	4,5±0,7*	3,8±0,5*	2,8±0,6*
Picazón vaginal (VAS)	7,3±0,8	7,1±0,7	6,8±0,6	6,0±0,8*	5,4±0,8*	3,6±0,6*	2,4±0,8*
Ardor Vulvar (VAS)	7,2±0,5	7,2±0,4	6,6±0,6	5,8±0,8*	4,3±0,8*	3,8±0,6*	2,6±0,6*

	Antes del tratamiento Examen 1	1er día de tratamiento	2do día de tratamiento	3er día de tratamiento	4to día de tratamiento	5to día de tratamiento	6to día de entrevista telefónica
Ardor vaginal (VAS)	7,2±0,4	7,1±0,4	6,8±0,6	5,7±0,7*	4,6±0,8*	3,6±0,7*	2,6±0,6*
Satisfacción (puntaje de 1 a 6)							5,5±0,9

Los resultados sugieren que la fracción parietal de la presente invención, cuando se administra localmente, es capaz de activar el sistema inmunitario a nivel local y, por lo tanto, es eficaz para antagonizar el crecimiento de microorganismos anaerobios responsables de la vulvovaginitis.

5 Con 5 días de tratamiento, la activación del sistema inmunitario a nivel de la mucosa sirvió para que el frotis vaginal fuera negativo para los gérmenes anaerobios en el 70% de los casos. Esto se asoció con una reducción significativa de los síntomas locales, que antes del tratamiento mostró una puntuación VAS de más de 7. El hecho de que no todos los sujetos informaron una desaparición total de los síntomas probablemente esté relacionado con la variabilidad individual; sin embargo, debe señalarse que en todos los sujetos tratados se calculó una reducción significativa de los síntomas subjetivos y objetivos. Esto resultó en un alto grado de satisfacción entre los sujetos tratados. Esto surgió no solo en sujetos en los que el frotis vaginal se volvió negativo, sino también en los sujetos restantes, en los que los síntomas disminuyeron significativamente.

15 Ejemplo 8

Diez pacientes ambulatorios femeninos y masculinos de edades comprendidas entre los 18 y los 55 años, con lesiones de HPV evaluadas mediante una prueba de HPV\_ADN, aplicaron la composición de la presente invención una vez al día sobre las lesiones durante 1 mes antes de someterse a la extirpación quirúrgica de las lesiones en sí.

20 Cinco pacientes tuvieron una regresión total de las lesiones dentro del mes de tratamiento y no se sometieron a un procedimiento de extirpación quirúrgica.

25 Tres pacientes tuvieron una regresión evidente de las lesiones y se trataron con extirpación quirúrgica para eliminar las lesiones residuales.

Dos pacientes no respondieron al tratamiento tópico y se trataron con extirpación quirúrgica.

30 Los resultados demostraron que la preparación es capaz de eliminar y/o favorecer una reducción en las lesiones causadas por el HPV.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una fracción parietal obtenida por deslipidación y trituración de la cepa de *Propionibacterium granulosum* DSM20458 en donde la deslipidación se realiza tratando bacterias inactivadas con una mezcla alcohólica durante 8-10 horas y la trituración se realiza por sonicación o preferiblemente por agitación a velocidades de entre 3.000 y 5.000 rpm.
- 10 2. Una composición farmacéutica que comprende la fracción de la reivindicación 1 y un portador o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
3. La composición farmacéutica que comprende la fracción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en una mezcla con ácido hialurónico y/o policarbófilo.
- 15 4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, formulada como ungüentos, pomadas, cremas, lociones, espumas y preferiblemente geles.
5. La fracción parietal o la composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones precedentes para uso en inmunomodulación y/o para reducir la picazón y/o ardor.
- 20 6. La fracción o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 5 en el tratamiento de vulvovaginitis fúngica o bacteriana.
7. La fracción o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 5 en el tratamiento de infecciones virales, preferiblemente causadas por herpes simple o zoster, o virus del papiloma humano.
- 25 8. La fracción o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 5 en el tratamiento de alteraciones de la piel, preferiblemente seleccionadas entre dermatosis, queratosis actínica, acné y quemaduras solares.
- 30 9. La fracción o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-8 para administración tópica.
- 35 10. Un proceso para preparar la fracción de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la deslipidación y la posterior trituración de la cepa de *Propionibacterium granulosum* DSM20458, en donde la deslipidación se realiza mediante el tratamiento de bacterias inactivadas con una mezcla alcohólica durante 8-10 horas y la trituración se realiza por sonicación o preferiblemente, por agitación a velocidades de entre 3.000 y 5.000 rpm.

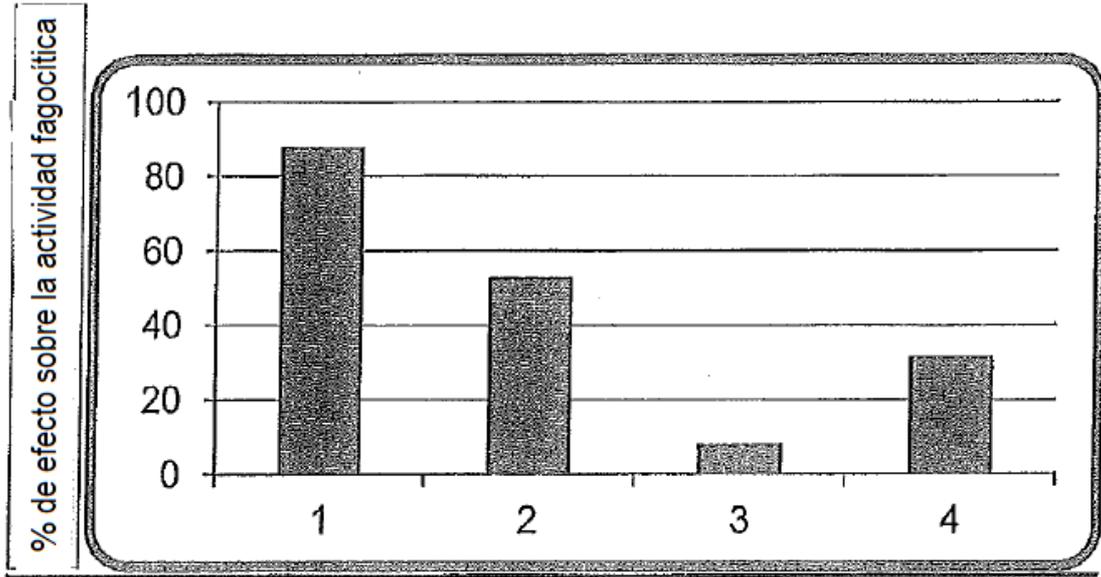


Fig. 1

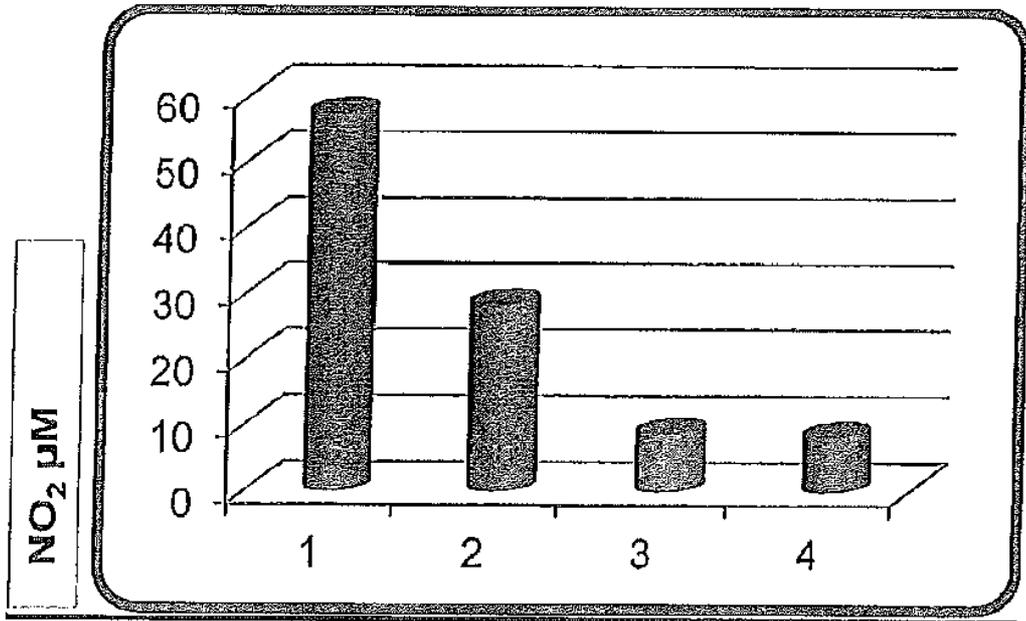


Fig. 2