

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 377**

51 Int. Cl.:

A61K 36/23	(2006.01)	A61K 31/728	(2006.01)
A61K 36/58	(2006.01)		
A61P 15/02	(2006.01)		
A61K 36/07	(2006.01)		
A61K 36/886	(2006.01)		
A61K 9/00	(2006.01)		
A61K 45/06	(2006.01)		
A61K 9/06	(2006.01)		
A61K 31/05	(2006.01)		
A61K 31/716	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2015 PCT/EP2015/055349**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15136096**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2015 E 15709691 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3116519**

54 Título: **Composiciones tóxicas que comprenden un extracto de Coriolus versicolor para aumentar la autoinmunidad**

30 Prioridad:

13.03.2014 EP 14159640

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.01.2020

73 Titular/es:

**PROCARE HEALTH IBERIA, S.L. (100.0%)
Passeig del Ferrocarril 339 2º 3ª
08860 Castelldefels, ES**

72 Inventor/es:

**LOSA DOMÍNGUEZ, FERNANDO;
PALACIOS, SANTIAGO y
GASLAIN, YANN**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

Observaciones:

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

ES 2 738 377 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

Composiciones tópicas que comprenden un extracto de *Coriolus versicolor* para aumentar la autoinmunidad

- 5 La presente invención se refiere al campo de los trastornos genitales, particularmente los trastornos ginecológicos causados por agentes infecciosos. La invención proporciona composiciones tópicas para su uso en la prevención y/o el tratamiento de tales trastornos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

Las infecciones ginecológicas son comunes en las mujeres de todas las edades. Infecciones ginecológicas normales incluyen la vulvovaginitis bacteriana, la infección vaginal por levaduras, la tricomoniasis, la vulvovaginitis inespecífica y la infección vírica. Las infecciones víricas son las más difíciles de tratar. En particular, la infección por el virus del papiloma humano (VPH), que puede causar cáncer cervical, es un motivo creciente de preocupación, particularmente

15

El cáncer cervical causado por infección por el VPH ha llegado a ser el segundo cáncer femenino más común en mujeres con edades entre 15 y 44 años en algunos países desarrollados. Más de 30 a 40 tipos de VPH se transmiten normalmente a través del contacto sexual e infectan la región anogenital. Sin embargo, la mayoría de los tipos de VPH

20

Los tipos de VPH 16 y 18 juntos causan aproximadamente el 70% de todos los cánceres de cuello uterino. No obstante, es importante señalar que la gran mayoría de las infecciones por VPH de alto riesgo son eliminadas por el sistema

25

Se cree que las lesiones por VPH provienen de la proliferación de queratinocitos basales infectados. La infección se produce normalmente cuando las células basales del huésped están expuestas a virus infecciosos a través de una barrera epitelial dañada como ocurriría durante la relación sexual o tras abrasiones cutáneas menores. Una vez que el virión del VPH invade una célula, se produce una infección activa, y el virus puede ser transmitido. Pueden pasar de varios meses a años hasta que las lesiones intraepiteliales escamosas (SIL) se desarrollan y pueden ser detectadas

35

La progresión de la infección subclínica a clínica puede llevar años; proporcionando oportunidades para la detección y el tratamiento de las lesiones precancerosas. La progresión hasta cáncer invasivo se puede prevenir cuando se detecta pronto la infección subclínica por VPH y se efectúan exámenes regulares. Para tal efecto, la exploración del cuello uterino usando una prueba de Papanicolaou (Pap) o una citología basada en líquidos se usa para detectar células anormales que pueden transformarse en cáncer. Si se encuentran células anormales, a las mujeres se les invita a someterse a una colposcopia. Durante la inspección colposcópica, se pueden tomar biopsias y se pueden eliminar áreas anómalas con un procedimiento sencillo, normalmente mediante cauterización eléctrica o, más

45

También se debe tener en cuenta que los resultados de la prueba de Pap con frecuencia no son concluyentes y, en tales casos, no se recomienda la intervención quirúrgica, ya que implica riesgos asociados y costes elevados. Una prueba de Pap no concluyente ocurre cuando se detectan células anormales del tipo CIN1, que indican una neoplasia intraepitelial cervical leve. Normalmente, cuando una biopsia detecta CIN1 la mujer tiene una infección por VPH que puede eliminar por sí misma en 12-24 meses, y por tanto, le sigue una prueba posterior más que un tratamiento. Las mujeres en esta situación no tienen forma de saber qué esperar y pueden no seguir una estrategia preventiva o terapéutica, lo que genera frecuentemente estrés psicológico y ansiedad. Solo se inicia una estrategia terapéutica o quirúrgica cuando un análisis posterior muestra una evolución maligna (normalmente cuando se detecta primero una neoplasia intraepitelial cervical tipo 2, CIN2).

50

55

60

Las vacunas contra el VPH (Cervarix y Gardasil), que previene la infección con los tipos de VPH (16 y 18) puede llevar a reducir adicionalmente la incidencia del cáncer cervical. Sin embargo, aunque estas vacunas preventivas cubren los dos tipos más comunes de VPH de alto riesgo, otros virus de alto riesgo que causan el resto del 30% de los casos de

cáncer cervical no están aún cubiertos. Además, puesto que el VPH es la enfermedad de transmisión sexual más común, una gran número de personas están ya infectadas y como tales no pueden beneficiarse de esta vacunación preventiva.

- 5 Teniendo en cuenta todo ello, sigue existiendo actualmente la necesidad de proporcionar estrategias alternativas para combatir la infección por VPH y el cáncer cervical, particularmente en las etapas tempranas de la infección por VPH.

SUMARIO DE LA INVENCION

- 10 Los presentes inventores han desarrollado una estrategia para combatir el VPH y otras infecciones ginecológicas. La presente estrategia implica potenciar la inmunidad local del sistema genital, particularmente la vagina y el cuello uterino, mediante la administración genital de una composición que comprende un extracto de *Coriolus versicolor*.

- 15 El extracto de *Coriolus versicolor* contiene dos beta-glucanos, el polisacárido K (PSK) y el polisacárido-péptido (PSP), que se han descrito como eficaces inmunopotenciadores (Kang SC *et al.*, *Int J Biol Macromol.* 2013, vol. 57, págs. 9-16; Cui J, *et al.*, *Biotechnol Adv.* 2003, vol. 21(2), págs. 109-22).

- Preparaciones orales que contienen dicho extracto son conocidas en la técnica y se han usado, particularmente en Japón, como coadyuvantes para quimioterapia y radioterapia de cánceres y diversas enfermedades infecciosas. Por ejemplo, los siguientes documentos describen composiciones que pueden incluir *C. versicolor* para el tratamiento de enfermedades infecciosas o cáncer: WO2011094579, US2009130138, EP2522356, KR20030082619, US2008124303, WO2006134409, WO2012046145, WO2004080474 y Takashi Kawana et al ("Treatment of recurrent genital herpes with PSK", *International Journal of Immunopharmacology* 1988, vol. 10, página 152). También se ha descrito la administración oral de *C. versicolor* para su uso en el tratamiento de lesiones causadas por el VPH (Mycology Research Laboratories: "Clinical trial results show proof of concept for use of coriolus versicolor as immunonutrition in HPV patients with cervical lesions (LSIL)", URL:<http://www.medicalnewstoday.com/releases/105573.php>). Sin embargo, el extracto de *C. versicolor* no se ha usado previamente para el tratamiento local de trastornos vaginales o cervicales causados por algunos agentes infecciosos, que incluyen la infección por VPH y el cáncer cervical. Los inventores han descubierto actualmente que la composición de la invención que comprende un extracto de *Coriolus versicolor* es particularmente eficaz para combatir infecciones vaginales o cervicales tales como la vaginitis y la infección por VPH cuando se administra directamente en la vagina y/o el cuello uterino.

- Así pues, un aspecto de la invención proporciona una composición tópica que comprende un extracto de *Coriolus versicolor* para su uso en la prevención y/o el tratamiento mediante administración vaginal o cervical de un trastorno vaginal o cervical que es causado por un agente infeccioso seleccionado del grupo que consiste en virus de papiloma humano (VPH), *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus*, *Bacteroides*, *Mycoplasma*, *Trichomonas vaginalis*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus alfa* y *S. epidermidis*. El término "agente infeccioso" se entiende como un microorganismo, en el más amplio sentido, tal como un virus, una bacteria, un prión, un hongo o un protozoo, que causa la enfermedad en el huésped. En la presente invención el término "agente infeccioso" y "patógeno" se usan indistintamente.

- La presente estrategia para combatir el VPH y otras infecciones vaginales o cervicales proporciona diversas ventajas. En primer lugar, mediante la administración de los componentes activos de *Coriolus versicolor* (particularmente el PSK y el PSP) directamente al sitio de acción, se consigue una potenciación local de la inmunidad. Debido a que la vagina y el cuello uterino son muy sensibles a las enfermedades infecciosas, la potenciación de la inmunidad en este entorno particular es altamente beneficiosa. La estimulación local de la inmunidad vaginal o cervical ayuda al cuerpo a combatir toda clase de infecciones vaginales o cervicales, desde la vaginitis inespecífica y la candidiasis hasta la infección por VPH. En segundo lugar, los efectos secundarios se pueden minimizar ya que los componentes activos de la composición se pueden ajustar más fácilmente para conseguir el efecto deseado, al mismo tiempo que se puede lograr una dosis-respuesta óptima. Asimismo, la administración por vía vaginal/cervical permite una fácil aplicación y evita la necesidad de proteger los compuestos activos de entornos hostiles tales como el tracto gastrointestinal.

- Otro aspecto de la presente invención proporciona una composición tópica para administración vaginal o cervical que comprende un extracto de *Coriolus versicolor*, extracto de *Azadirachta indica* y un beta-glucano adicional.

55 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- FIG. 1. Esquema de la carcinogénesis para el cáncer cervical. N representa el epitelio normal, no infectado. Una mujer se infecta con el VPH y desarrolla una lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL). Posiblemente, no se van a encontrar cambios en las células epiteliales durante los primeros meses de la infección. Finalmente, se puede observar una neoplasia intraepitelial cervical de grado 1 (CIN1). Tras un periodo de 12 a 24 meses el paciente puede desarrollar una lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL). Al principio, se puede observar una neoplasia intraepitelial cervical de grado 2 (CIN2). A lo largo de los años, esta lesión puede evolucionar a neoplasia intraepitelial cervical de

grado 3 (CIN3) y finalmente a carcinoma invasivo (C). Los porcentajes indican la cantidad estimada de pacientes para los que la infección por VPH alcanza estos estadios. La flecha marcada con "t" representa el tiempo creciente. La flecha marcada con "1" indica el estadio en el que se inicia las estrategias de prevención y exploración. La flecha marcada con "1" indica el estadio en el que se inicia el tratamiento de los pacientes afectados.

5 FIG. 2. Expresión de las citocinas en epitelio vaginal según se determinó mediante RT-qPCR en ratones tras administración vaginal del control, GEL 1 (extracto de *C. versicolor* al 0,05 %) o GEL 2 (extracto de *C. versicolor* al 0,25 %). A: TNF α , B: IL-1 β , C: IL-12, D: IL-6, E: IL-17. 1: control, 2: GEL 1 durante 10 días, 3: GEL 2 durante 6 días, 4: GEL 2 durante 10 días. El eje Y representa el aumento de las citocinas.

10 FIG. 3. Valor medio del VHI antes de la aplicación del PALOMA GEL (columna A) y 12 días después de la aplicación del PALOMA GEL (columna B).

15 FIG. 4. Imágenes de la colposcopia de 3 pacientes antes de la aplicación del PALOMA GEL (columna A) y 12 días después de la aplicación del PALOMA GEL (columna B).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 En la presente solicitud, el término "extracto" se usa en el sentido convencional para referirse a preparaciones concentradas de compuestos obtenidos mediante extracción de los constituyentes activos de la fuente, normalmente una fuente botánica, mediante medios adecuados. Dichos extractos contienen uno o más principios activos y se pueden incorporar a composiciones farmacéuticas o cosméticas en una variedad de formas, que incluyen un componente puro o semipuro, un extracto líquido o sólido, o una materia vegetal sólida.

25 Normalmente los extractos botánicos no contienen solo uno sino múltiples constituyentes, muchos de ellos activos. A veces, el efecto beneficioso se deriva de la combinación de muchos de estos compuestos activos. En otros casos, hay un particular compuesto que es el principal responsable de la mayor parte de la actividad.

30 El extracto, tal como se usa en el presente documento, incluye extractos "sintéticos", es decir, varias combinaciones de componentes y/o constituyentes conocidos que se combinan para imitar sustancialmente la composición y/o la actividad de un extracto botánico de origen natural. Los extractos sintéticos tendrán dos o más, tres o más, o cuatro o más principios activos en común con los de origen natural. Los extractos naturales o sintéticos que están enriquecidos con uno o varios componentes se consideran también parte de la presente invención.

35 El *Coriolus versicolor* (de ahora en adelante *C. versicolor*, también conocido como *Trametes versicolor*) es un hongo políporo perteneciente a la familia *Basidiomycotina* encontrado en todo el mundo. La forma visible del *C. versicolor* es un hongo con forma de abanico con bordes ondulados y zonas concéntricas coloreadas. El *C. versicolor* es un aerobio obligado que se encuentra normalmente todo el año sobre troncos muertos, tocones, troncos de árbol, y ramas.

40 Por "extracto de *Coriolus versicolor*" se entiende, tal y como se ha definido previamente, una preparación concentrada de compuestos obtenidos de *C. versicolor*. Los principales compuestos activos del *C. versicolor* son los beta-glucanos polisacaropéptido Krestin (PSK) y polisacaropéptido (PSP). Ambos compuestos se obtienen de la extracción del micelio de *C. versicolor*.

45 "Extracto de *Corioulus versicolor*", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a preparaciones que contienen constituyentes químicos biológicamente activos y/o compuestos aislados de *C. versicolor*, preferentemente el polisacaropéptido Krestin (PSK) y/o el polisacaropéptido (PSP). Esto incluye extractos completos de *C. versicolor* aunque también preparaciones puras o semipuras de los compuestos biológicamente activos mencionados obtenidos a partir de *C. versicolor*.

50 Extractos de *C. versicolor* que contienen compuestos biológicamente activos y preparaciones que contienen los compuestos purificados están disponibles en el mercado, por ejemplo, a través de la compañía SYMRISE. La mayoría de preparaciones comerciales de polisacaropéptidos usan solo los polímeros intracelulares recuperados del hongo o del micelio en cultivo sumergido. Una composición y un método de extracción normales para el extracto de *C. versicolor* se describen en Cui J *et al.* (*supra*).

60 El PSP y el PSK son polisacáridos beta-glucanos químicamente similares unidos a un número de proteínas (KF Cheng, *et al.*, *Cancer Therapy* 2008, vol. 6, págs. 117-130) y poseen perfiles de actividad fisiológica similares. Estos compuestos son conocidos por ser eficaces inmunopotenciadores e inhibidores de la proliferación del cáncer (Kang SC *et al.*, *supra*; Cui J, *et al.*, *supra*).

El término "beta-glucano" en su sentido más amplio se refiere a polisacáridos de monómeros de D-glucosa unidos mediante enlaces beta-glucosídicos. Los beta-glucanos son un grupo diverso de moléculas que pueden variar con

respecto a su peso molecular, solubilidad, viscosidad y configuración tridimensional. Se han descrito diversos beta-glucanos que tienen una variedad de actividades biológicas. En la presente invención, el término "beta-glucano" se entiende que se refiere a estos beta-glucanos biológicamente activos, particularmente a aquellos derivados de levaduras y hongos biológicos, que incluyen los polisacaropéptidos procedentes de *C. versicolor*. Se contemplan en la presente invención otros beta-glucanos biológicamente activos, por ejemplo, beta-glucanos procedentes de otros hongos tales como reishi, shiitake, Chaga y maitake, $\beta(1,3)$ D-glucano procedente de levadura de panadería, $\beta(1,3)(1,4)$ -glucanos procedentes de avena y cebada. También se contemplan derivados beta-glucanos, tales como el carboximetil beta-glucano. Se ha comunicado que estos beta-glucanos poseen propiedades inmunomoduladoras. También se han descrito betaglucanos carboxilados que tienen propiedades de curación de heridas. Una fuente conveniente de beta-glucanos es el producto NIO-GLUCAN® de la compañía Naturalis Life Technologies. El NIO-GLUCAN® contiene carboximetil beta-glucano, magnolol y honokiol encapsulados en vesículas niosomales.

El término "administración genital" tal y como se usa en el presente documento se refiere a la administración a los genitales externos o internos, particularmente la vulva, la vagina o el cuello uterino, aunque también el ano o el recto. En una realización particular, la administración genital es la administración vaginal o cervical. En otra realización particular, la administración genital es la administración rectal o anal.

Como se ha mencionado, un aspecto de la invención proporciona una composición tópica que comprende un extracto de *Coriolus versicolor* para su uso en la prevención y/o el tratamiento, mediante administración vaginal o cervical, de un trastorno vaginal o cervical que es causado por un agente infeccioso seleccionado del grupo que consiste en virus de papiloma humano (VPH), *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus*, *Bacteroides*, *Mycoplasma*, *Trichomonas vaginalis*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus alfa* y *S. epidermidis*.

En una realización preferida, la prevención y/o el tratamiento comprende potenciar la inmunidad vaginal o cervical frente a agentes infecciosos.

Se considera parte de la invención el proporcionar una composición tópica que comprende un extracto de *Coriolus versicolor* para su uso mediante administración vaginal o cervical en la potenciación de la inmunidad genital frente a agentes infecciosos seleccionados del grupo que consiste en virus de papiloma humano (VPH), *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus*, *Bacteroides*, *Mycoplasma*, *Trichomonas vaginalis*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus alfa* y *S. epidermidis*.

La composición tópica para administración vaginal o cervical de la descripción comprende un extracto de *Coriolus versicolor*. Las composiciones de la descripción pueden incorporar adicionalmente otros principios activos que refuercen los efectos beneficiosos del extracto de *C. versicolor* estimulando la inmunidad, reduciendo la inflamación, favoreciendo una flora vaginal beneficiosa, reparando la barrera epitelial dañada o bien combatiendo agentes infecciosos indeseados. En este sentido, los inventores han descubierto que se producen interacciones sinérgicas entre el extracto de *C. versicolor* y el compuesto activo seleccionado del grupo que consiste en un agente humectante, un prebiótico, un agente antiinflamatorio, un agente regenerador de tejidos y un agente antivírico. Por tanto, la composición tópica de acuerdo con la descripción, además del extracto de *C. versicolor*, comprende adicionalmente al menos un compuesto activo seleccionado del grupo que consiste en un agente humectante, un prebiótico, un agente regenerador de tejidos, un agente antiinflamatorio y un agente antivírico.

Los extractos de *C. versicolor* estimulan las respuestas inmunes protectoras mientras suprimen respuestas inmunes indeseadas que causan enfermedades. Por ejemplo, los extractos de *C. versicolor* pueden restablecer o mejorar la función del sistema inmune deprimido, que es causado, por ejemplo, por la administración de agentes anticancerosos. Los extractos de *C. versicolor* pueden estimular respuestas inmunes protectoras que defienden frente a una infección vírica, bacteriana y/o microbiana. Además, los extractos de *C. versicolor* pueden suprimir respuestas inmunes indeseadas, tales como la producción de TNF- α y su inducción de la producción de metaloproteinasas, que son usadas por ciertas células tumorales para promover la metástasis.

Cuando se administra directamente en el área genital, particularmente a la vulva, la vagina o el cuello uterino, la composición tópica descrita estimula la respuesta inmune local para combatir patógenos normales que pueden estar presentes en este área, tales como el virus del papiloma humano (VPH), *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus*, *Bacteroides*, *Mycoplasma*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Herpes virus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus alfa*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella*, *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* y dermatofitos. Estos patógenos son responsables de una serie de trastornos que incluyen, de un modo no limitante, vaginitis, vulvovaginitis, dermatofitosis, candidiasis, herpes genital, gonorrea, proctitis, infertilidad, cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica, embarazo ectópico, dolor pélvico agudo o crónico, tricomoniasis y cáncer cervical. Por tanto, la composición tópica descrita para administración vaginal o cervical de la invención es para su uso en la prevención y/o el tratamiento de cualquiera de los trastornos anteriores.

En otra realización particular, el trastorno vaginal o cervical que se va a prevenir o tratar mediante la composición de la invención es la vaginitis bacteriana. "Vaginitis" se refiere a una inflamación de la vagina debida normalmente a una infección que puede dar como resultado secreción, prurito y dolor, y que va asociada frecuentemente a una irritación o infección de la vulva. En este último caso, el trastorno se denomina "vulvovaginitis".

5

Son conocidos diversos tipos de vaginitis que afectan comúnmente a las mujeres, entre ellos la vaginitis bacteriana, la vaginitis micótica, la tricomoniasis, la vaginitis inespecífica y la vaginitis vírica.

10 La vaginitis micótica es causada por una infección fúngica, normalmente por sobrecrecimiento de las levaduras del género *Cándida*, aunque también puede ser causada por una infección por dermatofitos. Es causada más comúnmente por un tipo de hongo denominado *Candida albicans*. La especie de hongo *Candida* se encuentra de forma natural en la vagina, y generalmente es inocua. Sin embargo, si las condiciones de la vagina cambian, la *Candida albicans* puede causar los síntomas de la candidiasis vaginal.

15 La tricomoniasis, denominada a veces "trico", es otra causa común de vaginitis. Es una enfermedad de transmisión sexual, y es causada por el parásito protozoario unicelular *Trichomonas vaginalis* que produce un estrés mecánico en las células huésped e ingiere después los fragmentos celulares tras la muerte de la célula. Los síntomas incluyen inflamación del cuello uterino (cervicitis), la uretra (uretritis) y la vagina (vaginitis) que produce una sensación de quemazón o prurito.

20 La vaginitis inespecífica es una enfermedad de la vagina que es causada por un desequilibrio de la flora bacteriana de origen natural. Los microorganismos implicados en la vaginitis bacteriana son muy diversos, aunque incluyen *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus*, *Bacteroides*, y *Mycoplasma*. Un cambio de la flora bacteriana normal incluye la disminución de los *Lactobacilli*, que puede ser debida al uso de antibióticos, cambios hormonales o un desequilibrio del pH, lo que permite que tal bacteria nociva se establezca y se multiplique. Este tipo de vaginitis es extremadamente
25 común, particularmente entre mujeres en edad fértil.

Los virus son también una causa común de la vaginitis. Una forma causada por el virus del herpes simple (VHS) se denomina con frecuencia infección por "herpes". Estas infecciones también se propagan por contacto sexual. Los síntomas primarios de la vaginitis por herpes es el dolor asociado a lesiones o "úlceras". Estas úlceras normalmente
30 son visibles sobre la vulva o la vagina aunque ocasionalmente se encuentran dentro de la vagina y solo pueden verse durante un examen ginecológico.

Otra fuente de infección vaginal vírica es el virus del papiloma humano (VPH). El VPH, denominado con frecuencia verrugas genitales, también puede ser transmitido por relación sexual. El virus puede causar verrugas dolorosas que
35 crecen en la vagina, el recto, la vulva o la ingle.

Como se ha explicado anteriormente, la infección persistente por VPH puede causar también cáncer cervical. En una realización preferida, la composición tópica de la invención es para la potenciación de la inmunidad vaginal o cervical frente al VPH. En otra realización preferida, la composición tópica de la invención es para la prevención y/o el
40 tratamiento del cáncer cervical.

En particular, la composición de la invención es beneficiosa para la prevención de la infección persistente por VPH, proporcionando de este modo una estrategia eficaz para combatir el cáncer cervical en un estadio temprano cuando no hay disponible ninguna otra estrategia terapéutica.
45

Como se ha mencionado anteriormente, la intervención terapéutica hasta la fecha tiene lugar en el estadio en el que se detecta la HSIL (lesión intraepitelial escamosa de alto grado). Los pacientes que muestran no más de la LSIL (lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, coincidente con células del tipo CIN1) se dejan sin tratar durante un tiempo que varía de 12 a 24 meses, hasta que se repiten las pruebas y se confirma el HSIL (véase la FIG. 1). La composición de
50 la invención es particularmente útil para pacientes que muestran pruebas LSIL/CIN1 positivas que actualmente no reciben tratamiento. La composición de la invención se puede administrar en este estadio y proporciona beneficios en términos de ayudar al cuerpo a eliminar la infección por VPH aumentando localmente la inmunidad y evitando la infección persistente por VPH, así como en términos de curar las lesiones LSIL/CIN1 mencionadas potenciando la reepitelización del área afectada. Por tanto, en una realización particular, la composición tópica de la invención es para
55 la administración vaginal o cervical a mujeres que muestran lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL) o neoplasia intraepitelial cervical leve (CIN1). Esta realización se puede formular como un método para la prevención o el tratamiento de una infección por VPH o del cáncer cervical mediante administración vaginal o cervical de la composición de la invención en una mujer que muestra LSIL o CIN1.

60 La eliminación eficaz de la infección por VPH en este estadio se conoce comúnmente como "negativización". Así, una realización de la invención se dirige a la composición tópica de la invención para su uso en la negativización del VPH en mujeres positivas que muestran LSIL o CIN1 mediante administración vaginal o cervical. Esta realización se puede

formular también como un método para la la negativización del VPH en mujeres positivas que muestran LSIL o CIN1 mediante administración vaginal o cervical de la composición de la invención.

5 En otra realización particular, la composición de la invención es para su uso en el curado de las lesiones epiteliales vaginales causadas por un agente infeccioso, en particular lesiones LSIL o CIN1 causadas por el VPH. En otras palabras, la composición de la invención es útil para la reepitelización del tejido vaginal dañado como consecuencia del agente infeccioso, en particular, para la reepitelización de lesiones LSIL o CIN1 causadas por el VPH.

10 Independientemente de lo anterior, la composición de la invención se puede usar en otros estadios patológicos. Por ejemplo, la composición de la invención se puede administrar por vía vaginal o cervical a mujeres con estadios de lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (VPH o bien CIN1) para prevenir la infección persistente por VPH y/o la reepitelización de lesiones vaginales. La composición de la invención se puede usar también como terapia adyuvante para el tratamiento de mujeres con HSIL o carcinoma.

15 Un régimen de tratamiento normal para pacientes que sufren una infección por VPH comprende de 21 a 75 aplicaciones de la composición de la invención durante seis meses. Así, en una realización particular, la composición tópica para administración vaginal o cervical es para su uso en el tratamiento de la infección por VPH, donde el régimen de tratamiento comprende de 21 a 75 aplicaciones de la composición tópica durante 6 meses. Un régimen de tratamiento normal para pacientes que sufren otras infecciones genitales, particularmente infecciones genitales recurrentes, comprende de 7 a 21 aplicaciones de la composición de la invención durante seis meses.

25 La presente descripción describe una composición tópica para administración vaginal o cervical que comprende un extracto de *Coriolus versicolor*. La composición tópica descrita puede comprender un agente humectante. El término "agente humectante", denominado también "emoliente", se usa en el presente documento en su sentido general en la técnica de la farmacia y la cosmética como un compuesto que incrementa o mantiene la hidratación de la piel o las mucosas. preferentemente, el agente humectante es ácido hialurónico.

30 El ácido hialurónico (HA, denominado también hialuronano o hialuronato, N.º CAS: 9004-61-9) es un glucosaminoglucano aniónico, no sulfatado distribuido ampliamente a través de los tejidos conectivo, epitelial y nervioso. El HA es un polímero de disacáridos, compuestos ellos mismos por ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina, unidos mediante enlaces glucosídicos β -1,4 y β -1,3 alternantes. La presencia de HA en el tejido epitelial se ha demostrado que promueve la proliferación de queratinocitos y aumenta la presencia de ácido retinoico, produciendo la hidratación de la piel. La interacción del ácido hialurónico con CD44 lleva a la síntesis de colágeno y a la función cutánea normal. El ácido hialurónico, presente en la matriz extracelular de los queratinocitos basales, es crítico para la integridad estructural de la matriz de colágeno cutánea. Estos beneficios hacen del ácido hialurónico un humectante tópico muy eficaz. Además, se ha descrito que el HA puede tener beneficios en la reparación de heridas. Las actividades de humectación y reparación de heridas del HA es muy conveniente cuando se combinan con la actividad inmunopotenciadora del extracto de *C. versicolor* en la composición de la invención para combatir la infección persistente por VPH y también otras infecciones que causan, por ejemplo, vaginitis. El HA está disponible en el mercado a partir de múltiples fuentes.

45 La composición tópica descrita puede comprender también un prebiótico. El término "prebiótico" se usa en el presente documento en su sentido general del estado de la técnica como ingredientes alimentarios no digeribles que estimulan el crecimiento y/o la actividad de las bacterias colonizadoras en animales. Esta definición no enfatiza un grupo específico de bacterias que ha de ser la diana del prebiótico. Por lo general, sin embargo, se asume que un prebiótico debe aumentar el número y/o la actividad de las bifidobacterias y las bacterias del ácido láctico, las cuales tienen diversos efectos benéficos en el huésped, especialmente en términos de mantener un equilibrio de la microflora ponderado y la eficacia y la fuerza intrínseca del sistema inmune.

50 Preferentemente, el prebiótico que está presente en la composición de la invención es BioEcolia®. BioEcolia® es un oligosacárido alfa-glucano obtenido mediante síntesis enzimática de azúcares naturales (sacarosa y maltosa). Gracias a la especificidad de sus enlaces glucosídicos, BioEcolia® es un sustrato bioselectivo para la flora microbiana beneficiosa favoreciendo el desarrollo de la flora saprofita de la piel en detrimento de la flora oportunista indeseable, patógena o no. Este prebiótico está disponible en el mercado, por ejemplo, a través de la compañía Solavia. Prebióticos adicionales no limitantes que se contemplan para su uso en la composición de la invención son fructooligosacáridos, galactooligosacáridos e inulina.

60 La composición tópica descrita puede comprender adicionalmente un agente regenerador de tejidos. Por "agente regenerador de tejidos" se entiende un compuesto que puede promover la renovación, el restablecimiento y/o el crecimiento de tejidos corporales, particularmente tejidos corporales dañados. Este término incluye, de un modo no limitante, compuestos que potencian la curación de heridas ("agentes de curación de heridas"), la cicatrización ("agentes cicatrizantes") y compuestos que potencian la angiogénesis ("agentes angiogénicos").

Preferentemente, el agente regenerador de tejidos es un extracto de *Centella asiatica*. La *Centella asiatica* (conocida también como gotu kola y ombligo de Venus indio) es una planta rastrera perenne que crece alrededor del océano Índico. Usada tradicionalmente en el tratamiento de afecciones dermatológicas en su área nativa, se usa para ayudar a la curación más rápida de heridas pequeñas, arañazos y quemaduras superficiales, al igual que como antiinflamatorio para eccemas, prurito menor y picaduras de insectos. La actividad regeneradora de tejidos de la *Centella asiatica* es de particular relevancia para reparar la barrera epitelial dañada (heridas mayores y/o microabrasiones) en la vagina y/o el cuello uterino de modo que evita o combate la infección persistente por un virus, por ejemplo el VPH. En este sentido, la combinación de un agente regenerador de tejidos, tal como un extracto de *Centella Asiatica*, con *Coriolus versicolor* y, opcionalmente, otros principios activos, es particularmente eficaz. Por tanto, también se describe una composición que comprende un extracto de *Coriolus versicolor* y un extracto de *Centella Asiatica*, para su uso en la reparación de la barrera epitelial vaginal o cervical dañada mediante administración vaginal o cervical. Otra realización particular proporciona una composición que comprende un extracto de *Coriolus versicolor* y un extracto de *Centella Asiatica* para su uso en la prevención y/o la eliminación, mediante administración vaginal o cervical, de una infección persistente vaginal y/o cervical que es causada por un agente infeccioso tal y como se ha definido anteriormente, en particular una infección persistente por VPH.

"Extracto de *Centella Asiatica*" se refiere a un extracto obtenido de *Centella Asiatica* que contiene una alta concentración de compuestos biológicamente activos, particularmente triterpenoides pentacíclicos. Los triterpenoides contenidos en estos extractos son ácido asiático, ácido madecásico y asiaticósido. "Extracto de *Centella Asiatica*" tal y como se usa en el presente documento incluye cualquiera de los extractos disponibles de *Centella asiatica*, así como preparaciones purificadas o semipurificadas de compuestos biológicamente activos procedentes de *Centella asiatica* o un compuesto biológicamente activo particular obtenido de *Centella asiatica*.

Se han publicado estudios clínicos que describen el uso de los siguientes extractos de *Centella Asiatica*: TTFCA, TECA y, en los que se menciona el nombre del extracto comercial Madecassol® (extracto titulado de *Centella Asiatica*) o se® (fracción de triterpenoides totales de *Centella Asiatica*) (EMA/HMPC/291177/200, 2010. "Assessment report on *Centella asiatica* (L.) Urban, herba"). Los estudios han demostrado que los principales constituyentes de la *Centella Asiatica* aumentan la síntesis de colágeno favoreciendo la reparación de tejidos y la angiogénesis.

La composición tópica descrita puede comprender adicionalmente un agente antivírico. "Agente antivírico" se entiende en su acepción general como un compuesto que puede destruir o inhibir el desarrollo de los virus.

Preferentemente, el agente antivírico es un extracto de *Azadirachta indica*. La "*Azadirachta indica*", conocida también como Neem, Nimtree, y lila india es un árbol de la familia Meliaceae de la caoba.

Varias preparaciones de neem obtenidas de sus diferentes partes se ha descubierto que ejercen actividad antibacteriana, antivírica, antimalárica, antioxidante, antifúngica, antimutágena, anticarcinógena, anticonceptiva y antiulcerosa. Los informes previos han documentado que extractos de neem inhibían significativamente el virus de la polio, el VIH, el grupo de virus de Coxsackie B, y el virus del dengue en una etapa temprana de la replicación del genoma vírico (Tiwari V, *et al. Phytother Res.* 2010, vol. 24(8), págs. 1132–1140).

Los principales componentes químicos son nimbina, nimbineno, azadiractina, azadiractol, azadiracnol, desacetinimbineno, nimbandiol, nimbolida, quercetina, beta-sisterol, n-hexacosanol, nimbiol y nimocina. "Extracto de *Azadirachta indica*", tal y como se usa en el presente documento, incluye cualquiera de los extractos disponibles de *Azadirachta indica*, así como preparaciones purificadas o semipurificadas de compuestos biológicamente activos de *Azadirachta indica* o un compuesto biológicamente activo particular obtenido de *Azadirachta indica*. Estos extractos están disponibles en el mercado (por ejemplo, se pueden obtener a través de la compañía Symrise).

La composición tópica descrita puede comprender adicionalmente un agente antiinflamatorio. "Agente antiinflamatorio" se entiende en su acepción general como un compuesto que reduce la inflamación. Preferentemente, la composición de la invención comprende agentes antiinflamatorios derivados de fuentes naturales. En una realización particular, el agente antiinflamatorio se obtiene del árbol de la magnolia. En una realización preferida, el agente antiinflamatorio es magnolol, honokiol o mezclas de los mismos. El magnolol (4-alil-2-(5-alil-2-hidroxi-fenol)fenol) y el honokiol (2-(4-hidroxi-3-prop-2-enil-fenil)-4-prop-2-enil-fenol) son lignanos derivados del árbol de la magnolia que se han descrito como inhibidores del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB) y también como reguladores negativos de la producción de importantes mediadores inflamatorios como la interleucina-8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa).

La descripción contempla una composición tópica que comprende, además del extracto de *C. versicolor*, un agente humectante, un prebiótico, un agente antiinflamatorio, un agente regenerador de tejidos y, opcionalmente, un agente antivírico y/o un agente antiinflamatorio. En una realización particular, la composición de la invención comprende, además del extracto de *C. versicolor*, ácido hialurónico, bio-Ecolia® y extracto de *Centella Asiatica*. En otra realización particular, la composición de la invención comprende, además del extracto de *C. versicolor*, ácido hialurónico, bio-

Ecolia®, extracto de *Centella Asiatica* y extracto de *Azadirachta indica*. Por ejemplo, la composición comprende, además del extracto de *C. versicolor*, ácido hialurónico, bio-Ecolia®, extracto de *Centella Asiatica*, extracto de *Azadirachta indica*, magnolol y honokiol. Por ejemplo, la composición puede comprender adicionalmente carboximetil beta-glucano.

5 En determinadas realizaciones la composición de la invención comprende un extracto de *C. versicolor*, extracto de *Azadirachta indica* y un beta-glucano adicional (diferente de los beta-glucanos PSP y PSK contenidos en el extracto de *C. versicolor*). El beta-glucano adicional se puede seleccionar entre beta-glucano carboxilado, $\beta(1,3)$ D-glucano y $\beta(1,3)(1,4)$ -glucanos procedentes de diversas fuentes naturales. En una realización particular, el beta-glucano
10 adicional es carboximetil beta-glucano. En algunas realizaciones, la composición comprende un extracto de *C. versicolor*, un extracto de *Azadirachta indica*, un beta-glucano adicional (tal como carboximetil beta-glucano) y al menos un principio activo adicional seleccionado entre un agente humectante, un prebiótico, un agente antiinflamatorio, un agente regenerador de tejidos y *áloe vera*. En algunas realizaciones, la composición comprende un extracto de *C. versicolor*, un extracto de *Azadirachta indica*, un beta-glucano adicional (tal como carboximetil beta-
15 glucano) y al menos un principio activo adicional seleccionado entre ácido hialurónico, oligosacárido alfa-glucano, magnolol, honokiol, extracto de *Centella asiatica* y *áloe vera*. En una realización particular, la composición de la invención comprende un extracto de *C. versicolor*, un extracto de hojas de *Azadirachta*, carboximetil beta-glucano, magnolol y honokiol. En una realización muy particular, la composición de la invención comprende un extracto de *C. versicolor*, un extracto de hojas de *Azadirachta*, carboximetil beta-glucano, ácido hialurónico, oligosacárido alfa-
20 glucano, magnolol, honokiol, extracto de *Centella asiatica* y *áloe vera*. La combinación sinérgica de compuestos en estas composiciones determina que sean particularmente eficaces para su uso en el tratamiento y/o la prevención de trastornos genitales causados por agentes infecciosos, particularmente frente a la vaginitis y trastornos causados por la infección por VPH, tal como el cáncer cervical. En una realización particular, las composiciones tal y como se definen anteriormente son para su uso en la reparación de la barrera epitelial vaginal o cervical dañada mediante
25 administración vaginal o cervical. Otra realización particular proporciona una composición tal y como se define anteriormente para su uso en la curación de lesiones vaginales causadas por un agente infeccioso, en particular lesiones LSIL o CIN1 causadas por el VPH, mediante administración vaginal o cervical. Otra realización particular proporciona una composición tal y como se define anteriormente para su uso en la prevención y/o la eliminación, mediante administración vaginal o cervical, de una infección persistente vaginal y/o cervical que es causada por un
30 agente infeccioso, en particular una infección persistente por VPH.

Otros componentes que se pueden incorporar en las composiciones de la invención, además del extracto de *C. versicolor*, son un extracto de hojas de té verde (o cualquiera de sus bien conocidos compuestos biológicamente activos), un extracto de *Melaleuca alternifolia* (o cualquiera de sus bien conocidos compuestos biológicamente activos)
35 y *áloe vera*.

La presente descripción describe composiciones tópicas que comprenden una cantidad eficaz del extracto de *C. versicolor* y/o una cantidad eficaz de constituyentes químicos biológicamente activos y/o compuestos aislados de *C. versicolor*, preferentemente polisacaropéptidos PSK y/o PSP. La presente descripción también contempla que las
40 composiciones tópicas contienen también una cantidad eficaz de al menos uno de los principios activos adicionales descritos anteriormente (un agente humectante, un prebiótico, un agente antiinflamatorio, un agente regenerador de tejidos, y un agente antivírico). El término "cantidad eficaz", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un compuesto que, cuando se administra, es suficiente para prevenir el desarrollo del trastorno al que va dirigido, o para tratar o aliviar en cierto grado el mismo, el cual en la presente invención es un trastorno genital
45 causado por un agente infeccioso. En el sentido de la presente invención, una "cantidad eficaz" se entiende también como la cantidad de compuesto que es suficiente para la potenciación de la inmunidad genital. Por ejemplo, la cantidad eficaz de extracto de *C. versicolor* en la composición puede estar comprendida entre un 0,005 y un 5 %, o entre un 0,01 y un 1 %, o entre un 0,01 y un 0,5 %, por ejemplo un 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 %. La cantidad eficaz de agente vírico, tal como un extracto de *Azadirachta* en la composición puede estar
50 comprendida entre un 0,001 y un 5 %, o entre un 0,005 y un 1 %, o entre un 0,005 y un 0,1 %, por ejemplo un 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08 o 0,09 %. La cantidad eficaz del beta-glucano adicional, tal como carboximetil beta-glucano, en la composición puede estar comprendida entre un 0,01 y un 10 %, o entre un 0,025 y un 1 %, o entre un 0,05 y un 0,5 %, por ejemplo un 0,08, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 %. La cantidad eficaz de prebiótico, tal como oligosacárido alfa-glucano, en la composición puede estar comprendida entre un 0,01 y
55 un 10 %, o entre un 0,05 y un 5 %, o entre un 0,1 y un 1 %, por ejemplo un 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 o 0,9 %. La cantidad de agente humectante, tal como ácido hialurónico, en la composición puede estar comprendida entre un 0,01 y un 10 %, o entre un 0,05 y un 5 %, o entre un 0,1 y un 1 %, por ejemplo un 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 o 0,9 %. La cantidad eficaz de agentes antiinflamatorios, tal como magnolol y/o honokiol, en la composición puede estar comprendida entre un 0,005 y un 5 %, o entre un 0,01 y un 2 %, o entre un 0,05 y un 1 %, por ejemplo un 0,06, 0,07,
60 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 o 0,9 %. La cantidad eficaz de agente regenerador de tejidos, tal como compuestos derivados de un extracto de *Centella Asiatica*, en particular asiaticósido, ácido madecásico y/o ácido asiático, en la composición puede estar comprendida entre un 0,001 y un 5 %, o entre un 0,005 y un 1 %, o entre un 0,005 y un 0,1 %, por ejemplo, un 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08 o 0,09 %.

La composición puede comprender áloe vera en una cantidad comprendida entre un 0,1 y un 10 %, o entre un 0,5 y un 5 %, por ejemplo, un 0,8, 1, 1,5, 2, 3 o 4 %.

La dosis particular del compuesto administrado de acuerdo con la presente invención será determinada, por supuesto, en función de las circunstancias particulares que rodean al caso, incluyendo el compuesto administrado, la eficacia de encapsulación, la vía de administración, y consideraciones similares.

Preferentemente, la presente descripción contempla que la composición contiene excipientes y/o vehículos apropiados para administración tópica, que pueden ser excipientes y vehículos farmacéuticos o cosméticos tópicamente aceptables generalmente bien conocidos en el estado de la técnica. Por "tópicamente aceptables", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuados para su uso en contacto con la piel y/o membranas mucosas de animales no humanos y/o humanos sin una toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad y respuesta alérgica indebidas, entre otras. Cada vehículo, excipiente, etc. "tópicamente aceptable" debe ser también "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Tales excipientes y vehículos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, agentes para reparar la función barrera cutánea, agentes hidratantes, emolientes, emulsionantes, espesantes, humectantes, agentes reguladores del pH, antioxidantes, agentes conservantes, vehículos o mezclas de los mismos. Los excipientes y/o vehículos usados tienen afinidad por la piel o el moco, son bien tolerados, estables, y se usan en una cantidad adecuada para proporcionar la consistencia deseada, y una fácil aplicación. Adicionalmente, las composiciones descritas pueden contener otros ingredientes, tales como fragancias, colorantes, y otros componentes conocidos en el estado de la técnica para su uso en formulaciones tópicas.

La presente descripción contempla que las composiciones tópicas pueden ser adecuadas para productos farmacéuticos. Dichas composiciones tópicas se pueden adaptar para aplicar a la piel y la mucosa en forma de: una dispersión vesicular no iónica, emulsión, crema, loción, gel, aerosol, crema-gel, gel-crema, suspensión, dispersión, polvo, barra sólida, toallita, emplasto, espuma, pulverización, aceite, ungüento, fluido, jabón, compresa higiénica, óvulo, pesario tampón, supositorio vaginal, u otra forma que es conocida en la técnica de la cosmética y la farmacia. En particular, la descripción contempla que la composición se formula en forma de gel que se administra vaginal o cervicalmente mediante una cánula.

Preferentemente, la presente descripción contempla que la composición tópica es para administración genital, particularmente a la vulva, la vagina, el cuello uterino, el ano o el recto. Preferentemente, la presente descripción se refiere a una composición tópica que comprende un extracto de *C. versicolor* que es para administración vaginal o cervical. Otra realización preferida proporciona una composición tópica para administración vaginal o cervical que comprende un extracto de *C. versicolor* y al menos un compuesto activo seleccionado del grupo que consiste en un agente humectante, un prebiótico, un agente antiinflamatorio, un agente regenerador de tejidos, y un agente antivírico. Dichas composiciones contienen adicionalmente excipientes y/o vehículos que son aceptables para administración vaginal o cervical. Dichas composiciones tópicas preferidas se pueden administrar en forma de un gel, una loción, un jabón, una crema, una espuma, una compresa higiénica, una toallita, un óvulo, un pesario o un tampón.

Se pueden preparar formulaciones tópicas, que incluyen vaginales o cervicales, de acuerdo con métodos bien conocidos en el estado de la técnica. Los vehículos apropiados, y las cantidades de los mismos, pueden ser determinados fácilmente por los expertos en la materia de acuerdo con el tipo de formulación que se va a preparar. Un ejemplo de composición tópica para administración vaginal o cervical de acuerdo con la invención puede contener: agua, zumo de hojas de *Aloe barbadensis*, glicerina, propanodiol, hidroxietilcelulosa, ácido hialurónico hidrolizado, carboximetil betaglucano sódico, oligosacárido alfa-glucano, extracto de *Coriolus versicolor*, extracto de hojas de *Azadirachta indica*, ésteres poliglicerilo-6 de aceite de semilla de sandía, ésteres poliglicerilo-6 de aceite de semilla de avellana, ésteres poliglicerilo-6 de aceite de hueso de albaricoque, kaempferol, dilaurato de poliglicerilo-10, lectina, magnolol, honokiol, oleato de poliglicerilo-10, oleato de sorbitán, sorbitán, palmitato, fosfato de dicetilo, benzoato sódico, sorbato potásico, ácido láctico.

La eficacia de las composiciones de la invención se puede mejorar mediante la encapsulación de los compuestos activos en liposomas.

El término "liposoma" se ha de entender como una estructura autoensamblada que comprende una o más membranas compuestas por bicapas, cada una de las cuales comprende dos monocapas que contienen moléculas anfipáticas orientadas en dirección contraria. Moléculas anfipáticas pueden ser polímeros o lípidos que comprenden una región del grupo de cabeza polar (hidrófila) unida covalentemente a una o más cadenas no polares (hidrófobas). Los contactos energéticamente desfavorables entre las cadenas acilo hidrófobas y el medio acuoso que las rodea induce a las moléculas de lípido anfipáticas a auto-organizarse, de modo que sus grupos de cabeza polares se orientan hacia la superficie de la bicapa, mientras que las cadenas de acilo se reorientan hacia el interior de la bicapa. De este modo se forma una estructura energéticamente estable en la que las cadenas de acilo están protegidas eficazmente del contacto con el medio acuoso.

Un liposoma encapsula una región de solución acuosa dentro de la membrana hidrófoba; los solutos hidrófilos disueltos no pueden pasar fácilmente a través de los lípidos. En la membrana se pueden disolver productos químicos hidrófobos y, de este modo, el liposoma puede llevar tanto moléculas hidrófobas como moléculas hidrófilas. Para administrar las moléculas a los sitios de acción, la bicapa de lípidos se puede fusionar con otras bicapas tales como la membrana celular, suministrando así el contenido del liposoma. La aplicación tópica de liposomas ofrece una amplia gama de ventajas en cosmética y farmacia, incluyendo una mayor biodegradabilidad y biocompatibilidad, así como una liberación prolongada y una toxicidad y efectos secundarios menores del principio activo encapsulado. Una ventaja adicional es que las composiciones que comprenden principios activos encapsulados en liposomas muestran frecuentemente un periodo de caducidad prolongado, ya que los liposomas protegen a dichos principios activos de la degradación.

Así, en particular, la descripción contempla que el extracto de *C. versicolor* y/o uno o más de los compuestos activos adicionales comprendidos en la composición tópica están encapsulados en liposomas.

Cualquier tipo de liposoma del estado de la técnica puede encapsular a los compuestos activos de las composiciones de la invención. Tipos particularmente adecuados de liposomas son los niosomas, fitosomas y nanosomas. Así, la descripción contempla en particular que el extracto de *C. versicolor* y/o uno o más de los compuestos activos adicionales comprendidos en la composición tópica están encapsulados en niosomas, fitosomas y nanosomas.

Un "niosoma" es un liposoma basado en tensioactivos no iónicos. Los niosomas se forman principalmente mediante la incorporación de colesterol como excipiente si bien se pueden usar otros excipientes. Son estructuras lamelares de tamaño microscópico, constituidas por un tensioactivo no iónico de la clase de los alquil o dialquil poliglicerol éteres y colesterol con hidratación posterior en medios acuosos. Los materiales usados para preparar niosomas los hacen más estables y, por tanto, los niosomas ofrecen muchas ventajas, por ejemplo, los niosomas tienen una muy alta capacidad de penetración. Niosomas que contienen diversos compuestos biológicamente activos están disponibles en el mercado. Por ejemplo, niosomas de ácido hialurónico (NIO-Oligo HA[®]) son comercializados por la compañía Naturalis Life Technologies. El mismo proveedor comercializa los niosomas Nio-Glucan, que contienen una mezcla de carboximetil beta-glucano (un derivado de glucano soluble en agua), magnolol y monokiol.

"Fitosomas" son un complejo de un principio activo natural y un fosfolípido, preferentemente fosfatidilcolina, con una relación molar adecuada que contiene también con frecuencia un polifenol. Un fitosoma es una dispersión sólida de un principio activo natural o una mezcla de principios activos naturales, por ejemplo un extracto botánico, en una matriz fosfolípida alimentaria, por ejemplo lecitina de soja. Cuando está encapsulado el principio activo en un fitosoma se puede comparar de alguna manera con una parte integral de la membrana de lípidos. Diversos principios activos naturales están disponibles en el mercado en forma de fitosomas, por ejemplo el *Centella* Phytosome[®], que contiene triterpenos de *Centella* asiática, se puede obtener fácilmente de Indena. El mismo proveedor comercializa también Greenselect[®] Phytosome[®], que contiene polifenoles de hojas de té verde.

"Nanosomas" son liposomas de tamaño nanométrico de una sola bicapa que contienen un alto porcentaje de fosfatidilcolina (PC). Los nanosomas penetran eficazmente en la piel mediante aplicación tópica facilitando la administración de los compuestos activos encapsulados a las células de la piel.

De acuerdo con la descripción, los compuestos activos se pueden incluir directamente en la composición o se pueden añadir en forma de liposomas. La descripción también contempla que algunos compuestos activos estén incluidos en la composición en forma de liposomas mientras que otros no. Entre los compuestos activos que se incluyen en la composición en forma de liposomas, se contempla cualquier tipo de liposoma conveniente, por ejemplo, niosomas, fitosomas o nanosomas, o mezclas de los mismos.

La presente descripción contempla una composición tópica que comprende un extracto de *C. versicolor*, Nio-Oligo HA[®], Bio-Ecolia[®], *Centella* Phytosome[®] y, opcionalmente, un extracto de *Azadirachta indica* y/o Nio-Glucan[®].

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y variaciones de esta palabra no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes, o etapas. Asimismo, la palabra "comprende" engloba el caso de "consiste en". Otros objetos, ventajas y características de la invención serán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o se pueden aprender mediante la práctica de la invención. Los siguientes dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que limiten la presente invención. Asimismo, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de las realizaciones particulares y preferidas descritas en el presente documento.

EJEMPLOS

1. Formulación de una composición tópica para administración vaginal o cervical que comprende un extracto de *Coriolus versicolor*.

La siguiente composición se denominó Gel Tópico Vulvo-Vaginal PALOMA (PALOMA Gel) y contenía los siguientes 5 componentes (% en peso referidos a la composición final):

0,5 % de oligosacárido alfa-glucano, 0,18 % de carboximetil betaglucano sódico, 0,075 % de magnolol, 0,075 % de honokiol, 0,24 % de ácido hialurónico hidrolizado, 0,04 % de kaempferol, 0,05 % de extracto de *Coriolus versicolor*, 0,01 % de extracto de *Azadirachta indica*, 0,013 % de asiaticósido, 0,012 % de ácido madecásico, 0,008 % de ácido 10 asiático, 1 % de zumo de hojas de Aloe barbadensis, 8,8 % de glicerina, 6 % de propanodiol, 1,2 % de hidroxietilcelulosa, 0,67 % de ésteres poliglicerilo-6 de aceite de semilla de sandía, 0,45 % de ésteres poliglicerilo-6 de aceite de semilla de avellana, 0,45 % de dilaurato de poliglicerilo-10, 0,31 % de benzoato sódico, 0,3 % de ésteres poliglicerilo-6 de aceite de hueso de albaricoque, 0,241 % de hidroxipropil guar, 0,24 % de oleato de poliglicerilo-10, 0,217 % de lecitina, 0,18 % de oleato de sorbitán, 0,154 % de sorbato potásico, 0,096 % de ácido láctico, 0,08 % de 15 palmitato de sorbitán, 0,8 % de fosfato de dicetilo, 78,329 % de agua.

Esta composición está en forma de gel y se puede administrar dentro de la vagina o el cuello uterino mediante una cánula.

20 2. Estudio *in vitro*

Este estudio se diseñó para investigar si la composición de la invención es capaz de modular la respuesta inmune de tejidos epiteliales vaginales evaluando la liberación de citocinas en el compartimento basal tras periodos de tratamiento definidos. La viabilidad de los tejidos se evaluó también usando mediciones de MTT.

25

Sistema de ensayo

El ensayo se llevó a cabo con el modelo de epitelio vaginal humano reconstituido (RhVE) tridimensional EpiVaginal® VLC-100-FT (MatTek). El modelo RhVE EpiVaginal® VLC-100-FT (MatTek) consiste en células epiteliales VEC 30 normales de origen humano cultivadas sobre una matriz de colágeno similar a la lámina propia que contiene fibroblastos y células dendríticas (DC). El sistema de ensayo, por tanto, representa *in vitro* el órgano diana de las especies de interés e imita lo más posible las propiedades bioquímicas y fisiológicas.

Materiales

35

Se ensayaron los siguientes geles:

PALOMA GEL. Composición del ejemplo 1 (P-7447)

Gel VEHÍCULO. Composición del ejemplo 1 sin los siguientes principios activos: Extracto de *C. versicolor*, extracto de 40 *Azadirachta indica*, carboximetil beta-glucano, magnolol y honokiol (P-7450).

VEHÍCULO + 0,05 % de extracto de *C. versicolor* (P-7451)

VEHÍCULO + 0,01 % de extracto de *Azadirachta indica* (P-7452)

VEHÍCULO + 0,18 % de carboximetil betaglucano sódico, 0,075 % de magnolol, 0,075 % de honokiol (P-7453)

Control de LPS (1 µg/ml de lipopolisacáridos, Sigma Cat N.º: L4391)

45

Los tejidos EpiVaginal® fueron proporcionados en forma de kits (VLC-100-FT, MatTek), que consistían en los siguientes componentes relevantes para este estudio:

1 x placa de 24 pocillos herméticamente cerrada que contenía 24 insertos con tejidos sobre agarosa

1 botella de medio de ensayo (medio basado en DMEM)

50 5.

Reactivos adicionales

Solución de MTT:

- solución madre de MTT: 3 mg/ml de MTT en PBS

- medio de MTT: la solución madre de MTT se diluirá 1 + 9 con medio basado en DMEM (concentración 55 final de 0,3 mg/ml).

Isopropanol

Metodología

60 a) Experimentos previos

Para comprobar la capacidad no específica de reducir al MTT de los productos de ensayo se mezclaron 50 mg del producto de ensayo por 2 ml del medio de MTT y se incubaron durante 3 h a 37 ± 1 °C en la oscuridad. Si la mezcla

se volvía azul/púrpura, se asumía que el producto de ensayo había reducido al MTT. Para una corrección cuantitativa de los resultados, la parte de absorción debida a la reducción no específica del MTT se determinó usando tejidos muertos. Si la reducción no específica del MTT era > 30 % con relación al control negativo de epidermis viva, el producto de ensayo se consideró incompatible con el método de ensayo.

5

Para comprobar el potencial de coloración de los productos de ensayo se mezclaron 50 mg del producto de ensayo por 90 µl de agua destilada en un recipiente transparente durante 15 min. El criterio seguido era: si se detectaba coloración mediante determinación a simple vista, el producto de ensayo se ensayaba para determinar su potencial de coloración para la corrección cuantitativa de los resultados usando tejidos viables adicionales sin tinción con MTT.

10 Si la DO no específica debida a la coloración era > 30 % con relación al control negativo, el producto de ensayo se consideraba incompatible con el método de ensayo.

b) Procedimiento experimental

15 Una vez recibidos, los tejidos se transfirieron a las placas de 24 pocillos que contenían 0,6 ml de medio de mantenimiento precalentado por pocillo. Las placas de 24 pocillos se incubaron en una incubadora humidificada a 37 ± 1 °C, 5,0 % de CO₂, durante al menos 1 h y como máximo 24 h. Después el medio se sustituyó por 0,6 ml de medio nuevo.

20 Se pesaron cantidades de 50 ± 2 mg ($131,5$ mg/cm²) del producto de ensayo y se aplicaron sobre la superficie del epitelio por cada tejido individual. El producto de ensayo se aplicó con cuidado mediante movimientos circulares repetidos de la pipeta a fin de cubrir uniformemente la superficie del tejido pero evitando cualquier contacto directo con la punta de la pipeta. Se puede usar al final una malla de nailon para extenderlo.

25 Experimento de 6 h: los tejidos se trataron con cada grupo de dosis, partiendo del control negativo. Se registrará el tiempo de inicio con la dosificación del primer tejido. A continuación los tejidos se incubaron durante $6 \text{ h} \pm 10$ min a 37 ± 1 °C, 5,0 % de CO₂.

Experimento de 24 h: los tejidos se trataron con cada grupo de dosis, partiendo del control negativo. Se registró el tiempo de inicio con la dosificación del primer tejido. A continuación los tejidos se incubaron durante $24 \text{ h} \pm 1$ h a 37 ± 1 °C, 5,0 % de CO₂.

30 Tras el periodo respectivo de incubación, el medio que estaba en contacto con la superficie basal del tejido se guardó y se almacenó a -80 °C para el análisis posterior de liberación de citocinas.

35 Seguidamente los tejidos se lavaron usando, por ejemplo, una botella de lavado, enjuagando con cuidado aproximadamente 15 veces con 25 ml de PBS para eliminar cualquier producto de ensayo residual. El exceso de PBS se eliminó agitando suavemente el inserto y secando el fondo con papel secante. Todos los insertos se trataron del mismo modo.

40 Los tejidos tratados se transfirieron después a una placa de 24 pocillos preparada que contenía 2 ml de medio de MTT precalentado y se incubaron posteriormente durante $3 \text{ h} \pm 5$ min a 37 ± 1 °C, 5,0 % de CO₂.

45 Al cabo de un periodo de incubación con MTT de 3 h, los tejidos se dispusieron sobre papel secante para secar los tejidos. Después de esto, se efectuó una biopsia del epitelio usando un punzón de biopsia especial. Todas las partes de los tejidos se transfirieron a tubos adecuados y se añadieron 500 µl de isopropanol. La extracción se llevó a cabo protegida de la luz bien durante el fin de semana a $2 - 8$ °C o bien, de modo alternativo, durante al menos 4 h a temperatura ambiente con agitación con formación de vórtice de cada tubo a mitad del periodo de incubación.

Si quedaba en suspensión cualquier fragmento visible de célula/tejido, los tubos se centrifugaron a $300 \times g$ para eliminar los fragmentos y evitar posibles interferencias con las lecturas de absorbancia.

50 Por cada tejido, se transfirieron alícuotas de 2×200 µl del extracto a placas de 96 pocillos y se midió la DO a 570 nm sin longitud de onda de referencia en un espectrofotómetro de placas.

55 La determinación de las citocinas se realizó de acuerdo con el fabricante del kit (*V-PLEX Proinflammatory Panel1 (human) Kit*, Meso Scale Discovery, Cat N.º: K15049D-1). Las citocinas evaluadas fueron IFN-gamma, IFN-beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13 y TNF-alfa.

Resultados

a) Potencial irritante del producto de ensayo

60

Tras un tiempo de exposición de 6 h y 24 h no se pudieron observar efectos citotóxicos cuando los tejidos fueron tratados con PALOMA GEL (véase la tabla 1). La viabilidad de los tejidos tratados fue > 50 % (105 % y 122 %, a 6 y 24 h, respectivamente), en comparación con el control negativo tratado con PBS. Los tejidos tratados con P-7450

(VEHÍCULO) mostraron menor viabilidad de los tejidos tratados a las 6 y 24 h en comparación con el PALOMA GEL y el control negativo (PBS) pero se consideró no irritante ya que la viabilidad fue también > 50 % (93 % y 70 % a las 6 y 24 h, respectivamente).

5 Estos resultados podían indicar que ni el PALOMA GEL ni el VEHÍCULO exhiben efectos irritantes.

Tabla 1 Viabilidad del epitelio vaginal humano

Nombre	Viabilidad del tejido [%]		
	6 h exposición	24 h exposición	
Control de LPS 1 µg/ml	95,7	112,9	PC
P - 7447	105,8	122,9	Formulación completa
P - 7450	93,5	70,5	Vehículo solo

10

b) Efecto inmunomodulador

Para evaluar el potencial efecto inmunomodulador de las muestras de ensayo, se recogieron los sobrenadantes de los tejidos tratados y se efectuó la determinación de citocinas de acuerdo con el fabricante del kit (*V-PLEX*

15 *Proinflammatory Panel1 (human) Kit*, Meso Scale Discovery, Cat N.º: K15049D-1).

Las citocinas evaluadas fueron el panel proinflamatorio que incluía IFN-gamma, IFN- beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13 y TNF-alfa.

20 Como se muestran en la tabla 2, se observó un aumento de los niveles de citocinas tras el tratamiento con el control positivo de LPS a las dos concentraciones ensayadas (1 y 10 µg/ml). El PALOMA GEL inducía en la mayoría de los casos niveles de citocinas similares a los del control positivo de LPS a 1 µg/ml. Los niveles de citocinas en los tejidos tratados con P - 7450 (VEHÍCULO) era menores en todos los casos.

25 Tabla 2 Niveles de citocinas en epitelio vaginal humano

Concentración final de citocinas (pg/ml)	IFN-gamma		
	6 h	24 h	% cambio
P - 7447	4,1	20,52	400 %
P - 7450	12,63	13,15	4 %
P - 7451	6,92	8,23	19 %
P - 7452	8,27	9,2	11 %
P - 7453	12,51	8,2	-34 %
Control de LPS	4,97	22,12	345 %

Concentración final de citocinas (pg/ml)	IL-1Beta		
	6 h	24 h	% cambio
P - 7447	9,45	24,31	157 %
P - 7450	18,27	21,37	17 %
P - 7451	12,27	16,18	32 %
P - 7452	13,76	17,26	25 %
P - 7453	13,45	19,25	43 %
Control de LPS	11,49	31,09	171 %

Concentración final de citocinas (pg/ml)	IL-2		
	6 h	24 h	% cambio
P - 7447	2,8	14,29	410 %
P - 7450	8,57	9,86	15 %

(continuación)

P - 7451	6,06	8,15	34 %
P - 7452	6,49	8,04	24 %
P - 7453	28,24	6,83	-76 %
Control de LPS	5,09	17,09	236 %

Concentración final de citocinas (pg/ml)	IL-4		
	6 h	24 h	% cambio
P - 7447	0,8	2,55	219 %
P - 7450	1,75	1,67	-5 %
P - 7451	1,07	1,18	10 %
P - 7452	1,22	1,12	-8 %
P - 7453	1,4	1,27	-9 %
Control de LPS	0,83	2,75	231 %

Concentración final de citocinas (pg/ml)	IL-6		
	6 h	24 h	% cambio
P - 7447	203	1087,58	436 %
P - 7450	735,8	780,61	6 %
P - 7451	392,88	394,88	1 %
P - 7452	574,2	402,5	-30 %
P - 7453	501,15	367,27	-27 %
Control de LPS	355	1469	314 %

Concentración final de citocinas (pg/ml)	IL-8		
	6 h	24 h	% cambio
P - 7447	9354	10222	9 %
P - 7450	9821	9859	0 %
P - 7451	9881	10047	2 %
P - 7452	9713	9763	1 %
P - 7453	10048	10110	1 %
Control de LPS	9864	10707	9 %

Concentración final de citocinas (pg/ml)	IL-10		
	6 h	24 h	% cambio
P - 7447	1,34	6,33	372 %
P - 7450	3,21	4,03	26 %
P - 7451	2,55	3,26	28 %
P - 7452	2,64	3,28	24 %
P - 7453	7,05	3,89	-45 %
Control de LPS	3,43	8,76	155 %

Concentración final de citocinas (pg/ml)	IL-12p70		
	6 h	24 h	% cambio
P - 7447	1,97	6,83	247 %
P - 7450	4	4,27	7 %
P - 7451	3,31	3,76	14 %
P - 7452	2,81	2,93	4 %
P - 7453	4,7	5,12	9 %
Control de LPS	2,67	8,92	234 %

Concentración final de citocinas (pg/ml)	IL-13		
	6 h	24 h	% cambio
P - 7447	36,14	85,23	136 %
P - 7450	54,48	69,41	27 %
P - 7451	40,42	61,5	52 %
P - 7452	52,78	65,02	23 %
P - 7453	61,19	67,71	11 %
Control de LPS	46,17	101,22	119 %

Concentración final de citocinas (pg/ml)	TNF-Alfa		
	6 h	24 h	% cambio
P - 7447	3,16	14,87	371 %
P - 7450	8,69	10,6	22 %
P - 7451	5,92	7,71	30 %
P - 7452	7,37	9,03	23 %
P - 7453	22,25	6,5	-71 %
Control de LPS	6,6	24,89	277 %

Conclusiones

Se observó un claro aumento de los niveles de citocinas a las 24 h en comparación con las 6 h en los tejidos tratados con PALOMA GEL P - 7447 y el control positivo de LPS indicando que el efecto inmunoestimulante aumentaba con el tiempo hasta 24 horas de tratamiento. No se han observado cambios entre las 6 h y las 24 h para el VEHÍCULO P - 7450. Se observa una interacción sinérgica entre los componentes activos ensayados del PALOMA GEL.

3. Perfil de seguridad

5

3.1 Ensayo de irritación vaginal

10

La composición del ejemplo 1 se ensayó para determinar la irritación vaginal siguiendo la norma ISO 10993-10:2010 - Evaluación biológica de productos sanitarios - Parte 10: ensayos de irritación y sensibilización cutánea. Los resultados indicaban un índice de irritación vaginal de 0,00 para esta composición. Por tanto, la composición del ejemplo 1 se consideró no irritante para la membrana mucosa vaginal.

15

3.2 Ensayo de citotoxicidad

La composición del ejemplo 1 se ensayó para determinar la citotoxicidad *in vitro* siguiendo la norma ISO 10993-5:2009 - Evaluación biológica de productos sanitarios - Parte 5: Ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Los resultados indicaban que fibroblastos de mamífero ATCC BalbC 3T3 tratados con la composición del ejemplo 1, que comprende un extrato de *C. versicolor*, mostraban una reducción de la viabilidad celular del 97,92 %. De acuerdo con esto, se consideró que la composición era citotóxica.

20

25

3.3. Ensayo de hipersensibilidad

La composición del ejemplo 1 se ensayó para determinar el efecto de hipersensibilidad cutánea en cobayas siguiendo la norma ISO 10993-10:2010 - Evaluación biológica de productos sanitarios - Parte 10: Ensayos de irritación y sensibilización cutánea. No se observaron reacciones cutáneas en los animales tras la exposición a la composición del ejemplo 1 que comprende un extracto de *C. versicolor*. Los resultados indican que la composición del ejemplo 1 no se puede considerar sensibilizante.

4. Estudios *in vivo*

4.1. Inmunomodulación en ratones

El objetivo de este estudio era evaluar las propiedades inmunomoduladoras de la composición tópica que comprende un extracto de *C. versicolor* tras su administración local en la vagina de los ratones. Esto se realizó en ratones sanos. Se evaluó la respuesta inmune local y sistémica. Se usaron dos composiciones diferentes, GEL 1 (PALOMA Gel con una formulación final completa como la divulgada en el ejemplo 1) y GEL 2 (una formulación diferente de la divulgada en el ejemplo 1 en la que la concentración de extracto de *C. versicolor* es del 0,25 %).

Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con la "Guía para el cuidado y el uso de animales de laboratorio" promulgada por el Instituto Nacional de la Salud, y los protocolos experimentales aprobados por el Comité local de ética de la Universidad de Granada.

El estudio se realizó en ratones sanos obtenidos de Janvier (St Berthevin Cedex, Francia) y alojados en jaulas de Makrolon (5 ratones por jaula) y mantenidos en una atmósfera de aire acondicionado con un ciclo de luz-oscuridad de 12-h y con acceso libre a alimento y agua. Los ratones se asignaron aleatoriamente a diferentes grupos experimentales. Diferentes grupos (n = 7) de ratones sanos CBA/J (J-2 α) hembra (de 8 a 10 semanas de edad) se inocularon diariamente en la vagina con 50 μ l de GEL 1 o GEL 2. Un grupo de control (n = 6) se inoculó con PBS (control). Los ratones se sacrificaron al cabo de 6 y 10 días de tratamiento para determinar los efectos del tratamiento.

La vagina se extirpó para las determinaciones bioquímicas a fin de evaluar la respuesta inmune local mediante la determinación de citocinas diferentes (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17) mediante RT-qPCR (Strum J *et al.*, *Curr Protoc Pharmacol.*, 2002, Capítulo 6: Unidad 6.9), que detectará la cantidad de copias de ARNm de cada gen de interés. Esta técnica consiste en la amplificación del ARNm usando una plantilla de ADN del gen diana para detectar los diferentes patrones de transcripción de los genes analizados. En primer lugar el ARNm se retrotranscribe a ADNc y después se amplifica. Esto se detecta como el progreso de la reacción en "tiempo real". Para normalizar las mediciones, se estudian los genes diana con relación a otro gen denominado gen normalizador, que se selecciona por su nivel de expresión casi constante. Se usó como gen constitutivo la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que se expresa constitutivamente. Los datos así generados se analizaron mediante un software informático para calcular la expresión relativa del gen (o número de copias de ARNm) en diversas muestras.

Resultados:

Los resultados de la qPCR mostraban un aumento significativo ($p < 0,05$) de todas las citocinas ensayadas (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17) en ratones inoculados con el GEL 1 y también en los ratones inoculados con el GEL 2 a los 10 días y 6 días frente al grupo de control (FIG. 2). Esto indica que la composición que comprende un extracto de *C. versicolor*, tanto a una concentración del 0,05 % como del 0,25 %, activa la respuesta inmune de las células del epitelio vaginal de ratones sanos.

Esta respuesta inmune provocada por el extracto de *Coriolus versicolor* (solo o en combinación con beta-glucanos adicionales) es inespecífica. El sistema inmune inespecífico, conocido también como el sistema inmune innato, proporciona una defensa inmediata frente a la infección, e incluye tanto componentes de la inmunidad humoral como componentes de la inmunidad mediada por células. Las funciones principales del sistema inmune innato incluyen el reclutamiento de células inmunes a los sitios de infección mediante la producción de factores químicos, incluyendo las citocinas. En este sentido, aunque es inespecífica, la respuesta inmune local inespecífica provocada por la composición de la invención en individuos/tejidos sanos se puede extrapolar a individuos/tejidos que padecen una infección.

4.3. Estado vaginal y epitelización cervical en mujeres

El objetivo era evaluar el efecto del PALOMA GEL 12 días después de la aplicación del gel sobre: a) los cambios del estado de la microbiota vaginal, b) el grado de reepitelización de la mucosa del cuello uterino y c) el estado de salud vaginal.

a) El estado de la microbiota vaginal se midió mediante el ensayo VaginalStatus desarrollado por el *Institut für Mikroökologie*. El ensayo VaginalStatus diferencia entre una vaginitis inducida por una bacteria o *Trichomonas vaginalis* y los organismos (lactobacilos) presentes en la flora vaginal intacta. El VaginalStatus controla los parámetros siguientes:

- 5 Número de lactobacilos; incluyendo los productores de H₂O₂;
- Número de β-B-streptococos
- Número de anaerobios
- Detección vaginal específica de *Trichomonas vaginalis* y *Atopobium*
- 10 Detección específica de *Gardnerella vaginalis*
- Detección específica de levaduras (*Candida* spp.)

b) El efecto sobre la epitelización de la mucosa del cuello uterino se evaluó mediante colposcopia convencional. Las lesiones mediante colposcopia se puntuaron usando la puntuación CER (Reepitelización del epitelio del cuello uterino):

- 15 5.....Sin ectopia
- 4.....Ectopia leve: < 25 % desde el orificio periorificial
- 3.....Ectopia moderada: Entre un 25-50 % desde el orificio periorificial
- 2.....Ectopia extensa o severa: > 50 % desde el orificio periorificial
- 20 1.....Ectopia severa + sangrado

c) El estado de salud vaginal se evaluó mediante el índice de salud vaginal (VHI) de Bachmann (Bachmann G. "Urogenital ageing: an old problem newly recognized", *Maturitas* 1995, Dic; 22 Supl: S1-S5; Bachman G. "A new option for managing urogenital atrophy in post menopausal women", *Contemp Obstet Gynecol* 1997, vol. 42, págs. 13-28).

25 Este estudio se realizó en 11 mujeres sanas (es decir, sin síntomas clínicos vaginales). Cada paciente recibió 12 días de gel Paloma vaginalmente una vez al día durante la noche.

30 Los datos de la microbiota vaginal se obtuvieron de 9 pacientes. Seis de ellas presentaban algún tipo de infección en el periodo basal (*Gardnerella vaginalis*, *Stafilococcus*, *E. coli*, *Mycoplasma*, *Streptococcus* beta-hemolítico y *Enterococcus* spp). Al final del estudio, 5 mujeres (62 %) mejoraron el estado de su microbiota vaginal y 2 de ellas mostraron una normalización completa. Dos mujeres mostraron una mejora no significativa, aunque se observó un incremento de los lactobacilos. El estado de la microbiota de una mujer empeoró.

35 Los datos de la colposcopia se obtuvieron para 11 mujeres. Los resultados de la tabla 3 muestran un efecto positivo del gel Paloma en cuanto a mejorar la reepitelización de la mucosa del cuello uterino con un 24 % de mejora de la puntuación CER. Un total de 8 de las 11 mujeres (72 %) mostraron una recuperación completa (puntuación CER = 5).

Tabla 3 Resultados de la evaluación mediante colposcopia (Puntuación CER)

40

CER 1ª VISITA	CER 2ª VISITA
4	5
4	5
4	5
3	5
5	5
4	5
3	4
4	5
4	5
3	4
4	4
Media 3,8	Media 4,72 (+24 % de mejora frente a la 1ª visita)

Tabla 4 Resultados VHI

	VHI (T0)	VHI (T12)
1	18	18
5 2	18	24
3	23	22
4	17	23
5	21	25
6	19	21
10 7	17	22
8	20	23
9	19	24
10	20	22
11	17	22
15 Media	19,0	22,4

18 % de mejora frente al valor inicial

4.4. Epitelización cervical en mujeres

- 20 Este estudio se realizó en 5 mujeres sanas (es decir, sin síntomas clínicos vaginales). Cada paciente recibió 12 días de gel PALOMA una vez al día durante la noche. El efecto sobre la epitelización de la mucosa del cuello uterino se evaluó mediante colposcopia convencional. Las lesiones mediante colposcopia se clasificaron usando la puntuación CER (véase más arriba).
- 25 Los resultados de la tabla 2 muestran un efecto positivo del PALOMA GEL en cuanto a mejorar la reepitelización de la mucosa del cuello uterino con un 75 % de mejora de la puntuación CER (valor inicial frente al final: 2,4 vs 4,2). Un total de 2 de las 5 mujeres mostraron una recuperación completa (puntuación CER = 5).

Tabla 2 Resultados de la evaluación mediante colposcopia (Puntuación CER)

PACIENTE	COLPOSCOPIA	
	T0	T12
1	3	5
2	3	4
3	3	4
4	1	3
5	2	5
Puntuación media	2,4	4,2 (+75 % vs T0)

La FIG. 4 muestra los cambios observados en la mucosa del cuello uterino. Las áreas oscuras corresponden a las áreas de epitelización.

35 4.5. Estudio clínico piloto con mujeres VPH positivas

- Se llevó a cabo un estudio "piloto" prospectivo, observacional, paralelo, comparativo, para evaluar el efecto del PALOMA Gel (Véase la composición del ejemplo 1) sobre la reparación de la mucosa vaginal dañada en una población femenina con una prueba de Pap positiva para displasia leve (ASCUS, L-SIL, CIN-1). Se reclutaron un total de 40 mujeres con edades de 18 a 65 años. Se dividieron en 3 grupos: PALOMA Gel administrado una vez al día (n = 15), PALOMA Gel administrado cada dos días (n = 15), y un grupo de control con un tratamiento convencional de estas lesiones lo que equivale a la no administración de tratamiento (n = 15). Los pacientes recibieron el PALOMA Gel o el tratamiento convencional durante 6 meses y tuvieron visita médica en el periodo inicial y tras 3 y 6 meses. Se realizó una visita subsiguiente adicional en el mes 12 (tras 6 meses de no tratamiento).
- 45 En cada visita se efectuaron una prueba de Pap y una colposcopia. Los datos sobre la reepitelización y el estado de las lesiones vaginales se obtuvieron siguiendo los procedimientos convencionales. Se recogieron en cada visita las preferencias del paciente sobre regímenes, calidad de vida y seguridad. Los genes del VPH, L1 y E6/E7, se determinaron mediante PCR (L1), MT-PCT (E6/E7) y secuenciación (L1) en el periodo inicial y a la terminación del estudio para evaluar la infección por VPH.

Resultados

Las características demográficas y clínicas basales eran comparables en todos los grupos.

- 5 En el mes 3, los pacientes de ambos grupos PALOMA Gel mostraban una tendencia a una mejor epitelización de las lesiones vaginales en comparación con los pacientes que recibieron el tratamiento convencional (comparación intergrupala) y el valor basal (comparación intergrupala). Estas diferencias fueron significativas el mes 6. El tratamiento convencional mostraba un resultado estacionario o negativo en cuanto a la reparación de las lesiones vaginales. Se observó una ligera tendencia a una mayor negativización del VPH en los grupos PALOMA Gel.
- 10 Análogamente, se observó un resultado mejor no significativo en cuanto a las escalas de calidad de vida en los pacientes con administración del PALOMA Gel. No se observaron diferencias en cuanto a las preferencias de régimen. Ambos regímenes de PALOMA Gel fueron seguros a lo largo del estudio.
- 15 Los resultados obtenidos han de ser evaluados como enteramente positivos, considerando la mejora de la situación clínica en los grupos de estudio (en comparación con el resultado estacionario o negativo en el grupo de control) y también la casi total ausencia de efectos secundarios en los grupos de estudio.

Este estudio indica que la administración del PALOMA Gel es una buena opción en el tratamiento de lesiones vaginales leves debidas al VPH.

5. Composiciones de los extractos y otros productos para su uso en la composición de la invención

Las fuentes apropiadas para los principios activos empleados en las composiciones de la invención se listan a continuación.

Extracto de *C. versicolor* (Actipone® *Coriolus*) de Symrise con la siguiente composición: Agua (> 50 %), glicerina (25-50 %), extracto de *C. versicolor* (1-5 %), benzoato sódico (0,5 %), ácido láctico (0,215 %) y sorbato potásico (0,2 %).

- 30 Extracto de *Azadirachta indica* (Extrapone® Neem) de Symrise con la siguiente composición: Agua (> 50 %), glicerina (25-50 %), extracto de *Azadirachta indica* (0,1-1 %), benzoato sódico (0,5 %), ácido láctico (0,36 %) y sorbato potásico (0,2 %).

Prebiótico (Nio-Glucan®) de Naturalis Life Technologies con la siguiente composición: Carboximetil beta-glucano sódico: 2,0-6,0 %, Magnolol/Honokiol: 1,0-3,0 %, Dilaurato de poliglicerilo-10: 10,0-15,0 %, Éster poliglicerilo-6 de aceite de semilla de sandía 10,0-15,0 %, Éster poliglicerilo-6 de aceite de semilla de avellana 10,0-15,0 %, Oleato de sorbitán 4,0-6,0 %, Lecitina: 3,0-5,0 %, Agua: 45,0-50,0 %

REFERENCIAS CITADAS EN LA SOLICITUD

- 40 Kang SC *et al.* "Effects of β -glucans from *Coriolus versicolor* on macrophage phagocytosis are related to the Akt and CK2/Ikaros", *Int J Biol Macromol.* 2013, vol. 57, págs. 9-16.
- Cui J, *et al.* "Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production". *Biotechnol Adv.* 2003, vol. 21(2), págs. 109-22.
- 45 KF Cheng, *et al.* "General review of polysaccharopeptides from *C. versicolor*: Pharmacological and clinical studies", *Cancer Therapy* 2008, vol. 6, págs. 117-130.
- 50 EMA/HMPC/291177/200, 2010. "Assessment report on *Centella asiatica* (L.) Urban, herba".
- Tiwari V, *et al.* "In vitro antiviral activity of neem (*Azadirachta indica* L.) bark extract against herpes simplex virus type-1 infection". *Phytother Res.* 2010, vol. 24(8), págs. 1132-1140.
- 55 ISO 10993-10:2010 - Evaluación biológica de productos sanitarios - Parte 10: Ensayos de irritación y sensibilización cutánea.
- ISO 10993-5:2009 Evaluación biológica de productos sanitarios - Parte 5: Ensayos de citotoxicidad *in vitro*.
- 60 Strum J *et al.* "Tissue expression profiling using real-time PCR", *Curr Protoc Pharmacol.* 2002, Capítulo 6: Unidad 6.9, DOI: 10.1002/0471141755.ph0609s18.
- Bachmann G. "Urogenital ageing: an old problem newly recognized", *Maturitas* 1995, Dic; 22 Supl: S1-S5.

Bachman G. "A new option for managing urogenital atrophy in post menopausal women", *Contemp Obstet Gynecol* 1997, vol.42, págs. 13-28

5 Takashi Kawana et al ("Treatment of recurrent genital herpes with PSK", *International Journal of Immunopharmacology* 1988, vol. 10, page 152)

Mycology Research Laboratories: "Clinical trial results show proof of concept for use of coriolus versicolor as immunonutrition in HPV patients with cervical lesions (LSIL)",

10 URL:<http://www.medicalnewstoday.com/releases/105573.php>

WO2011094579

US2009130138

15

EP2522356

KR20030082619

20

US2008124303

WO2006134409

WO2012046145

25

WO2004080474

REIVINDICACIONES

1. Una composición tópica que comprende un extracto de *Coriolus versicolor*, para su uso en la prevención y/o el tratamiento mediante administración vaginal o cervical de un trastorno vaginal o cervical que es causado por un agente infeccioso seleccionado del grupo que consiste en virus de papiloma humano (VPH), *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus*, *Bacteroides*, *Mycoplasma*, *Trichomonas vaginalis*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus* alfa y *S. epidermidis*.
2. La composición tópica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el agente infeccioso es el virus del papiloma humano.
3. La composición tópica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el trastorno vaginal o cervical se selecciona del grupo que consiste en cáncer cervical, vaginitis bacteriana y tricomoniasis.
4. La composición tópica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde el trastorno vaginal o cervical es el cáncer cervical.
5. La composición tópica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, donde el tratamiento comprende curar las lesiones epiteliales vaginales causadas por el agente infeccioso.
6. La composición tópica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el tratamiento comprende la eliminación de la infección.
7. La composición tópica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que se administra a una mujer que muestra lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL) o neoplasia intraepitelial cervical leve (CIN1).
8. La composición tópica para su uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que además comprende extracto de *Azadirachta* indica y un beta-glucano adicional.
9. La composición tópica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde el beta-glucano adicional es carboximetil beta-glucano.
10. La composición tópica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-9, que comprende además un compuesto activo seleccionado del grupo que consiste en un agente humectante, un prebiótico y un agente antiinflamatorio.
11. La composición tópica para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde el agente humectante es el ácido hialurónico, el prebiótico es un oligosacárido alfa-glucano, y el agente antiinflamatorio se selecciona de magnolol, honokiol y mezclas de los mismos.
12. La composición tópica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-11, que además comprende un agente regenerador de tejidos y/o aloe vera.
13. La composición tópica para su uso de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende extracto de *Coriolus versicolor*, extracto de *Azadirachta* indica, carboximetil beta-glucano, ácido hialurónico, oligosacárido Alpha-glucano, magnolol, honokiol, extracto de *Centella asiatica* y aloe vera.
14. La composición tópica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-13, donde el extracto de *Coriolus versicolor* y/o uno o más de los otros compuestos activos están encapsulados en liposomas.
15. Una composición tópica para administración vaginal o cervical que comprende extracto de *Coriolus versicolor*, extracto de *Azadirachta* indica y un beta-glucano adicional.

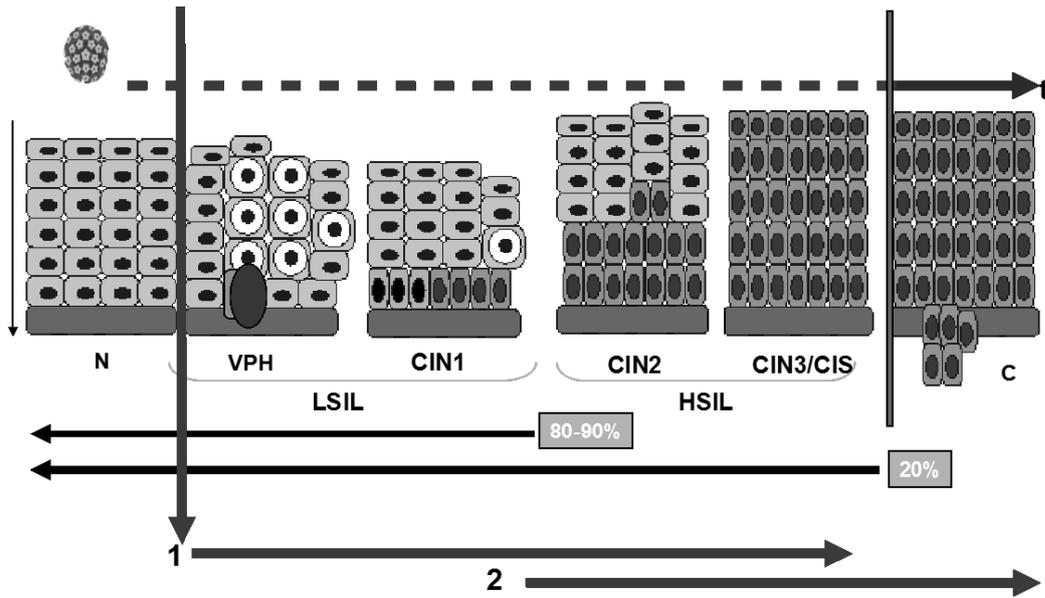


FIG. 1

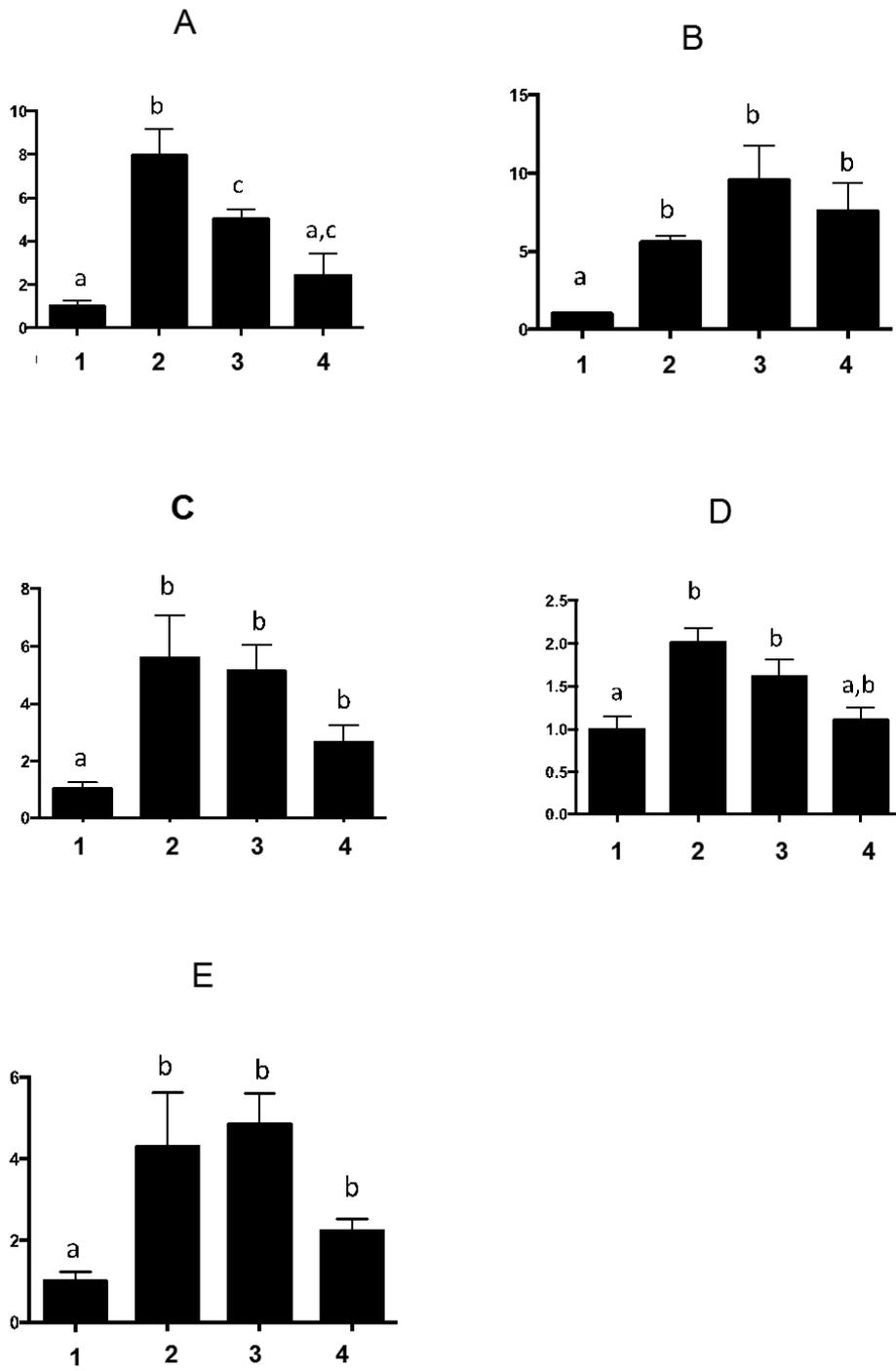


FIG. 2

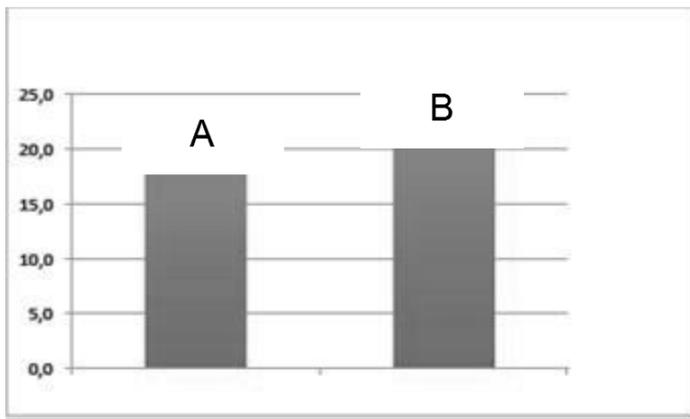


FIG. 3

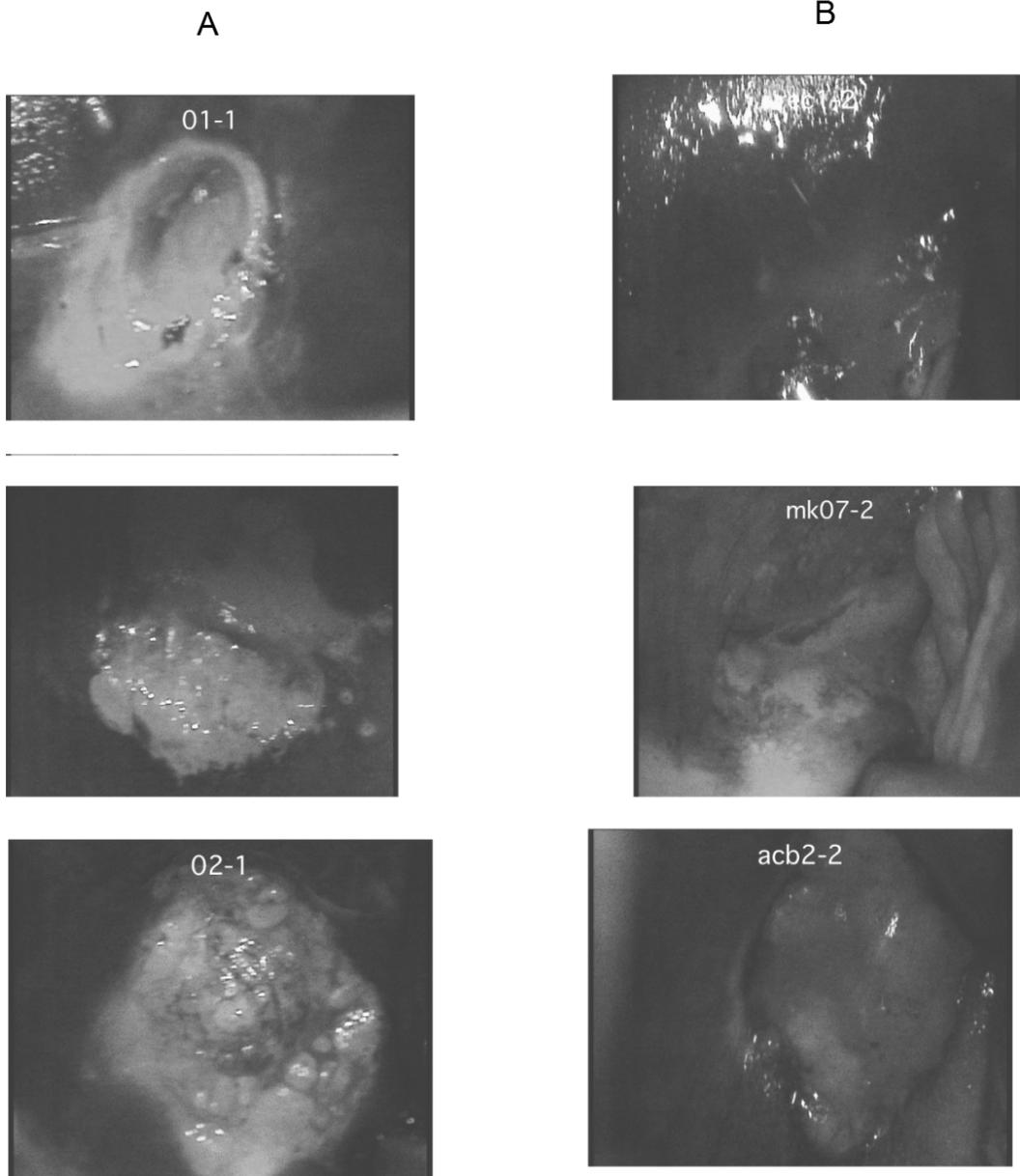


FIG. 4

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2011094579 A [0012] [0131]
- US 2009130138 A [0012] [0131]
- EP 2522356 A [0012] [0131]
- KR 20030082619 [0012] [0131]
- US 2008124303 A [0012] [0131]
- WO 2006134409 A [0012] [0131]
- WO 2012046145 A [0012] [0131]
- WO 2004080474 A [0012] [0131]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- **KANG SC et al.** *Int J Biol Macromol.*, 2013, vol. 57, 9-16 [0011]
- **CUI J et al.** *Biotechnol Adv.*, 2003, vol. 21 (2), 109-22 [0011]
- **TAKASHI KAWANA et al.** Treatment of recurrent genital herpes with PSK. *International Journal of Immunopharmacology*, 1988, vol. 10, 152 [0012] [0131]
- **MYCOLOGY RESEARCH LABORATORIES.** *Clinical trial results show proof of concept for use of coriolus versicolor as immunonutrition in HPV patients with cervical lesions (LSIL)*, URL:<http://www.medicalnewstoday.com/releases/105573.php> [0012]
- **KF CHENG et al.** *Cancer Therapy*, 2008, vol. 6, 117-130 [0024]
- **TIWARI V et al.** *Phytother Res.*, 2010, vol. 24 (8), 1132-1140 [0056]
- **STRUM J et al.** *Curr Protoc Pharmacol.* 2002 [0109]
- **BACHMANN G.** Urogenital ageing: an old problem newly recognized. *Maturitas*, December 1995, vol. 22, 1-5 [0112]
- **BACHMAN G.** A new option for managing urogenital atrophy in post menopausal women. *Contemp Obstet Gynecol*, 1997, vol. 42, 13-28 [0112] [0131]
- **KANG SC et al.** Effects of β -glucans from *Coriolus versicolor* on macrophage phagocytosis are related to the Akt and CK2/Ikaros. *Int J Biol Macromol.*, 2013, vol. 57, 9-16 [0131]
- **CUI J et al.** Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnol Adv.*, 2003, vol. 21 (2), 109-22 [0131]
- **KF CHENG et al.** General review of polysaccharopeptides from *C. versicolor*: Pharmacological and clinical studies. *Cancer Therapy*, 2008, vol. 6, 117-130 [0131]
- **TIWARI V et al.** In vitro antiviral activity of neem (*Azadirachta indica* L.) bark extract against herpes simplex virus type-1 infection. *Phytother Res.*, 2010, vol. 24 (8), 1132-1140 [0131]
- Tissue expression profiling using real-time PCR. **STRUM J et al.** *Curr Protoc Pharmacol.* 2002 [0131]
- **BACHMANN G.** Urogenital ageing: an old problem newly recognized. *Maturitas*, December 1995, vol. 22, 1-5 [0131]
- **MYCOLOGY RESEARCH LABORATORIES.** *Clinical trial results show proof of concept for use of coriolus versicolor as immunonutrition in HPV patients with cervical lesions (LSIL)*, <http://www.medicalnewstoday.com/releases/105573.php> [0131]