

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 382**

51 Int. Cl.:

A61K 9/02 (2006.01)

A61P 15/02 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2009 PCT/EP2009/056818**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2009 WO09147173**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2009 E 09757554 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2306973**

54 Título: **Óvulo vaginal que comprende ácido láctico**

30 Prioridad:

04.06.2008 EP 08157575

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

11.07.2017

73 Titular/es:

**ROLF KULLGREN AB (100.0%)
P.O:Box 123
646 00 Gnesta, SE**

72 Inventor/es:

ANDERSCH, BJÖRN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 623 382 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

Óvulo vaginal que comprende ácido láctico

5 Campo técnico

La presente invención se relaciona con un óvulo vaginal que comprende un vehículo inerte y ácido láctico o una sal del mismo para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos en el tracto urogenital.

10 También se relaciona con el uso de dicho óvulo para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos en el tracto urogenital así como también con un método para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos en el tracto urogenital.

Antecedente técnico

15

El ecosistema vaginal es un entorno finamente equilibrado mantenido por una interacción compleja entre una variedad de bacterias, que incluyen con poca frecuencia, levaduras, todas las cuales se producen naturalmente en la vagina.

20 Las infecciones urogenitales, que incluyen infecciones del tracto urinario (UTI), vaginosis bacteriana (BV) y vaginitis por levaduras son trastornos comunes en las mujeres en todo el mundo. Más del 75% de las mujeres tendrán por lo menos una infección vaginal en sus vidas, y el 50% de estas mujeres tendrán una recurrencia de la infección.

25 La vaginosis bacteriana generalmente muestra poca o ninguna inflamación del epitelio vaginal y se asemeja a más de una alteración del entorno vaginal bacteriana que a una infección propia de los tejidos o epitelio. La BV actualmente se trata principalmente con antibióticos. Sin embargo, los antibióticos también matan bacterias útiles presentes en el ambiente vaginal, tales como Lactobacilli, lo que resulta en un aumento del pH en el entorno vaginal y aumento del riesgo de recurrencia de la vaginosis bacteriana o el desarrollo de una infección vaginal diferente, tal como una infección por levadura

30 La levadura *Candida albicans* está presente en la mayoría de los humanos como un organismo comensal inocuo, pero puede provocar infecciones, por ejemplo, candidiasis cuando una persona experimenta una pérdida de la flora bacteriana normal. En pacientes severamente comprometidos inmunes, la *Candida albicans* se puede extender por todo el cuerpo y provocar infecciones sistémicas mortales.

35 Ciertas especies de *Lactobacillus* son las bacterias dominantes en un ecosistema vaginal sano, y mantienen un ambiente ácido de la vagina a través de la producción de ácido láctico.

40 Se considera que la acidez es uno de los mecanismos protectores de la vagina. Esta acidez se ha asociado con una disminución del riesgo de infecciones como clamidia, micoplasma genital, tricomoniasis, infección del tracto urinario y una disminución del transporte de bacterias en el introito (Hanna, N et al 1985, 1975, Stamey TA y Kaufman MF 1975, Stamey TA y Timothy MM 1975).

45 Un entorno favorable para el lactato que produce microbiota está generalmente presente, y resulta en un pH de aproximadamente 4 en las secreciones mucosas. Sin embargo, el entorno puede ser perturbado por factores tales como variaciones en la concentración de estrógeno durante ciertos períodos del ciclo menstrual y durante la menopausia, y también por una creciente ocurrencia de secreciones de varios tipos, por ejemplo, hemorragias menstruales prolongadas, descargas de sangre premenstruales, sangrado a mitad del ciclo y eyaculado. Los cuerpos extraños en la vagina, por ejemplo taponos, pesarios y aquellos insertados, por ejemplo, en relación con tratamiento con antibióticos y el lavado también puede llevar a un trastorno de la microbiota saludable de tal manera que se eleva el pH. Cuando el pH se eleva por encima de 4.5 se presenta un aumento de la tendencia hacia el crecimiento de bacterias anaeróbicas.

50 La vaginosis bacteriana es una indicación de que se ha debilitado la defensa contra la infección, que está parcialmente conferida por un pH bajo, y, en circunstancias desfavorables, esto conduce a infección real.

55 Los cambios en la biota bacteriana se asocian con cambios en el pH vaginal (Caillouette JC et al 1997). Durante BV se observa un cambio de lactobacilos dominado a una biota en el que predominan *G. vaginalis* y bacterias anaerobias. La presencia de bacterias anaeróbicas da lugar a aminos volátiles en un pH incrementado (<4.5).

60 Se mantiene un ambiente ácido por una flora de *Lactobacillus* que produce ácido láctico. Con el fin de que esta producción de ácido láctico se mantenga, se han hecho diversos intentos para proporcionar una reducción del pH para crear un entorno favorable necesario para protección contra infección.

65 Por ejemplo, el documento EP 0 257 007 se refiere a un agente para reforzar los mecanismos de protección naturales de la mucosa vaginal, al ayudar a restablecer el entorno productivo para lactobacterias. El agente comprende ácido láctico y una sustancia reguladora en un contenido tal que el pH se encuentra dentro del rango desde 3.5 hasta 4.

Un pH por debajo de 4 hace que sea más fácil que las especies de Lactobacillus recolonizen la vagina y de ese modo restauren la resistencia natural hacia el sobrecrecimiento por las bacterias relacionadas con BV.

5 El documento EP 1 782 794 se refiere a una composición anhidra y a un método para mantener un pH vaginal sano para controlar el olor vaginal. La composición se puede aplicar al área vaginal para bajar el pH vaginal y ayudar en el mantenimiento de dicho pH durante un período de tiempo.

10 El documento WO 06/001766 se refiere a una composición que comprende ácido láctico y lactoferrina y/o un fragmento de péptido de la misma para el tratamiento y/o profilaxis de afecciones en el tracto urogenital. Se propone la incorporación de lactoferrina o un fragmento de péptido de la misma para mejorar la actividad antimicrobiana de la composición.

15 El lactato dado en un gel ha mostrado ser efectivo contra el mal olor asociado con BV (Lactal). El gel de lactato también ha demostrado tener algunos efectos antibacterianos contra ciertas especies bacterianas asociadas BV. (véase Andersch B et al; Treatment of Bacterial vaginosis with an Acid cream: A comparison between the effect of Lactate gel and Metronidazole" Gynecol Obstet Invest 21:19-25, 1986).

El ácido láctico en el gel reduce el nivel de pH y es efectivo en la prevención del mal olor que aparece durante BV.

20 Sin embargo, la aplicación en forma de un gel se asocia a menudo con pérdida en la vagina que a menudo requiere el uso de alguna forma de protección sanitaria. Esto tiene un impacto en la aceptabilidad y cumplimiento de la terapia por parte del paciente.

25 De acuerdo con lo anterior, subsiste la necesidad en la técnica de encontrar una terapia local vaginal más eficiente para el tratamiento y/o prevención de vaginosis bacteriana y/o infecciones por hongos, especialmente infecciones por levaduras. De forma ideal, este tratamiento debe ser bien tolerado, bueno para manejar, así como proporcionar excelente aceptabilidad del paciente.

30 Resumen de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una terapia local vaginal para el tratamiento de trastornos urogenital que sea efectivo contra vaginosis bacteriana e infección por hongos, en infecciones por hongos particulares provocadas por especies de levaduras. La terapia debe ser fácil, conveniente y cómoda de administrar y proporcionar excelente aceptabilidad del pacientes

35 Este objetivo se consigue mediante un óvulo vaginal que comprende un vehículo inerte y ácido láctico o una sal del mismo, en el que el óvulo comprende ácido láctico o una sal del mismo en una concentración de 11 a 15% en peso.

40 Los presentes inventores han encontrado que un óvulo vaginal que tiene una concentración de ácido láctico o una sal del mismo en el rango de 11 a 15% en peso no sólo reduce el mal olor y crea un entorno ácido favorable en la vagina, sino que también es microbicida contra bacterias Gram-negativas y Gram positivas y la levadura Candida albicans. Esto no sólo se debe al bajo pH, sino también a la molécula de lactato en si misma.

45 Normalmente, el óvulo vaginal comprende ácido láctico o una sal del mismo en una concentración de 11 a 15% en peso, más preferiblemente 13 a 15% en peso. Estos intervalos de concentración han mostrado ser particularmente efectivos para matar las bacterias no deseadas en el tracto urogenital, por ejemplo, patógenos tales como E. coli, GBS y C. albicans.

50 El óvulo de acuerdo con la invención se administra convenientemente en la vagina y proporciona excelente aceptabilidad del paciente.

En realizaciones de la invención, el vehículo inerte comprende polietilenglicol (PEG).

55 El vehículo inerte permite la fabricación de un óvulo que es relativamente sólido a temperatura ambiente y en un entorno seco, pero que se funde a la temperatura corporal y en contacto con los fluidos corporales. De acuerdo con lo anterior, el agente activo, es decir, el ácido láctico o una sal del mismo se pone en contacto con el tejido vaginal luego de administración.

60 El polietilenglicol (PEG) se funde gradualmente en el entorno vaginal.

En realizaciones alternativas, el óvulo vaginal puede comprender adicionalmente una sustancia de neutralización.

Dicha sustancia se utiliza para regular el pH del ácido láctico.

65 Preferiblemente, el contenido de ácido láctico y sustancia de neutralización es tal que el pH se encuentra dentro del rango desde 3.5 hasta 4.5, preferiblemente cerca de 3.8. El pH no debe ser demasiado bajo, ya que el ácido puede

irritar el tejido vaginal o perjudicar el entorno para lactobacilos probióticos que requieren un ambiente moderadamente ácido.

Ejemplos de sustancias de neutralización adecuadas incluyen hidróxido de sodio.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de un óvulo vaginal para la producción de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de un trastorno en el tracto urogenital.

El medicamento tiene una actividad antimicrobiana.

Un trastorno en el tracto urogenital normalmente involucra un pH elevado y/o una microbiota alterada.

Normalmente, el trastorno se selecciona del grupo que consiste de vaginosis bacteriana, microbiota vaginal intermedia, y infecciones por levaduras.

En aún otro aspecto, la invención se relaciona con un óvulo vaginal que tiene las características mencionadas anteriormente para la profilaxis y/o tratamiento de un trastorno en el tracto urogenital.

La invención se relaciona adicionalmente con un método para la profilaxis y/o tratamiento de un trastorno en el tracto urogenital, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad farmacéuticamente efectiva de un óvulo vaginal que tiene las características mencionadas anteriormente.

Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes de y se aclararán con referencia a la realización(es) y ejemplos descritos adelante.

Descripción detallada de la invención

Es de gran importancia mantener el equilibrio entre los microorganismos en la vagina. En el tratamiento de infecciones vaginales es importante restablecer la biota dominada por lactobacilos.

En el trabajo de investigación que conduce a la presente invención, se encontró que se obtuvieron sorprendentemente buenos efectos cuando la concentración de ácido láctico o una sal del mismo en un óvulo vaginal estuvo en el rango de 5.5 a 15% en peso.

El óvulo vaginal de acuerdo con la presente invención refuerza los mecanismos de protección naturales de la mucosa vaginal, al ayudar a restablecer el entorno productivo para lactobacilos, al bajar el pH y también al ejercer una actividad antimicrobiana sobre una cantidad de microbios no deseados, por ejemplo, *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus*, *G. vaginalis*, y especies de *Prevotella*.

Un óvulo de acuerdo con la invención es fácil, conveniente y cómodo de administrar.

Por "óvulo vaginal" se entiende un óvulo vaginal, un comprimido vaginal o una cápsula vaginal.

El término "ácido láctico o una sal del mismo" significa que el óvulo puede comprender ácido láctico o una sal de ácido láctico; es decir lactato.

La concentración de ácido láctico o una sal del mismo debe estar en el rango de 11 a 15% en peso.

En este intervalo de concentración se matan diversas bacterias no deseadas presentes en el tracto urogenital.

Si la concentración de ácido láctico llega a ser demasiado alta, el sujeto al que se administra el óvulo podría experimentar síntomas no deseados, tales como una sensación de ardor.

La concentración preferida de ácido láctico o una sal del mismo está en el rango desde 11 hasta 15% en peso, por ejemplo desde 13 hasta 15% en peso. Se ha observado una muerte efectiva de agentes patógenos tales como *E. coli*, GBS y *C. albicans* en este intervalo de concentración.

El óvulo vaginal de acuerdo con la invención comprende un vehículo inerte.

Como se utiliza aquí, el término "vehículo inerte" se refiere a un vehículo que lleva la sustancia activa, en este caso ácido láctico o una sal del mismo en contacto con el tejido vaginal.

El vehículo inerte permite la fabricación de un óvulo que es relativamente sólido a temperatura ambiente y en un entorno seco, pero que se funde a temperatura corporal y en contacto con fluidos corporales.

Se puede utilizar cualquier vehículo inerte que tenga las características anteriores, pero normalmente se utiliza polietilenglicol (PEG).

5 En realizaciones de la invención, el vehículo inerte comprende polietilenglicol 600 y polietilenglicol 4000. Se puede variar la relación entre PEG 600 y PEG 4000 lo que permite que el tiempo de disolución de los óvulos vaginales sea variado. Las propiedades del vehículo inerte determinan el tiempo de disolución de los óvulos vaginales en la vagina.

El óvulo vaginal de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente una sustancia de neutralización.

10 Como se utiliza aquí, el término "sustancia de neutralización" se refiere a una sustancia para regular el pH del ácido láctico. Ejemplos de sustancias de neutralización incluyen hidróxido de sodio y amoníaco.

15 Preferiblemente, el contenido de ácido láctico y sustancia de neutralización es tal que el pH se encuentra dentro del rango desde 3.5 hasta 4.5, preferiblemente cerca de 3.8. El pH no debe ser demasiado bajo, ya que el ácido puede irritar el tejido vaginal o perjudicar el entorno para probióticos de lactobacilos que requiere un entorno moderadamente ácido. Se ha mostrado que un pH de 3.7 a 3.9 es particularmente ventajoso.

El óvulo vaginal también puede comprender un sustrato de crecimiento para especies de bacilos de ácido láctico.

20 Junto con un sustrato de crecimiento, el ácido láctico o una sal del mismo crea un entorno ideal para el crecimiento continuo de lactobacterias.

25 El sustrato de crecimiento puede ser $\alpha(1-4)$ glucanos que contienen ramificaciones $\alpha(1-6)$. Un ejemplo de un sustrato de crecimiento adecuado es glucógeno, que se encuentra en abundancia en las células epiteliales vaginales en mujeres fértiles y es un sustrato nutriente importante para los lactobacilos. El glucógeno se utiliza como el sustrato de crecimiento para los lactobacilos, de tal manera que el tratamiento no sólo resulta en el ajuste del nivel de pH a una cifra inferior por medio del suministro de ácido láctico, sino que también en el reestablecimiento de un entorno ventajoso para el crecimiento de lactobacilos con el fin de regenerar las condiciones naturales.

30 Otros ejemplos de sustratos de crecimiento son lactosa, dextrosa, glucosa, y amilopectina.

El ácido láctico se incorpora en una proporción en peso considerablemente mayor que el sustrato de crecimiento, por ejemplo en relaciones en peso de 20: 1 a 100: 1, en particular 80: 1.

35 El óvulo vaginal de la invención también puede comprender un agente de consistencia, que proporciona una consistencia adecuada del óvulo que se va a administrar por vía vaginal.

También se pueden agregar sustancias adicionales, tales como adyuvantes, portadores, conservantes, vitaminas, minerales, estrógenos, etc. y estas sustancias son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica.

40 La presente invención se refiere adicionalmente al uso de un óvulo vaginal para la producción de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de un trastorno en el tracto urogenital. También se refiere a un óvulo vaginal para la profilaxis y/o tratamiento de un trastorno en el tracto urogenital y a un método para la profilaxis y/o tratamiento de un trastorno en el tracto urogenital, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad farmacéuticamente efectiva de un óvulo vaginal que tiene las características mencionadas anteriormente.

45 Por un "trastorno en el tracto urogenital" se entiende cualquier alteración o trastorno en el tracto urinario o en los órganos genitales en una hembra y/o macho. En particular, la invención es adecuada para el tratamiento de afecciones en la vagina.

50 Por "profilaxis y/o tratamiento de un trastorno" se entiende cualquier tratamiento con el fin de curar o aliviar un trastorno de acuerdo con lo anterior, o prevenir el desarrollo de dicho trastorno.

55 Por una "cantidad farmacéuticamente efectiva" se entiende una cantidad del óvulo vaginal de acuerdo con la invención, que llevará al efecto farmacológico y/o terapéutico deseado. El efecto farmacológico y/o terapéutico deseado es, como se indicó anteriormente, curar o aliviar y/o prevenir el desarrollo de trastornos en el tracto urogenital.

60 Por un "paciente" se entiende cualquier mamífero humano o no humano, macho o hembra, en necesidad de ser tratado con el óvulo vaginal y/o método de acuerdo con la invención.

65 El óvulo vaginal tiene una actividad antimicrobiana. Se observa una muy buena actividad antimicrobiana a una concentración de lactato en el rango de 11 a 15% en peso. La actividad antimicrobiana se asocia con el ácido láctico o una sal del mismo. El lactato en el óvulo no sólo reduce el pH vaginal para crear un entorno favorable para Lactobacillus, sino que también es antimicrobiano en sí mismo.

Por una “actividad antimicrobiana” se entiende una actividad bacteriostática, fungistática, bactericida y/o fungicida, es decir, la capacidad de retardar el crecimiento de y matar ciertas bacterias y hongos, respectivamente.

5 Un trastorno que se va a tratar de acuerdo con la invención puede implicar un pH elevado y/o una microbiota alterada en el tracto urogenital. Por un “pH elevado” se entiende un pH por encima de 4.5.

10 Por una “microbiota alterada” se entiende una biota que tiene niveles anormalmente altos de bacterias asociadas con BV, tales como *G. vaginalis*, bacterias anaerobias gram-negativas (especies *Prevotella*, *Bacteroides*, y *Fusobacterium*), cocos gram-positivos anaeróbico, especies *Mobiluncus*, y/o niveles anormalmente altos de *E. coli*, estafilococos (*S. aureus*), y estreptococos, todo en combinación con niveles anormalmente bajos de lactobacilos. También los altos niveles de *Candida*, que puede resultar en vaginitis se consideran una microbiota vaginal alterada.

15 Por un “nivel anormalmente alto” se entiende un nivel que es de 100 a 1000 veces mayor que el nivel en una persona normal.

20 Por un “nivel anormalmente bajo” se entiende no predominante, es decir, no está presente o es menor que un morfotipo de lactobacilos por campo microscópico de inmersión, o menor o igual a otros morfotipos por campo de inmersión. (Evaluación de acuerdo con el “sistema de clasificación de Nugent”, utilizado internacionalmente para describir desequilibrio bacteriano en la secreción vaginal. Véase Nugent RP et al 1991, *J Clin Microbiol* 29 297-301).

Ejemplos de trastornos que se van a tratar con el óvulo vaginal de acuerdo con la invención son vaginosis bacteriana, microbiota vaginal intermedia, e infecciones por levaduras, por ejemplo infecciones por *Candida* (*Candida* vaginitis, *Candida* balanitis).

25 Adicionalmente, el óvulo vaginal de acuerdo con la invención se puede utilizar en el tratamiento de clamidia, micoplasma genital, tricomoniasis, infección del tracto urinario, enfermedad inflamatoria pélvica, VIH, gonococos e infecciones provocadas por el virus del papiloma humano (VPH). Adicionalmente, cualesquier combinaciones de los trastornos mencionados anteriormente se pueden tratar con el óvulo vaginal de acuerdo con la invención.

30 El óvulo vaginal de acuerdo con la invención también se puede utilizar por ejemplo en el tratamiento de eczema fúngico, pezones ulcerosis, como profilaxis contra enfermedades de transmisión sexual, o como un deslizante.

35 Adicionalmente, es posible combinar el óvulo vaginal de acuerdo con la invención con otros tratamientos farmacológicos convencionales para trastornos en el tracto urogenital, por ejemplo, el tratamiento con antibióticos y/o antimicóticos, tales como preparaciones de imidazol.

Los ejemplos específicos de un óvulo vaginal de acuerdo con la presente invención surgen de la siguiente composición de ejemplo:

40 Tabla 1: Constituyentes de un óvulo vaginal de acuerdo con la invención

Ácido láctico	0.250 g
NaOH	0.022 g
Glucógeno	0.003 g
PEG 4000	0.950 g
PEG 600	0.650 g
Masa total	1.875 g

Ejemplos

45 Ejemplo 1: Actividad antimicrobiana de lactato

Especies bacterianas

50 *E. coli* O6K5 (un patógeno de infección del tracto urinario), una cepa de *Streptococcus* del grupo B (GBS) CCUG 49086, y *C. albicans* ATCC 64549. Los microorganismos se incubaron durante la noche en medio BHI. Después de esto las suspensiones se transfirieron a nuevos tubos y se incubaron durante 2.5 h a 37°C. Las células se lavaron y se suspendieron en BHI (1/100, BHI_{dil}) diluido. Las suspensiones se midieron espectrofotométricamente a 590 nm y las concentraciones de los microorganismos se ajustaron de acuerdo con las curvas estándar. Las suspensiones bacterianas se ajustaron a 2×10^8 CFU por ml y *C. albicans* a 1×10^6 .

Óvulos de lactato

Un óvulo de lactato se disolvió en 0.5 ml de agua destilada. Se obtuvo una solución de lactato de 11.5%. Esta solución se utilizó en el ensayo microbicida.

Concentración mínima de microbicida de lactato

La solución de lactato se diluyó en serie en BHI_{dl} mediante etapas dobles en tubos (100 µl por tubo). Se agregaron soluciones de células bacterianas y de levadura en volúmenes de 10 µl para dar una concentración final de aproximadamente 2×10^7 y 1×10^5 células por ml, respectivamente. Los tubos se incubaron a 37°C en un agitador durante 2.5 h. Se tomaron cinco µl de cada tubo y se agregaron como una gota (por triplicado) sobre una placa de agar sangre y se incubaron durante la noche a 37°C. La muerte se expresó como unidades formadoras de colonias restantes (CFU) en relación con el inóculo. El límite inferior para detección de microorganismos fue de 200 CFU/ml. La viabilidad de cualquier microorganismo restante en los tubos se comprobó al diluir las soluciones restantes a 1/5 con medio de crecimiento, lo que resulta en una solución de lactato al 2.3% o menos, e incubación de los tubos durante la noche a 37°C. Al día siguiente, una vez más, se aplicaron µl de las soluciones como gotas sobre las placas de agar sangre y se incubaron a 37°C durante la noche.

Tabla 2: Efectos microbicidas del lactato contra E.coli, GBS y C.albicans.

Patógeno	Viabilidad restante Concentración de lactato, %:						
	11.5	5.8	2.9	1.4	0.7	0.35	0
E.coli	0	0	0	0	0	0	+ [#]
GBS	0	0	+	+	+	+	+
C.albicans	0	0.660.4 ^α	+	+	+	+	+

No existen colonias distinguibles (> 50 CFU por área => 10^4 CFU por ml). α porcentaje del inóculo

Resultados

Después de 2.5 h de incubación, se mató GBS a 100% en concentraciones de lactato 5.8 y 11.5%. Se mató C. albicans a 100% a 11.5% de lactato y a 99.4% a 5.8% de lactato. En contraste se mató E.coli a 100%, incluso mediante la menor concentración de lactato probada (0.35%). La incubación durante la noche de los tubos con medio de crecimiento agregado dio lugar al mismo patrón como se describe para la incubación a 2.5 h. La comparación del efecto fungicida de lactato con HCl a pH idéntico mostró que el lactato estuvo lejos de ser efectivo en matar C. albicans de HCl (figura 1).

Conclusión

Una concentración de lactato de $\geq 5.8\%$ efectivamente mata patógenos potenciales como E. coli, GBS y C. albicans.

La actividad microbicida se debe a bajo pH, pero también a la molécula de lactato en si misma.

Ejemplo 2: Pruebas sobre efecto antimicrobiano del ácido láctico a diferentes concentraciones

El objetivo del presente estudio se limitó a demostrar el efecto antimicrobiano del ácido láctico en dos cepas microbianas: Candida albicans y Escherichia coli, y evaluar el efecto de aumentar la concentración hasta 14 a 15%. Las condiciones simulan el entorno vaginal al ajustar del pH a 3.8 y la temperatura a 35 a 37°C. La prueba destinada a agregar inoculación de cepas de ensayo a recipientes con ácido láctico en diferentes concentraciones, y se incuban a 35 a 37°C en una incubadora. A intervalos especificados se tomaron muestras y se enumeraron los microorganismos supervivientes. Además de las soluciones de prueba se utilizaron controles en paralelo. En ambos recipientes se inocularon cepas con NaCl al 0.9% al mismo nivel, y se probaron en el intervalo especificado. El propósito de este control fue verificar que la cepa fuera viable durante la prueba completa. Un segundo control se utilizó sólo para Candida, en el que una solución de HCl se ajustó a pH 3.8 con NaOH, inoculado, se incubaron y se probaron en cada ocasión. Se estimó que el tiempo de exposición para las dos cepas con base en una pre-prueba realizada elaborada sobre Candida albicans, en ácido láctico al 8%, y en los ensayos anteriores con el lactato en este laboratorio, donde se había probado E coli en ácido láctico al 2.5 y 5%.

Esbozo del estudio

Cultivos y soluciones:

Se eligieron Candida albicans ATCC 64549 y Escherichia coli ATCC 8739 que representan de cepas comúnmente aisladas en infecciones por levaduras y vaginosis bacteriana. Las cepas se inocularon en placas de agar Dextrosa Sabouraud (SDA) y agar de soja triptona (TSA), respectivamente, a 35 a 37°C durante 18 a 24 horas. El crecimiento

superficial se recogió, se enjuagó y las suspensiones se diluyeron a una densidad óptica definida. El título se determinó al medir la absorbancia a 540 nm.

5 Se suministró ácido L(+)-láctico de Purac Biochem fue suministrado por Kullgren Pharma, Gnesta, Suecia, como una solución de concentrado al 90%. Este se diluyó a 5.8 y 14.5% v/v, se ajustó mediante adición de NaOH a pH 3.8, se filtró por esterilización y se agregó a recipientes de prueba. Otros recipientes contenían controles, NaCl al 0.9% estéril pH 7 y HCl pH 3.8. Las soluciones luego se preconditionaron a 35 a 37°C en la incubadora antes de agregar la inoculación e iniciar la exposición.

10 Pruebas de exposición:

15 Los recipientes se inocularon con 10^5 a 10^6 células por ml, y se inició la incubación. Para E. coli se tomaron pruebas a los 0, 10, 20, 60 y 240 minutos. Para C. albicans se tomaron muestras a las 0 h, 6 h y 24 h. Las diluciones se elaboraron de acuerdo a un protocolo detallado, las muestras se extrajeron de los recipientes de ensayo y se filtraron a través de filtros de 0.45 μ m. Los filtros se enjuagaron con 3 porciones de 100 ml de NaCl al 0.9% y después se colocaron sobre placas de agar, TSA y SDA respectivamente. Se utilizaron muestras individuales.

Validación del método:

20 Debido a que la validación del método para la prueba previa había mostrado que las alícuotas de ácido láctico hasta una concentración de 8% se podrían filtrar y enjuagar como se describe, sin inhibir el crecimiento en los filtros en placas, se decidió realizar dichas validaciones con la concentración más alta, 14.5%, con ambas cepas, directamente en paralelo con la prueba, para ambas cepas. Para este propósito se filtró una muestra estéril de ácido láctico al 14.5% pH 3.8, el filtro se enjuagó y se incluyó 10-100 CFU de la cepa de prueba en el enjuague final. Un segundo filtro sin tratamiento de lactato se enjuagó en paralelo, se colocó en placa y ambas placas se incubaron. Las cantidades de CFU resultantes en las dos placas deben coincidir dentro de 50 a 200% para que el método sea válido. Esto se repitió para ambas cepas. Los resultados para ambas cepas cumplen el criterio de aceptación (datos no mostrados).

30 Resultados y discusión

35 Los resultados se dan en la tabla 3 y 4. Para E. coli, la inactivación es rápida, y no se encuentran supervivientes después de 10 minutos de exposición (véase tabla 3). En el tiempo 0, que significa un tiempo de exposición de 1 a 2 minutos, mientras que la muestra se toma y se prueba, para la muestra al 5% hubo una reducción de 4.5×10^5 (como se ve en el control) a 1.3×10^3 , que es igual a $2.6 \log$. La concentración al 14.5% no tenía ningún superviviente en la muestra de tiempo 0. El control verifica que los organismos de inoculación fueron viables en un entorno neutro.

Tabla 3: Supervivencia de E coli en ácido láctico (resultados se presentan como CFU/ml)

Tiempo de exposición	Control NaCl al 0.9 % pH 7	Ácido láctico al 5 %	Ácido láctico al 14.5 %
0 min	4.5×10^5	1.3×10^3	0
10 min	5.0×10^5	0	0
20 min	3.7×10^5	0	0
60 min	3.5×10^5	0	0
240 min	2.0×10^5	0	0

40 Tabla 4: Supervivencia de C. albicans en ácido láctico (resultados se presentan como CFU/ml)

Tiempo de exposición	Control NaCl al 0.9 % pH 7	Control HCl pH 3.8	ácido láctico al 8%	ácido láctico al 14.5%
0 h	3.3×10^5	2.9×10^5	3.6×10^5	1.8×10^5
6 h	3.1×10^5	3.4×10^5	8.4×10^4	1
24 h	2.4×10^5	2.0×10^5	9.8×10^3	2

45 Para Candida albicans la muestra al 8% mostró una reducción después de 6 horas de 0.6 logs, y después de 24 horas de 2.2 logs; es decir, una reducción de 97.2%.

Para la muestra al 14.5% hubo una reducción 5,3 log después de 6 horas; es decir, una reducción de > 99.999%. Los controles verificaron que las células fueran viables en un entorno neutro, y que la reducción no fuera provocada por la reducción a pH a 3.8, sino por el ácido láctico en sí mismo.

50 Conclusión

Se ha mostrado en una prueba limitada, que el ácido láctico tiene un efecto antimicrobiano muy rápido en E coli a ambas concentraciones probadas, pero que tiene un efecto mucho más rápido en 14.5% que en 5%. Similarmente, el ácido láctico al 8% también tiene un efecto antifúngico verificado sobre Candida albicans, visto tanto en la prueba de 6

horas, como en la prueba de 24 horas. La concentración de 14.5% muestra una reducción mucho más rápida, y dentro de las 6 horas se reduce la inoculación hasta que es prácticamente nula.

5 Ejemplo 3: Tratamiento de descarga vaginal anormal: un estudio comparativo sobre los efectos con óvulos vaginales y cremas vaginales

Bosquejo de estudio

10 Treinta pacientes que se quejan de una descarga vaginal anormal recibieron tratamiento con óvulos vaginales en una sola dosis intravaginal única aplicada todas las noches antes de dormir, durante siete días.

Durante el tratamiento, a las mujeres se les dijo que evitaran tomar cualquier otro medicamento o utilizar productos higiénicos intravaginales. La segunda visita tuvo lugar después de una semana de tratamiento.

15 Óvulo vaginal

La composición del óvulo vaginal administrada fue como se ilustró en la Tabla 1 anterior. La concentración de ácido láctico fue de 13% en peso y el pH fue 3.8.

20 Gel de Lactal

La composición del gel de lactal fue como sigue:

Ácido láctico	5.0 g
NaOH para regular el ácido láctico a a pH de 3.8	4.1 g
Glucógeno	0.1 g
Propilenglicol (85%, restante H ₂ O)	15 g
Agente de consistencia tal como metil hidroxipropil éter de celulosa que proporciona una forma de gel	100 g

25 La concentración de ácido láctico era 5% en peso.

Laboratorio y cuestionarios

1. prueba de amina/prueba de olor

30 Después del retiro del espéculo, una pequeña cantidad de hidróxido de potasio al 10% (KOH) se goteó sobre el espéculo, donde siempre se encontró algo de secreción. Se registró un olor a pescado podrido como positivo.

2. Mediciones de pH

35 La descarga vaginal recogida se raspó con un papel (Merck, Darmstadt, Alemania) y se leyó en comparación con la lectura estándar proporcionada por el fabricante.

3. Frotis húmedo

40 El fluido vaginal se recolectó de fornix posterior y se mezcló con solución salina normal para examen microscópico. Se identificaron células indicadoras como las células epiteliales vaginales con bacterias adherentes que oscurecían el borde de la célula.

4. Aceptabilidad

45 Se evaluó la aceptabilidad por los pacientes en un cuestionario en la visita de control. La aceptabilidad se evaluó como excelente, buena o nula.

5. Se evaluaron la tolerancia o efectos adversos por el paciente en un cuestionario.

6. El diagnóstico de BV se hizo si la descarga del paciente cumplía tres de los siguientes criterios (criterios Amsel (1)): (A) pH > 4.5, (B) prueba de aminas positiva, (C) La presencia de células indicadoras en el frotis húmedo.

50

Resultados

Mediciones de pH

Mediciones hechas por el doctor	pH<4.5	pH>4.5
	N	N
Antes de utilizar los óvulos de Lactal	0	30
Después de utilizar los óvulos de Lactal	30	0

55 Prueba de amina/Whiff

Prueba positiva en porcentaje
 Día 1 Día 7
 100% 0%

Células indicadoras
 Día 1 Día 7
 100% 0%

5 El número de mujeres con mejora tratadas con gel de Lactal en comparación con óvulos vaginales.

Las mujeres que carecían de todos los tres criterios Amsels se mejoraron clínicamente.

Criterio Amsels	Mejorado clínicamente	No mejorado clínicamente
Gel de Lactal (7)	24	7
Óvulos de Lactal	30	0

10 Prueba exacta de Fisher, bilateral

Valor P = 0.0107

15 Mejora de mal olor

Treinta mujeres (100%) evaluadas no presentaron ningún olor en el día siete. En 27 mujeres el olor ya desapareció después de tratamiento de un día. Ninguna de las mujeres experimentó empeoramiento del olor durante el período de estudio.

20 Aceptabilidad

La aceptabilidad del tratamiento local se analizó por los pacientes y 28 mujeres (93%) juzgaron la aceptación del tratamiento como excelente y dos mujeres como bueno. 27 (90%) mujeres tenían que usar protectores de ropa interior durante el período de tratamiento. 25 mujeres prefirieron los óvulos vaginales sobre el gel de Lactal.

Tolerancia o efectos adversos

30 La tolerancia evaluada por el médico y por los pacientes permitió la detección de efectos adversos en sólo una mujer. Se quejaba de leves sensaciones de ardor y pudo continuar el tratamiento, todos los días.

Conclusión

35 La aceptabilidad y preferencia de los pacientes son aspectos importantes de la terapia vaginal local. El tratamiento debe ser fácil, conveniente y cómodo de administrar. El presente estudio confirma que se tolera bien el uso de los óvulos vaginales, tienen buen manejo y recibe excelente aceptabilidad del paciente. Las mujeres experimentaron facilidad y comodidad para administrar los óvulos. Los óvulos se empaquetan individualmente lo que proporciona un alto estándar de higiene. La excelente aceptación del paciente de los óvulos vaginales podría resultar en un mejor cumplimiento de la medicación y tratamiento contra BV más consistente.

40 Se han tratado treinta pacientes con óvulos vaginales y no se reportaron reacciones adversas significativas de drogas. Sólo un paciente se quejó de reacción de ardor leve pero fue capaz de continuar el tratamiento.

45 A pesar del número limitado de pacientes en este estudio parece ser que el uso de óvulos vaginales podría ser de particular interés en el tratamiento de mujeres con BV. Hemos observado que todas las mujeres se mejoraron clínicamente en relación con el síntoma del mal olor y que el nivel de pH en la secreción vaginal se redujo por debajo de 4.5 y no se encontraron células indicadoras.

50 Por lo tanto, se ha mostrado que los óvulos vaginales son seguros y efectivos en la restauración de un pH vaginal normal después de un régimen de tratamiento de 7 días. Demostramos que los óvulos vaginales en comparación con gel de Lactal (7) fueron significativamente más eficaces de acuerdo con los criterios Amsels en el tratamiento de mujeres con BV. La concentración de lactato en los óvulos es mayor que en el gel de Lactal y el efecto clínicamente no sólo se ejerce por su bajo pH, sino también por el lactato en sí mismo. Hemos encontrado que el lactato es más efectivo que el HCl contra especies microbianas y más potentes a mayor concentración (6).

55 El producto fue tolerado de forma excelente y muy bien recibido y por lo tanto, merece un lugar entre el arsenal terapéutico para estas alteraciones del ecosistema vaginal.

Referencias

1. Andersch B, Brandberg A, Hoist E. The treatment of bacterial vaginosis - an acidifying gel instead of antibiotic therapy-
Lakartidningen 1998;87:465-468
5
2. Gine L, Lopez Castejon A, JuNa E, Carreras R, Balaguero L New therapeutic techniques. Use of a lactic acid and
glycogen gel in vaginitis. Clinical Study. Toko Ginecologia Practica 2001;60:337-386
3. Massimo B and Andersch B Etude clinique multicentrique pour evaluer le'fficacite de Geliofil gel Rapport de'ssai Effik .
Unpublished data 1996:1-2
10
4. Andersch B Agent for treating conditions in the vagina EPO 257007A1, 1988
5. Mead , Philip B, Epidemiology of Bacterial vaginosis. Am J of Obstet and Gynecol 1993;169:446-449
15
6. Mattsby- Baltzer I manuscript 2008
7. Andersch B Forssman L, Lincoln K, Torstensson P, Treatment of Bacterial Vaginosis with an Acid Cream: A
Comparison between the Effect of Lctate-Gel and Metronidazole Gynecol obstet Invest 1986,21:19-25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un óvulo vaginal que comprende un vehículo inerte y ácido láctico o una sal del mismo para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos en el tracto urogenital, caracterizado porque dicho óvulo comprende ácido láctico o una sal del mismo en una concentración de 11 a 15% en peso.
2. Un óvulo vaginal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho óvulo comprende ácido láctico o una sal del mismo en una concentración de 13 a 15% en peso.
- 10 3. Un óvulo vaginal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho vehículo inerte comprende polietilenglicol (PEG).
4. Un óvulo vaginal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente una sustancia de neutralización.
- 15 5. Un óvulo vaginal de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el contenido de ácido láctico y sustancia de neutralización es tal que el pH se encuentra dentro del rango de 3.5 a 4.5.
- 20 6. Un óvulo vaginal de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que dicha sustancia de neutralización es hidróxido de sodio.
7. Uso de un óvulo vaginal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la producción de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de un trastorno en el tracto urogenital
- 25 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho medicamento tiene una actividad antimicrobiana.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 7 o 8, en el que dicho trastorno involucra un pH elevado y/o una microbiota alterada en el tracto urogenital.
- 30 10. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que dicho trastorno se selecciona del grupo que consiste de vaginosis bacteriana, microbiota vaginal intermedia, y infecciones por levaduras.
11. Un óvulo vaginal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en la profilaxis y/o tratamiento de un trastorno en el tracto urogenital.
- 35 12. Un óvulo vaginal para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho óvulo tiene una actividad antimicrobiana.
13. Un óvulo vaginal para uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que dicho trastorno involucra un pH elevado y/o una microbiota alterada en el tracto urogenital.
- 40 14. Un óvulo vaginal para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicho trastorno se selecciona del grupo que consiste de vaginosis bacteriana, microbiota vaginal intermedia, y infecciones por levaduras.

Figura 1

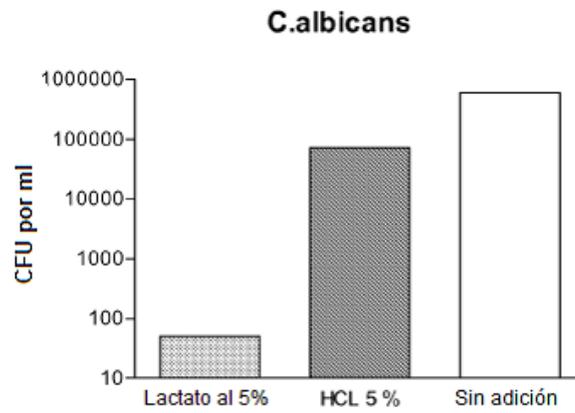


Figura 1 Efecto fungicida del lactato o HCl diluido en bactopectona sobre *C. albicans* después de 2 h de incubación a 37°C. La concentración de células de levadura se analizó mediante conteos viables. El pH se ajustó a 3.8 en las soluciones ácidas