

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 500 166**

51 Int. Cl.:

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2007 E 07839029 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2077729**

54 Título: **Formas probióticas de dosificación oral**

30 Prioridad:

27.09.2006 US 528893

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

30.09.2014

73 Titular/es:

**LITTLE CALUMET HOLDINGS, LLC (100.0%)
4815 Prince Georges Avenue, Suite 103
Beltsville, MD 20795-2569, US**

72 Inventor/es:

**HODAL, E. FRANK y
WEINRICH, KARL P.**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 500 166 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

Formas probióticas de dosificación oral

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere generalmente a formulaciones probióticas y más específicamente a formas probióticas de dosificación oral que permanecen estables en condiciones de almacenamiento.

10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

El tracto gastrointestinal ("GI") es un micro-ecosistema complejo en el que el revestimiento de la mucosa del huésped coexiste con billones de microorganismos que viven o que se unen al revestimiento. Entre los microorganismos que habitan en el tracto GI se encuentran bacterias "probióticas", que ayudan a mantener la salud del tracto GI del organismo del huésped. Dentro del tracto GI del huésped, las bacterias probióticas están provistas de refugio y apoyo, y cantidades abundantes de sustratos alimenticios y a cambio de ésto, ofrecen al huésped una diversidad de usos terapéuticos potenciales que incluyen sustitución de las bacterias intestinales destruidas por los antibióticos; ayuda a la digestión y supresión de bacterias que causan enfermedades; prevención y tratamiento de diarrea, incluyendo la diarrea infecciosa, particularmente a causa de rotavirus (un virus que causa diarrea habitualmente en niños); tratamiento de crecimiento excesivo de organismos "malos" en el tracto gastrointestinal (una afección que tiende a causar diarrea y que se puede producir por el uso de antibióticos); alivio de los síntomas del síndrome del intestino irritable y, posiblemente, enfermedad inflamatoria intestinal (tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); prevención y/o reducción de la recurrencia de infecciones vaginales por levaduras, infecciones del tracto urinario, y cistitis (inflamación de la vejiga); mejora de la digestión de absorción de lactosa en personas que son intolerantes a la lactosa; y mejora de la respuesta inmune. Dado que los probióticos tienen muchos usos beneficiosos, en la técnica existe una necesidad de suplementos probióticos.

Entre los probióticos que se pueden incluir en un suplemento, se encuentran *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, la subsp. *lactis* de *B. animalis*, *B. longum*, *Streptococcus thermophilis*, *Enterococcus faecalis*, y *E. faecium*, todos los cuales se encuentran en el tracto GI y vaginal de seres humanos. Las especies de *Lactobacillus* son bacterias ácido lácticas gram-positivas que absorben lactosa y otros monosacáridos en el tracto intestinal para producir ácido láctico, que tiene el efecto beneficioso de disminuir el pH de los órganos haciendo el entorno de los órganos hostil para el crecimiento de bacterias nocivas. Las especies *Bifidobacterium* son las primeras especies de microorganismos en colonizar el colon estéril de un bebé recién nacido que es amamantado por su madre. Las *Bifidobacterias* usan el mecanismo de aglomeración para digerir los nutrientes que de otro modo las bacterias nocivas usarían para la reproducción. Los suplementos probióticos pueden tener hasta aproximadamente 10 billones de unidades de formación de colonias por suplemento.

En particular, *L. acidophilus* tiene el efecto beneficioso adicional de producir las sustancias antimicrobianas (es decir, antibióticos naturales) acidolina, acidofilina, lactocidina, y bacteriocina, que aumentan la resistencia del sistema inmune frente a hongos, tales como *Candida albican*, y las especies de bacterias nocivas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, y salmonella.

L. bulgaricus mejora la capacidad de digestión de proteínas y productos lácteos, ayuda en la producción de antibióticos naturales, y se ha usado para tratar trastornos gastrointestinales tales como enterocolitis.

Se ha encontrado que *L. casei* tiene una capacidad protectora frente a bacterias de listeria patógenas.

Se ha encontrado que *L. fermentum* evita que el virus de la inmunodeficiencia humana ("VIH") infecte células inmunes en niños (De Reuters Health, 25 de mayo de 2004, autor Karla Gale, disponible en <http://pronutrition.org/archive/200406/msg00002.php>).

L. plantarum ayuda en la producción de lactolina, un antibiótico natural, y sintetiza L-lisina.

L. salivarius es una bacteria facultativa (es decir, una especie de bacteria que sobrevive y crece en entornos tanto anaeróbicos como aeróbicos) que es la más abundante en la boca y encías. *L. salivarius* tiene varias ventajas como probiótico: tiene la capacidad de descomponer proteínas sin digerir y separar las toxinas producidas por putrefacciones de proteínas; es útil para prevenir y para luchar frente a *Helicobacter pylori*, que se sabe que es una causa de las úlceras; y dado que su población se duplica cada 20 minutos, se pueden administrar cantidades más pequeñas del probiótico a un paciente, proporcionando de este modo una ventaja económica para el uso del probiótico.

L. rhamnosus tiene una estabilidad excelente en un amplio intervalo de temperaturas y niveles de pH; éste alivia las reacciones de hipersensibilidad e inflamación intestinal en individuos con eccema y alergias alimentarias.

B. animalis es una bacteria probiótica que desempeña un papel en la defensa de la mucosa intestinal. *B. animalis* presenta dos subespecies: subsp. *animalis* de *B. animalis* y subsp. *lactis* de *B. animalis*, ambas de las cuales, antes de 2004, se denominaban *B. animalis* y subsp. *lactis* de *B. animalis*. Masco *et al.*, INT'L J SYST EVOL BIOL 54: 1137-1143 (2004). Dado que la subsp. *animalis* de *B. animalis* solamente crece en entornos anaeróbicos y es incapaz de crecer en cultivos lácticos, no es útil como un probiótico. Por el contrario, la subsp. *lactis* de *B. animalis*, que es una bacteria ácido láctica caracterizada por su alta resistencia al oxígeno y producción de cantidades considerables de formiato, crece bien en cultivos lácticos y por lo tanto, es útil como probiótico. La subsp. *lactis* de *B. animalis* se añade en fórmulas infantiles para asegurar que los bebés recién nacidos que no se están amamantando tienen una colonización suficiente de bifidobacterias y es la única especie de bifidobacterium que se encuentra en cultivos de yogur.

B. bifidum inhibe el crecimiento de las especies de bacterias nocivas salmonella, listeria, shigella, *E. coli*, y *Clostridium perfringens* mediante el consumo de sus nutrientes, tales como por ejemplo, iones ferrosos, que muchas especies de bacterias nocivas necesitan para su crecimiento. Además, *B. bifidum* sintetiza algunas vitaminas y ayuda en la absorción de minerales tales como calcio, magnesio, y cinc.

B. infantis es el primer probiótico que coloniza el tracto digestivo estéril de un niño que es amamantado por su madre. Para niños que se alimentan con fórmulas, este probiótico se puede administrar en forma de suplemento con el fin de garantizar que el recién nacido tenga la flora intestinal apropiada.

Se ha encontrado que *B. longum* biovar *longum* (denominado *B. longum*) es capaz de eliminar nitratos del tracto intestinal.

S. thermophilis genera actividad de lactasa, que facilita la digestión de la lactosa en la leche.

E. faecalis y *E. faecium* son ambas bacteria ácido lácticas que presentan efectos inhibidores frente a agentes enteropatógenos tales como *E. coli*, salmonellae, shigellae y Clostridia.

La Patente de Estados Unidos Nº 4.518.696 de Gehrman *et al.* presenta el uso de aceite de girasol como un medio líquido de suspensión para preparar células secas de lactobacillus viables que son estables a temperatura ambiente.

La Patente de Estados Unidos Nº 5.466.463 de Ford presenta un supositorio vaginal que contiene un agente antimicrobiano y una colonia viable de bacterias lactobacilli microencapsuladas; las bacterias se microencapsulan para protegerlas de la acción del agente antimicrobiano.

Las Patentes de Estados Unidos Nº 5.614.209; Nº 5.633.012; Nº 5.635.202; y Nº 5.733.568 todas de Ford presentan bacterias lactobacilli microencapsuladas para administración oral y tópica a mamíferos que tienen 10^3 lactobacilli microencapsulados viables en cada dosis individual.

La Patente de Estados Unidos Nº 6.706.287 de Ranganathan *et al.* presenta probióticos microencapsulados y/o revestidos de forma entérica, tales como especies de bacterias de lactobacillus y bifidium, que son capaces de metabolizar urea y amoníaco en aminoácidos.

El documento WO 01/95918 se refiere a comprimidos de bacterias ácido lácticas formados por mezcla de bacterias ácido lácticas y un vehículo, en los que el vehículo se prepara para que comprenda inulina sorbitol y celulosa. La presión usada en el proceso de formación de comprimidos es preferentemente de 30-35 N, inferior a la de los procesos convencionales.

El documento WO 2005/032591 describe una composición que comprende una bacteria probiótica para aumentar la función renal. Las composiciones pueden contener al menos un hidrato de carbono, al menos una grasa y al menos una proteína.

El documento WO 2005/060937 describe una composición probiótica en forma de un comprimido formado por compresión, y que comprende un agente estabilizante que facilita la preparación de los comprimidos. El agente estabilizante comprende un antioxidante, un agente para aumentar el volumen y un gelatinizador.

El documento de patente US 2006/182727 proporciona bacterias ácido lácticas en particular y composiciones que comprenden las bacterias y un vehículo. El vehículo que comprender, entre otros componentes, un alcohol de azúcar.

Una desventaja de muchas de las formulaciones probióticas en el mercado es el periodo de caducidad corto de las formulaciones; en consecuencia, existe en la técnica una necesidad de formulaciones probióticas con mayor periodo de caducidad que tengan colonias vivas de bacterias probióticas, tales como por ejemplo, lactobacillus y bifidobacterium.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención supera la necesidad en la técnica de proporcionar una composición probiótica que incluya un vehículo que comprenda al menos dos alcoholes de azúcar seleccionados entre manitol y sorbitol.

5 En una realización de la invención, se proporciona una composición que comprende al menos una especie probiótica en un vehículo formado por al menos dos alcoholes de azúcar seleccionados entre el grupo que consiste en manitol y sorbitol.

10 En otra realización de la invención, se proporciona un método para mejorar la estabilidad de una composición probiótica que comprende la combinación de al menos una especie probiótica con un vehículo formado por al menos dos alcoholes de azúcar seleccionados entre el grupo que consiste en manitol y sorbitol.

15 En la composición y en el método de la presente invención, el vehículo puede comprender adicionalmente un agente disgregante, una sustancia de deslizamiento, y/o un lubricante. El agente disgregante puede ser cualquier agente disgregante adecuado tal como, por ejemplo, un agente disgregante seleccionado entre el grupo que consiste en croscarmelosa sódica, crospovidona, goma de gelano, hidroxipropil celulosa, almidón, y almidón glicolato sódico. La sustancia de deslizamiento puede ser cualquier sustancia de deslizamiento adecuado tal como por ejemplo, una sustancia de deslizamiento seleccionada entre el grupo que consiste en dióxido de silicio, dióxido de silicio coloidal, y talco. El agente lubricante puede ser cualquier agente lubricante adecuado tal como por ejemplo, un agente lubricante seleccionado entre el grupo que consiste en estearato cálcico, estearato de magnesio, ácido esteárico, estearil fumarato sódico, y ácidos grasos basados en vegetales. En la composición y método de la presente invención, el vehículo está presente en la composición en un intervalo de aproximadamente un 30 % en p/p a aproximadamente un 98 % en p/p; este porcentaje de peso es un porcentaje de peso acumulativo teniendo en cuenta todos los ingredientes presentes en el vehículo.

25 En la composición y método de la presente invención, el probiótico puede ser cualquier especie probiótica tal como por ejemplo, una especie probiótica seleccionada entre el grupo que consiste en *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, la subsp. *lactis* de *B. animalis*, *B. longum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, y *E. faecium*. Además, se contemplan combinaciones de especies probióticas en la composición y método de la presente invención tales como, por ejemplo, una combinación de *L. acidophilus* y subsp. *lactis* de *B. animalis*. La concentración de probióticos contemplada en la composición y método de la presente invención está en un intervalo de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{10} colonias por forma de dosificación; esta concentración es un intervalo de concentración individual para cada especie probiótica presente en la composición.

35 En la composición y método de la presente invención, la composición puede incluir adicionalmente un fitonutriente, tal como por ejemplo, un fitonutriente que se selecciona entre catequinas, polifenoles, y proantocianidinas oligoméricas (OPC). Cuando el fitonutriente es OPC, éste se puede obtener de pepita de uva o de corteza de pino y se incorpora en la composición en un intervalo de aproximadamente un 0,5 % en p/p a aproximadamente un 10 % en p/p.

40 En la composición y método de la presente invención, la composición puede incluir adicionalmente una vitamina, un mineral dietético, y/o un mineral traza. La vitamina se puede seleccionar entre el grupo que consiste en vitamina A (retinol), vitamina B₁ (tiamina), vitamina B₂ (riboflavina), vitamina B₃ (niacina), vitamina B₅ (ácido pantoténico), vitamina B₆ (piridoxina), vitamina B₇ (biotina), vitamina B₉ (ácido fólico), vitamina B₁₂ (cianocobalamina), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina D₁ (lamisterol), vitamina D₂ (ergocalciferol), vitamina D₃ (dihidrotaquisterol), vitamina D₄ (7-deshidrositosterol), vitamina E (tocoferol), y vitamina K (naftoquinona). El mineral dietético se puede seleccionar entre el grupo que consiste en calcio, cloruro, magnesio, fósforo, potasio, sodio, y azufre. El mineral traza se puede seleccionar entre el grupo que consiste en cromo, cobalto, cobre, flúor, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, selenio, y cinc.

50 La composición de la presente invención puede ser una forma de dosificación oral, un polvo que se mezcla en un líquido, o una goma de mascar. Cuando la composición es una forma de dosificación oral, la forma de dosificación oral se puede seleccionar entre el grupo que consiste en comprimidos, comprimidos encapsulados, y cápsulas, en la que los comprimidos y los comprimidos encapsulados pueden ser sólidos o masticables. Cuando la composición es un polvo, ésta se puede mezclar en un líquido que se selecciona entre el grupo que consiste en agua, leche, zumo, y yogur. Cuando la composición es una goma de mascar, la goma puede ser goma blanda o comprimidos de goma de mascar dura.

60 Mediante la combinación de especies probióticas con los alcoholes de azúcar manitol y sorbitol, solos o junto con el alcohol de azúcar adicional lactitol y/o un fitonutriente, tal como OPC, los presentes inventores han descubierto que la estabilidad de las formulaciones probióticas es sorprendente e inesperadamente mayor en diversas condiciones de almacenamiento.

65 Aspectos adicionales, ventajas y características de la invención se establecerán, en parte, en la descripción que sigue, y, en parte, serán evidentes para los expertos en la materia después del examen de lo que sigue a continuación, o se pueden aprender mediante la práctica de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra los resultados de los ensayos de estabilidad de *L. acidophilus* que se describen en los Ejemplos 11 y 12 (Tablas 32 y 34).

MODOS PARA REALIZAR LA INVENCION

A continuación se presenta una descripción de realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención. Las definiciones que se exponen a continuación se proporcionan únicamente con el fin de describir las realizaciones a modo de ejemplo y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención. Dado que las realizaciones que se describen en el presente documento son a modo de ejemplo, se debe entender que la invención, tal como se describe, contempla modificaciones en la función, fin, y/o estructura de las realizaciones a modo de ejemplo.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "animal" se refiere a una especie no humana y el término "organismo" se refiere tanto a especies animales como humanas. Aunque el término "animal" tal como se usa en el presente documento se usará por lo general para hacer referencia a mamíferos, el término no es exclusivo para mamíferos y cuando sea apropiado puede incluir tanto a mamíferos como a no mamíferos.

El término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte que por lo general se usa como un diluyente o vehículo para un fármaco o suplemento dietético.

El término "probiótico" se refiere a un género de bacterias que tienen un efecto beneficioso en órganos animales, tales como el tracto GI y vaginal humano. Los géneros de bacterias usados más a menudo como probióticos son lactobacilli y bifidobacteria; sin embargo, otras especies de bacterias beneficiosas, tales como *S. thermophilis* también son probióticos. Después del paso a través del estómago e intestino delgado, algunos probióticos sobreviven y se llegan a establecer de forma transitoria en el intestino grueso, en el que la capacidad de fermentación del colon se ve modificada de forma positiva. Véase, por ejemplo, Roberfroid, AM J CLIN NUTR 71 (SUPPL): 1682S-1687S (2000).

Las especies probióticas que se pueden usar en las composiciones de la presente invención pueden ser cualquier probiótico conocido, tales como, por ejemplo, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *B. bifidum*, *B. infantis*, la subsp. *lactis* de *B. animalis*, *B. longum*, *S. thermophilis*, *E. faecalis*, y *E. faecium*. Se debe observar que la lista anterior solamente pretende ser ilustrativa y no una representación limitante de los probióticos que se pueden incluir en las composiciones probióticas de la presente invención. A este respecto, cualquier especie probiótica adicional también se puede usar en las composiciones de la presente invención, tales como, por ejemplo, cualquier especie de lactobacillus o bifidobacterium conocido y/o disponible adicional.

El término "prebiótico" se refiere a un ingrediente alimentario no digerible que afecta de forma beneficiosa al huésped mediante la estimulación de forma selectiva del crecimiento y/o actividad de una o más especies probióticas en el colon, tales como por ejemplo, lactobacilli y/o bifidobacteria. Dado que los prebióticos tienen una estructura química que resiste a la digestión a través del tracto alimentario, éstos alcanzan el colon como moléculas intactas en el que son capaces de provocar funciones fisiológicas sistémicas y actuar como sustratos fermentables para la microflora del colon. Ejemplos de prebióticos incluyen fructooligosacáridos, tales como inulina, que se extrae de achicoria, alcachofas, espárragos, dientes de león, dalias, escarola, ajo, puerros, pechuga, y cebollas; transgalactosiloligosacáridos; galactosillactosa; isomaltoligosacáridos; rafinosa; lactulosa; lactitol (un alcohol de azúcar); y goma guar parcialmente hidrolizada. El prebiótico usado más comúnmente es la inulina. Aunque se ha encontrado que la inulina es un buen sustrato para especies de bacteroides y bifidobacterium (excluidas *B. bifidum* y *B. longum*) no es un sustrato excelente para otros probióticos. Roberfroid *et al.*, NUTR. REV. 51: 137-146 (1993). Cuando un prebiótico se combina con un probiótico, el suplemento resultante se denomina en ocasiones "simbiótico".

Un ejemplo de un prebiótico que se puede usar con las composiciones probióticas de la presente invención es el alcohol de azúcar lactitol, que se usa comercialmente en la actualidad como un edulcorante de sustitución para alimentos bajos en calorías. El lactitol tiene dos calorías (9 kilojulios) por gramo y aproximadamente un 40 % del dulzor de azúcar. La Food and Drug Administration ("FDA") de Estados Unidos clasifica el lactitol, junto con otros alcoholes de azúcar, que pueden ser o no prebióticos, es decir, eritritol, maltitol, manitol, sorbitol, y xilitol, como "reconocido generalmente como seguro" ("GRAS").

Tal como se ha indicado anteriormente, la elección del prebiótico a combinar con un probiótico en particular se determinará de acuerdo con el prebiótico que proporciona el sustrato más adecuado para un probiótico en particular. Cuando se considera el uso de un prebiótico en particular, siempre se debería considerar la sinergia entre uno o más prebióticos y/o la sinergia entre uno o más prebióticos y otros ingredientes. La sinergia entre los prebióticos lactitol y OPC con los alcoholes de azúcar manitol y sorbitol se ilustra en el experimento que se expone en el Ejemplo 10.

En el Ejemplo 10, los alcoholes de azúcar manitol y sorbitol descritos en el sistema de vehículo de hidrato de carbono que se desvela en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2003/0118642 A1 de Norman *et al.*, que se incorpora por referencia en el presente documento, se combinaron con *L. acidophilus* para formar dos lotes probióticos (Tabla 27), que se sometieron a ensayo de estabilidad (Tabla 28). Como un control, el producto PHARMABURST® (SPI Polyols, New Castle, DE), que es un producto disponible en el mercado cubierto por la Publicación de Patente de Norman *et al.*, se usó como un vehículo para preparar un probiótico de *L. acidophilus*; PHARMABURST® incluye los alcoholes de azúcar manitol y sorbitol. Tal como se muestra en la Tabla 28, manitol y sorbitol solos fueron incapaces de mantener *L. acidophilus* viable en las condiciones de almacenamiento rigurosas de 40 °C/75 % de HR y tal como se muestra en la Tabla 30, aunque PHARMABURST® fue capaz de mantener *L. acidophilus* viable durante 2 semanas en las condiciones de almacenamiento ligeras de 25 °C/60 % de HR, la viabilidad era limitada. Por el contrario, tal como se muestra en las Tablas 31 y 32 (Ejemplo 11), cuando se añadieron lactitol y/o OPC a la formulación probiótica de *L. acidophilus* de la Tabla 29, *L. acidophilus* mantuvo un nivel de estabilidad elevado durante dos semanas en las condiciones de almacenamiento rigurosas de 40 °C/75 % de HR sin un desecante (véase, Tabla 32, Lote E), lo que indica un efecto sinérgico entre los alcoholes de azúcar manitol y sorbitol y los prebióticos lactitol y/o OPC. Lo anterior indica que los probióticos de *L. acidophilus* que se formulan para que incluyan al menos los alcoholes de azúcar manitol y sorbitol junto con lactitol y/o OPC dan como resultado composiciones probióticas que tienen un período de caducidad prolongado.

Para determinar si el lactitol tiene un efecto significativo sobre la estabilidad del *L. acidophilus*, se prepararon tres lotes de comprimidos probióticos de *L. acidophilus* tal como se expone en la Tabla 33 (Ejemplo 12), un lote con *L. acidophilus* y lactitol (Lote I), un segundo lote con *L. acidophilus* y PHARMABURST® (Lote J), y un tercer lote con *L. acidophilus*, lactitol, y PHARMABURST® (Lote K). Los resultados de la Tabla 34 (Ejemplo 12) muestran que en las condiciones rigurosas de 40 °C/75 % de HR, el lactitol solo no era eficaz para mantener la estabilidad del *L. acidophilus* mientras que PHARMABURST® solo y la combinación de un porcentaje de peso relativamente bajo de PHARMABURST® junto con lactitol mostró algunas colonias viables de *L. acidophilus* después de dos semanas. Un gráfico logarítmico que compara los resultados del ensayo de estabilidad del Lote E (Tabla 32) con los Lotes I, J, y K (Tabla 34) se muestra en la Figura 1. Tal como se muestra en el gráfico, en las condiciones de almacenamiento rigurosas de 40 °C/75 % de HR, después de dos semanas, un 100 % de lactitol fracasó en la estabilización del *L. acidophilus*; un 100 % de PHARMABURST® mostró una viabilidad limitada del *L. acidophilus*; una combinación de un 10 % de PHARMABURST® y un 90 % de lactitol mostró una viabilidad limitada de *L. acidophilus*; y una combinación de un 87 % de PHARMABURST® y un 13 % de lactitol mostró una viabilidad significativa del *L. acidophilus*. Los resultados de los ensayos de estabilidad, tal como se muestra en la Figura 1, indican que en una relación óptima, se produce un efecto sinérgico entre los ingredientes de PHARMABURST® y lactitol.

El término "fitonutriente" se refiere a un nutriente derivado de una fuente vegetal que tiene un efecto beneficioso sobre la salud del organismo, es decir, el animal o ser humano, que ingiere el fitonutriente. Los fitonutrientes se diferencian de los nutrientes en que no son necesarios para el metabolismo normal del organismo. Muchos fitonutrientes son antioxidantes que transmiten colores brillantes a las frutas y a los vegetales. Por ejemplo, la luteína hace al maíz de color amarillo, el licopeno hace a los tomates de color rojo, el caroteno hace a las zanahorias de color naranja, y la antocianina hace a los arándanos de color azul. Tanto los colores brillantes como las propiedades antioxidantes de los fitonutrientes se deben a carbonos que alternan un solo enlace y doble enlace. Los fitonutrientes nutrientes que se pueden incluir en las formulaciones probióticas de la presente invención incluyen sin limitación catequinas, que se encuentran en el té; polifenoles, que se encuentran en pieles de fruta tales como piel de uva, cáscara de manzana, y cáscara de naranja; y proantocianidinas oligoméricas ("OPC") que se encuentran en frutas, vegetales, nueces, semillas, flores, y corteza, pero que se extraen generalmente de pepitas de uva y/o corteza de pino. El aislamiento de OPC se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 3.436.407 y N° 4.698.360, ambas de Masquelier *et al.* Las Tablas 31 y 32 (Lote H) del Ejemplo 11 muestran que la adición de OPC (sin lactitol) a la composición probiótica de *L. acidophilus* que se describe en el mismo mantuvieron estabilidad del *L. acidophilus* a un nivel muy elevado durante dos semanas en las condiciones de almacenamiento rigurosas de 40 °C/75 % de HR sin un desecante. Dentro del contexto de la presente invención, las OPC se pueden añadir a las composiciones probióticas en un amplio intervalo, tal como por ejemplo, de aproximadamente un 0,05 % en p/p a aproximadamente un 25 % en p/p; generalmente; sin embargo, un intervalo de aproximadamente un 0,5 % en p/p a aproximadamente un 10 % en p/p debería ser suficiente para que la OPC mostrara su efecto.

Además de lo mencionado anteriormente, la presente invención también incluye la adición de al menos una especie probiótica junto con manitol y sorbitol y al menos una OPC. Tal como se muestra en la Tabla 18 del Ejemplo 7, la adición del prebiótico lactitol y de la OPC fitonutriente a la composición probiótica de *L. acidophilus* y de la subsp. *lactis* de *B. animalis*, que se describe en el mismo, dio como resultado el recuento de estabilidad más elevado para la composición probiótica a los 6 meses en las condiciones de almacenamiento de 25 °C/60 % de HR con un desecante. Además, el Lote I de las Tablas 31 y 32 del Ejemplo 11 demuestra que la adición del prebiótico lactitol y de la OPC fitonutriente a la composición probiótica de *L. acidophilus* que se describe en el mismo mantuvo el recuento de estabilidad de la composición probiótica de *L. acidophilus* a un nivel muy elevado durante dos semanas en las condiciones de almacenamiento rigurosas de 40 °C/75 % de HR sin un desecante.

Los ingredientes adicionales que se pueden incluir con las combinaciones probióticas que se han descrito anteriormente incluyen vitaminas, minerales dietéticos, minerales traza, y otros fitonutrientes. Véase, el Ejemplo 8,

Tablas 20-22.

5 Las vitaminas que se pueden incluir en las composiciones probióticas de la presente invención incluyen sin limitación, vitaminas tales como vitamina A (retinol), vitamina B₁ (tiamina), vitamina B₂ (riboflavina), vitamina B₃ (niacina), vitamina B₅ (ácido pantoténico), vitamina B₆ (piridoxina), vitamina B₇ (biotina), vitamina B₉ (ácido fólico), vitamina B₁₂ (cianocobalamina), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina D₁ (lamisterol), vitamina D₂ (ergocalciferol), vitamina D₃ (dihidrotaquisterol), vitamina D₄ (7-deshidrositosterol), vitamina E (tocoferol), y vitamina K (naftoquinona). El listado anterior incluye sales de vitamina, tales como por ejemplo, acetato de retinol, palmitato de retinol, y mononitrato de tiamina.

10 Los minerales dietéticos que se pueden incluir en las composiciones probióticas de la presente invención incluyen sin limitación, calcio, cloruro, magnesio, fósforo, potasio, sodio, y azufre.

15 Los minerales traza que se pueden incluir en las composiciones probióticas de la presente invención incluyen sin limitación, cromo, cobalto, cobre, flúor, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, selenio, y cinc.

20 Las composiciones probióticas de la presente invención se pueden preparar en diversas formulaciones, tales como por ejemplo, formas de dosificación oral, tales como comprimidos, comprimidos encapsulados, o cápsulas; goma de mascar; o polvos para disolver en un líquido.

25 Tal como se ha indicado anteriormente, las composiciones probióticas de la presente invención se pueden formular en formas de dosificación oral, tales como comprimidos, comprimidos encapsulados, o cápsulas. Los comprimidos probióticos y los comprimidos encapsulados de la presente invención se pueden formular para tragar o para masticar. En el último caso, los comprimidos y los comprimidos encapsulados se deberían preparar con agentes saborizantes. Cuando sea necesario, los comprimidos masticables con sabor y los comprimidos encapsulados pueden incluir un edulcorante, que puede ser un edulcorante artificial o natural o ambos. Las cápsulas probióticas de la presente invención se pueden preparar principalmente para tragar.

30 Los expertos habituales en la materia conocen procedimientos para preparar comprimidos, comprimidos encapsulados, y cápsulas e incluyen, sin limitación, granulación en húmedo, granulaciones seco, y compresión directa (para comprimidos y comprimidos encapsulados).

35 La granulación en húmedo y en seco se usa para preparar comprimidos, comprimidos encapsulados, o cápsulas. Con técnicas de granulación, se usa una quilsonación para preparar el polvo para las formas de dosificación. Un quilsonador aloja rodillos giratorios, ranurados que se presionan fuertemente el uno contra el otro mediante presión hidráulica. Las materias primas se colocan en la tolva del quilsonador y se alimentan con un sistema de tornillos horizontales y verticales en los rodillos. A medida que los materiales pasan a través de las ranuras en los rodillos, se compactan compresión muy elevada y emergen desde el quilsonador en forma de láminas densas. Las láminas se muelen en un polvo granular fino usando un molino Fitz y a continuación se pasan a través de un tamiz para producir un gránulo de fluido libre uniforme. El proceso de quilsonación da como resultado un polvo acabado que es de dos a cuatro veces más denso que el material de partida, una característica que permite que los ingredientes se moldeen en la forma de dosificación deseada.

45 Con la granulación en seco, el polvo se puede incorporar en una cápsula de gelatina o se puede mezclar con gelatina para formar un comprimido o comprimido encapsulado. Con la granulación en húmedo, el polvo se humedece creando de ese modo "trozos" grandes de material que posteriormente se secan y se muelen para convertir los trozos en partículas de un tamaño deseado para el proceso de preparación. Una vez que se obtienen las partículas de un tamaño deseado, las partículas se incorporan en una cápsula de gelatina o se mezclan con gelatina para formar un comprimido o comprimido encapsulado.

50 Las formulaciones de compresión más directa consisten en tres tipos de ingredientes: un vehículo inerte que proporciona volumen a la forma de dosificación final; un lubricante que ayuda en el proceso de compresión; y los principios activos. Los vehículos pueden estar presentes en formas de dosificación en muchos intervalos, de un 0,5 % en p/p a un 95 % en p/p. Dentro del contexto de la presente invención, los vehículos usados para formular las composiciones probióticas de la presente invención estarán generalmente en el intervalo de aproximadamente un 30 % en p/p a aproximadamente un 98 % en p/p. El vehículo usado en los Ejemplos es un vehículo PHARMABURST® (SPI Polyols, New Castle, DE).

60 Con compresión directa, los ingredientes se mezclan en una mezcladora discontinua, tal como una mezcladora de doble capa o en V, y se descargan en un recipiente (por lo general portátil), que a continuación alimenta un conducto para el proceso de formación de comprimidos. Como una alternativa a la mezcla discontinua, también se usa la mezcla en recipientes. Con la mezcla en recipientes, el material sin mezclar se coloca en un recipiente portátil, que puede contener tabiques deflectores internos, y se da vueltas; la mezcla en recipientes evita la necesidad de transferir el material desde la mezcladora al recipiente portátil. En las formulaciones de compresión directa, existe una amplia distribución del tamaño de partícula con el agente activo estando normalmente en el extremo fino del intervalo. Para evitar la segregación de las partículas, se debe mantener un flujo de confianza en los recipientes en

todo momento. Para asegurar que todos los comprimidos sean de la calidad más elevada, los comprimidos eleven muestrear a intervalos regulares durante la producción para la concentración de principio activo, dureza del comprimido, y velocidades de disolución.

5 La compresión directa se puede usar para preparar comprimidos y comprimidos encapsulados para tragar y también comprimidos masticables y comprimidos encapsulados. Con lo último, la dureza de los comprimidos y de los comprimidos encapsulados necesitará ser reducida y los ingredientes de los comprimidos de los comprimidos encapsulados necesitarán ser ajustada para asegurar que los comprimidos y los comprimidos encapsulados tengan un sabor agradable y una sensación en boca agradable. El sabor de los comprimidos masticables y de los comprimidos encapsulados se puede ajustar a través del uso de diversos saborizantes edulcorantes y la sensación en boca de los comprimidos masticables y de los comprimidos encapsulados se puede ajustar con el uso de prebióticos variables, tales como inulina, lactitol, manitol, etc. La sensación en boca de los comprimidos masticables se debe ajustar para asegurar que cuando se tritura el comprimido o el comprimido encapsulados, se pierda en la matriz con sabor; si el cuerpo es demasiado frágil, se puede fracturar causando una sensación incómoda en la boca del usuario. Para los comprimidos masticables, en los que el sabor es significativo para la capacidad de aceptación del usuario, el producto también debería tener un olor agradable cuando se abre la mayor parte del paquete. Cada una de las características del comprimido masticable se puede alcanzar mediante el ajuste de los excipientes hasta que se consiguen las propiedades deseadas.

20 Dependiendo del tamaño final y de las características de los comprimidos y de los comprimidos encapsulados, es decir, tamaño, dureza, fragilidad, sensación en boca para la masticación, etc., se pueden usar dos máquinas diferentes de compresión directa para preparar las formas de dosificación. Por lo general, las prensas de troquelado individual presentan velocidades de compresión bajas mientras que las prensas giratorias presentan velocidades de compresión elevadas. Los Ejemplos describen el uso tanto de una prensa de troquelado individual (Ejemplos 1 y 2) como de prensas giratorias (también denominadas máquinas giratorias; Ejemplos 2-4 y 7-10).

30 Las composiciones probióticas de la presente invención también se pueden incorporar en una goma de mascar. La goma de mascar incluye preferentemente un sabor y puede ser una goma de mascar dura o goma de mascar blanda. Cuando sea necesario, la goma de mascar dura o blanda saborizada puede incluir un edulcorante, que puede ser un edulcorante artificial o natural, o ambos. Los expertos habituales en la materia conocen procedimientos para la preparación de gomas.

35 La goma se prepara tradicionalmente usando cuatro ingredientes: una base de goma, tal como una resina obtenida a partir de pinos; un edulcorante natural, tal como azúcar, o un edulcorante artificial; un suavizante, tal como glicerina; y agente saborizante. Los materiales de partida para la goma se mezclan con una mezcladora mientras que se mantiene una temperatura constante durante el tiempo de procesamiento prescrito. A continuación, los materiales de goma mixta se envían a una tolva y se extruyen con tornillos dobles para preparar una lámina de goma. El interior y el exterior de las láminas de goma se espolvorean para evitar que se pegue a la máquina durante el enrollado y el envasado. Durante el proceso de extrusión, el espesor de la lámina de goma se controla con un rodillo. Después de la extrusión, la lámina de goma se ranura y se corta para proporcionar las dimensiones apropiadas, se pasa a través de un túnel de enfriamiento, y se apila en bandejas para el envasado. Cuando la goma es una goma de mascar dura, tal como un comprimido de goma de mascar, la goma se reviste entre las etapas de corte y enfriamiento. Para cada una de las etapas están disponibles máquinas diseñadas especialmente; por lo tanto, la goma se puede preparar usando una máquina de mezclado, una máquina extrusora, una máquina de formación, una máquina de refrigeración, y una máquina de apilamiento.

50 Además, la goma se puede preparar usando el procedimiento de compresión directa que se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004/0013767 de Norman y Amin, que se incorpora por referencia en el presente documento. Con este procedimiento, una base de goma, agente de granulación, adyuvante de procesamiento, y uno o más lubricantes se mezclan y se someten a compresión directa en una máquina tradicional de formación de comprimidos. Además, se pueden añadir a la mezcla edulcorantes, colorantes, y saborizantes. Una mezcla disponible en el mercado de poliol(es) y/o azúcares en una base de goma se vende en el mercado como PHARMAGUM® (SPI Polyols, Inc., New Castle, Delaware). El procedimiento de compresión directa es particularmente útil para preparar comprimidos de goma de mascar.

55 En ambos de los procedimientos anteriores, el probiótico se añade durante la etapa de mezcla inicial antes de la extrusión o de la compresión directa.

60 Además de lo anterior, las composiciones probióticas de la presente invención se pueden preparar como un polvo que se pretende disolver en un líquido, tal como agua, leche, zumo, y yogur. Se entiende que los líquidos individuales se pueden mezclar juntos cuando sea apropiado. Por ejemplo, la formulación probiótica se puede combinar con zumo de frutas y yogur o leche y yogur para hacer batidos probióticos de yogur. La formulación probiótica también se puede combinar con leche y helado para preparar batidos probióticos de leche. Los expertos habituales en la materia conocen los agentes saborizantes para las formulaciones probióticas líquidas contemplados en la invención.

Ejemplos de excipientes que se pueden usar para formular formas apropiadas de dosificación incluyen aglutinantes, agentes disgregantes, lubricantes, revestimientos, plastificantes, agentes de comprensión, agentes de granulación en húmedo, y edulcorantes, todos los cuales son conocidos por los expertos habituales en la materia a la que pertenece la invención. Todos los ejemplos siguientes se proporcionan a modo de ilustración y no de limitación.

5 Cuando sea apropiado, se usan aglutinantes para ayudar a que los ingredientes de la forma de dosificación se mantengan unidos. Ejemplos de aglutinantes incluyen carbopol, povidona, y goma de xantano. Por lo general, casi siempre se usan lubricantes en la preparación de formas de dosificación por compresión directa para evitar que la masa de polvo compactada se pegue al equipo durante el proceso de formación de comprimidos o de encapsulación. Ejemplos de lubricantes incluyen estearato de calcio, estearato de magnesio, ácido esteárico, estearil fumarato sódico, y ácidos grasos basados en vegetales. Los agentes disgregantes ayudan en la separación de la masa de compactada cuando se coloca en un entorno fluido. Ejemplos de agentes disgregantes incluyen croscarmelosa sódica, crospovidona, goma de gelano, hidroxipropil celulosa, almidón, y glicolato sódico de almidón. Los revestimientos se usan para controlar la solubilidad del fármaco. Ejemplos de revestimientos incluyen carragenano, ftalato de acetato de celulosa, etilcelulosa, goma de gelano, maltodextrina, metacrilatos, metilcelulosa, celulosa microcristalina, y goma laca. Los plastificantes se usan para controlar la velocidad de liberación del fármaco a partir de la forma de dosificación. Ejemplos de plastificantes incluyen ésteres de citrato, sebacato de dibutilo, ftalato de dietilo, ftalato de acetato de polivinilo, y triacetina. Los agentes de compresión incluyen carbonato de calcio, dextrosa, fructosa, goma guar, miel, lactosa; maltodextrina, maltosa, manitol, celulosa microcristalina, molasas, sorbitol, almidón, y sacarosa. Los agentes de granulación en húmedo incluyen carbonato de calcio, lactosa, maltodextrina, manitol, celulosa microcristalina, povidona, y almidón. Los edulcorantes incluyen aspartamo, dextrosa, fructosa, miel, lactosa, maltodextrina, maltosa, manitol, molasas, glicirricinato de monoamonio, sorbitol, sucralosa, y sacarosa. Los excipientes que se usa generalmente en la preparación de comprimidos masticables incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, dextrosa, fructosa, goma guar, lactosa, maltodextrina, maltosa, manitol, celulosa microcristalina, y sorbitol. Tal como es evidente a partir de la lista anterior, muchos de los mismos ingredientes se pueden usar para diversos fines diferentes en diversas formas de dosificación diferentes.

En cada una de las composiciones probióticas que se han descrito anteriormente, el probiótico debería estar presente en un intervalo de aproximadamente 10^6 colonias por unidad de dosificación a aproximadamente 10^{10} colonias por unidad de dosificación, aunque también son aceptables recuentos más elevados. Cuando la composición probiótica se va a administrar a un ser humano adulto, es decir, un ser humano con más de 16 años de edad, el probiótico está preferentemente en el intervalo de al menos 10^9 , más preferentemente 10^{10} o incluso más elevado. Cuando la composición probiótica se va a administrar a un niño, es decir, un ser humano con menos de 16 años de edad, el probiótico está preferentemente en el intervalo de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 . Los Ejemplos exponen diversos estudios para determinar las condiciones en las que las composiciones probióticas de la presente invención tienen la duración más larga. Tal como se muestra en el Ejemplo 10, y tal como se esperaría, las condiciones de almacenamiento desempeñan una diferencia significativa en la duración de las composiciones probióticas, *compárese*, la estabilidad de las composiciones probióticas a 25 °C/60 % de HR, 30 °C/65 % de HR, y 40 °C/75 % de HR (Tablas 16-18, 20-22 y 24-26). Además, la presencia de un desecante en el envase de almacenamiento también puede marcar una diferencia en determinadas condiciones de almacenamiento, aunque, no siempre es éste el caso; *compárese*, Tablas 12, 13, 16-18. Ejemplos de desecantes que se pueden usar con la presente invención incluyen, sin limitación, gel de sílice (dióxido de silicio), gel de sílice de indicación (gel de sílice lavado con cloruro de cobalto), arcilla de montmorillonita, óxido de calcio, sulfato cálcico, perlas de alúmina activada, y tamiz molecular (por ejemplo, materiales de aluminosilicato o compuestos sintéticos tales como arcillas, vidrio poroso, carbón vegetal microporoso, o carbón activo).

Las composiciones probióticas de la presente invención tienen una amplia utilidad en la preparación de diversos productos comerciales de consumo que, después de la ingestión por un ser humano o por un animal, regularán sus sistemas digestivos asegurando que el tracto digestivo está poblado con especies probióticas vivas. Dado que es esencial que las especies probióticas sean viables después de la ingestión, la mayor estabilidad de las especies probióticas en las composiciones probióticas de la presente invención asegura que las composiciones probióticas tienen la capacidad de reducir el número de especies patógenas en el colon. Ejemplos de bacterias patógenas que se pueden reducir a través de la ingestión de las composiciones probióticas de la presente invención incluyen, sin limitación, *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *S.s aureaus*, *Vibrio cholera*, bacteroides, Clostridia, klebsiella, listeria, proteus, salmonella, shigella, y veillonella. Un ejemplo de levadura patógena que se puede reducir a través de la ingestión de las composiciones probióticas de la presente invención incluyen, sin limitación, *C. albicans*. Tal como se ha indicado anteriormente, las especies probióticas beneficiosas, tales como lactobacilli y bifidobacteria mantienen bajo control a los patógenos potenciales que causan enfermedades mediante la prevención de disfunciones relacionadas con enfermedades.

Una ventaja de las formulaciones probióticas de la presente invención es que son un producto de sabor agradable que se puede consumir sin agua. Además, las formulaciones probióticas de la presente invención son estables a temperatura ambiente y por lo tanto, no necesitan condiciones especiales para mejorar o mantener el período de caducidad del producto.

65 EXPERIMENTAL

Los siguientes ejemplos se establecen con el fin de proporcionar a los expertos habituales en la materia una divulgación y descripción completa de cómo preparar y usar las composiciones de la invención. Se pretende que los ejemplos no sean limitantes de la invención.

5 Los siguientes ejemplos usarán, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de formulación farmacéutica, química médica y similares, que están dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican totalmente en la bibliografía. Por ejemplo, la preparación de diversos tipos de formulaciones farmacéuticas se describe en REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 20ª edición (Lippincott Williams y Wilkins, 2000) y Ansel *et al.*, PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 6ª Ed. (Media, PA: Williams y Wilkins, 1995).

15 En los ejemplos que siguen a continuación, se han hecho esfuerzos para asegurar precisión con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deberían tener en cuenta errores y desviaciones experimentales cuando se realizan los experimentos que se describen. A menos que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es la atmosférica o cercana a la misma. Todos los componentes se obtuvieron en el mercado a menos que se indique de otro modo.

20 En cada uno de los ensayos de estabilidad que se exponen en los ejemplos, cinco comprimidos por grupo se sometieron a ensayo para el ensayo de estabilidad de *L. acidophilus* solamente con *L. acidophilus*; cinco comprimidos por grupo se sometieron a ensayo para el ensayo de estabilidad de la subsp. *lactis* de *B. animalis* solamente con la subsp. *lactis* de *B. animalis*, y cinco comprimidos por grupo se sometieron a ensayo cuando se sometieron al ensayo *L. acidophilus* y la subsp. *lactis* de *B. animalis* como un ensayo combinado; y seis comprimidos por grupo se sometieron a ensayo para muestras en las que *L. acidophilus* y la subsp. *lactis* de *B. animalis* se sometieron a ensayo individualmente a partir del producto combinado. Para el ensayo de estabilidad, se realizaron extracciones semanales, quincenales, o mensuales hasta que se observó una reducción en el recuento del ensayo inferior a 1×10^6 (las excepciones a este procedimiento se indican en los ejemplos).

EJEMPLO 1

30 PREPARACIÓN DE COMPRIMIDOS DE *L. ACIDOPHILUS*

Se preparó un lote de veinte comprimidos probióticos de *L. acidophilus* usando los ingredientes que se exponen en la Tabla 1.

TABLA I

Ingredientes	mg/comp.	% en p/p
100 billones de colonias/gramo de <i>L. acidophilus</i>	50,0	10,0
PHARMABURST® C1 (vehículo)	440,0	88,0
Estearato de magnesio (lubricante)	10,0	2,00
Total	500,0	100,00

35 Los comprimidos de *L. acidophilus* se prepararon por compresión directa en una máquina de un solo troquel usando herramienta con cada estándar de 0,95 cm. La dureza de los comprimidos era de 8-10 kp (kilopondio = kilogramo/N = fuerza ejercida por un kg de masa a la gravedad de la Tierra). Los comprimidos formados por compresión se colocaron en botellas de polietileno de alta densidad ("HDPE") de 0,06 l y se sometieron a una temperatura controlada de 25 °C/60 % de HR. La estabilidad microbiológica del producto se sometió a ensayo en los siguientes intervalos de tiempo: punto temporal 0, 1 mes, 2 meses, 4,5 meses, 6 meses, y 8,5 meses. Los resultados del ensayo de estabilidad se exponen en la Tabla 2.

TABLA 2

Períodos de Tiempo Sometidos a Ensayo	Estabilidad de <i>L. acidophilus</i> (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo
Punto temporal 0	$1,08 \times 10^{10}$
1 mes	$6,3 \times 10^9$
2 meses	$5,8 \times 10^9$
4,5 meses	$3,2 \times 10^8$
6 meses	$8,1 \times 10^5$
8,5 meses	$5,2 \times 10^5$

EJEMPLO 2

PREPARACIÓN DE COMPRIMIDOS DE *L. ACIDOPHILUS* CON COLOR, SABOR, Y EDULCORANTE

- 5 Los comprimidos probióticos de *L. acidophilus* se prepararon usando los ingredientes que se exponen en la Tabla 3. Antes de la formación del comprimido, el material de partida de *L. acidophilus* se sometió a ensayo y se encontró que tenía un recuento microbiano de $1,8 \times 10^{11}$ colonias/gramo.

TABLA 3

Ingredientes	Comprimidos con Sabor a Naranja 800 Comprimidos		Comprimidos Con Sabor a Goma de Mascar 600 Comprimidos		Comprimidos con Sabor a Piña 700 Comprimidos	
	mg/comp.	% en p/p	mg/comp.	% en p/p	mg/comp.	% en p/p
<i>L. acidophilus</i>	50,0	8,3333	50,0	8,3333	50,0	8,3333
PHARMABURST® C1 (vehículo)	539,3	89,8833	537,1	89,5167	535,9	89,3167
Sucralosa (ChemPoint.com, Seattle, WA) (edulcorante)	0,9	0,1500	0,9	0,1500	0,9	0,1500
Sabor natural y artificial secado por pulverización	0,6	0,1000	1,8	0,3000	3,0	0,2000
Colorante FD y C	1,2	0,2000	1,2	0,2000	1,2	0,2000
Estearato de Magnesio (lubricante)	8,0	1,3333	9,0	1,5000	9,0	1,5000
Total	600,0	100,0000	600,0	100,0000	600,0	100,0000

*Los colorantes FD y C Rosa, Amarillo, y Naranja se seleccionaron en cantidades adecuadas para hacer coincidir el color con el sabor seleccionado.

10

Los comprimidos con sabor a naranja y goma de mascar se prepararon por compresión directa en una máquina giratoria usando una herramienta cóncava convencional redonda de 1,3 cm y los comprimidos con sabor a piña se prepararon usando una herramienta con forma de cápsula con una sola prensa de troquelado. La dureza de todos los comprimidos estaba en el intervalo de 7-9 kp y los tiempos de disgregación eran de aproximadamente 22 segundos.

15

Los comprimidos de la Tabla 3 se almacenaron a 25 °C/60 % de HR para el ensayo de estabilidad sin un desecante, con un conjunto de tres comprimidos de cada lote apartados como muestras de reserva para cada forma de dosificación del sabor; las muestras de reserva se almacenaron a 4 °C. La Tabla 4 expone los resultados de los ensayos de estabilidad mensuales sobre las formas de dosificación de la Tabla 3 durante un período de tiempo de 11 meses y la Tabla 5 expone los resultados del ensayo de estabilidad de las muestras de reserva en el mes 13; se seleccionaron cinco comprimidos para cada grupo del ensayo de estabilidad. La estabilidad del *L. acidophilus* en las formas de dosificación se determinó midiendo la presencia del bacilo gram-positivo de *L. acidophilus*.

25

TABLA 4

Periodos de Tiempo a 25 °C/60 % de HR	Estabilidad de <i>L. acidophilus</i> (Presencia de bacilo Gram Positivo Anaerobio) Recuento Total/gramo		
	Comprimidos con Sabor a Naranja	Comprimidos Con Sabor a Goma de Mascar	Comprimidos con Sabor a Piña
Punto temporal 0	$9,45 \times 10^9$	$7,6 \times 10^9$	$9,15 \times 10^9$
1 Mes	$7,45 \times 10^9$	$7,1 \times 10^9$	$8,25 \times 10^9$
2 Mes	$8,05 \times 10^9$	$7,7 \times 10^9$	$7,05 \times 10^9$
3 Mes	$3,70 \times 10^9$	$4,15 \times 10^9$	$2,55 \times 10^9$

Periodos de Tiempo a 25 °C/60 % de HR	Estabilidad de <i>L. acidophilus</i> (Presencia de bacilo Gram Positivo Anaerobio) Recuento Total/gramo		
	Comprimidos con Sabor a Naranja	Comprimidos Con Sabor a Goma de Mascar	Comprimidos con Sabor a Piña
4 Mes	1,90 x 10 ⁹	1,05 x 10 ⁹	1,05 x 10 ⁹
5 Mes	2,95 x 10 ⁸	2,75 x 10 ⁸	1,0 x 10 ⁸
6 Mes	2,85 x 10 ⁸	2,25 x 10 ⁸	6,5 x 10 ⁷
7 Mes	8,5 x 10 ⁷	7,0 x 10 ⁷	3,5 x 10 ⁷
8 Mes	1,4 x 10 ⁷	1,7x 10 ⁷	9,5 x 10 ⁶
9 Mes	8,5 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁶	4,95 x 10 ⁵
10 Mes	5,55 x 10 ⁵	4,20 x 10 ⁵	1,65 x 10 ⁵
11 Meses	7,54 x 10 ⁴	6,90 x 10 ⁴	6,2 x 10 ⁴

TABLA 5

Periodo de Tiempo a 4 °C	Estabilidad de <i>L. acidophilus</i> (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo		
	Comprimidos con Sabor a Naranja	Comprimidos Con Sabor a Goma de Mascar	Comprimidos con Sabor a Piña
13 Meses	7,53 x 10 ⁹	4,65 x 10 ⁹	7,55 x 10 ⁹

5 Tal como se indica en la Tabla 4, a los diez meses, el recuento total de bacilos gram-positivos de *L. acidophilus* en cada lote de sabor era inferior a 1 x 10⁶; por el contrario, las muestras almacenadas a 4 °C no mostraron reducción en el recuento microbiano a los 13 meses.

EJEMPLO 3

10

PREPARACIÓN DE COMPRIMIDOS DE CEPA BB12 DE LA SUBSP. *LACTIS* DE *B. ANIMALIS*

Un lote de treinta comprimidos probióticos de la cepa BB 12 de la subsp. *lactis* de *B. animalis* (denominada en lo sucesivo en el presente documento "subsp. *lactis* de *B. animalis*") se prepararon usando los ingredientes que se exponen en la Tabla 6.

15

TABLA 6

Ingredientes	mg/comp.	% en p/p
100 billones de colonias/gramo de subsp. <i>lactis</i> de <i>B. animalis</i>	50,0	10,0
PHARMABURST® C1 (vehículo)	442,50	88,50
Estearato de Magnesio (lubricante)	7,50	1,50
Total	500,0	100,00

20

Los comprimidos de la subsp. *lactis* de *B. animalis* se prepararon por compresión directa en una máquina giratoria usando una herramienta cóncava convencional de 1,11 cm. La dureza de los comprimidos estaba en el intervalo de 10-12 kp. Los comprimidos formados por compresión se colocaron en botellas de HDPE de 0,06 l sin un desecante y se expusieron a la temperatura controlada de 25 °C/60 % de HR. La estabilidad microbiológica de cinco comprimidos por grupo se sometió a ensayo en los siguientes intervalos de tiempo: punto temporal 0, 1 mes, 2 meses, y 3 meses. Los resultados del ensayo de estabilidad se exponen en la Tabla 7.

25

TABLA 7

Período de Tiempo a 25 °C/60 % de HR	Estabilidad de subsp. <i>lactis</i> de <i>B. animalis</i> (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo
Punto temporal 0	3,8 x 10 ¹⁰

ES 2 500 166 T3

Período de Tiempo a 25 °C/60 % de HR	Estabilidad de subsp. <i>lactis de B. animalis</i> (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo
1 mes	3,9 x 10 ⁶
2 meses	2,1 x 10 ⁵
3 meses	1,9 x 10 ⁵

Los resultados del ensayo de estabilidad eran inferiores a 1 x 10⁶ en el grupo de dos meses, pero continuaron durante un mes adicional.

5 EJEMPLO 4

PREPARACIÓN DE COMPRIMIDOS DE *L. ACIDOPHILUS* CON COLOR, SABOR, Y EDULCORANTE

10 Se prepararon comprimidos probióticos (2000 comprimidos por lote de sabor) que contenían probiótico tanto de *L. acidophilus* como de subsp. *lactis de B. animalis* usando los ingredientes que se exponen en la Tabla 8.

TABLA 8

Ingredientes	Comprimidos con Sabor a Naranja 2000 Comprimidos		Comprimidos Con Sabor a Goma de Mascar 2000 Comprimidos		Comprimidos con Sabor a Piña 2000 Comprimidos	
	mg/comp.	% en p/p	mg/comp.	% en p/p	mg/comp.	% en p/p
100 billones de colonias/gramo de <i>L. acidophilus</i>	50,00	7,69	50,00	7,69	50,00	7,69
100 billones de colonias/gramo de subsp. <i>lactis de B. animalis</i>	50,00	7,69	50,00	7,69	50,00	7,69
PHARMABURST® C1 (vehículo)	537,3	82,66	536,10	82,48	534,90	82,29
Sucralosa (edulcorante)	0,90	0,14	0,90	0,14	0,90	0,14
Sabor natural y artificial secado por pulverización	0,60	0,09	1,80	0,28	3,00	0,46
Colorante FD y C	1,20	0,18	1,20	0,18	1,20	0,18
Estearato de Magnesio (lubricante)	10,0	1,54	10,00	1,54	10,00	1,54
Total	650,0	100,0	650,00	100,00	650,00	100,00

15 Los comprimidos se prepararon por compresión directa en una máquina giratoria usando una herramienta cóncava convencional redonda de 1,3 cm. La dureza de los comprimidos estaba en el intervalo de 8-10 kp. Los comprimidos formados por compresión se envasaron en botellas de HDPE de 0,2 l de 100 comprimidos cada una sin un desecante y se expusieron a la temperatura controlada de 25 °C/60 % de HR. La estabilidad microbiológica del producto se sometió a ensayo mensualmente durante un periodo de 12 meses o hasta que se observó una reducción en el recuento del ensayo inferior a 1 x 10⁶. Seis comprimidos por grupos se analizaron en el punto temporal 0 y 1 mes tanto para *L. acidophilus* como para la subsp. *lactis de B. animalis* y cinco comprimidos por grupo se sometieron a ensayo para *L. acidophilus* y la subsp. *lactis de B. animalis* independientemente durante los períodos de tiempo restantes. Los resultados del ensayo de estabilidad se exponen en las Tablas 9 y 10, respectivamente.

TABLA 9

Periodo de Tiempo a 25 °C/60 % de HR	Estabilidad de <i>L. acidophilus</i> y subsp. <i>lactis</i> de <i>B. animalis</i> (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo		
	Comprimidos con Sabor a Naranja	Comprimidos Con Sabor a Goma de Mascar	Comprimidos con Sabor a Piña
Punto temporal 0	4,2 x 10 ⁹	3,35 x 10 ⁹	4,45 x 10 ⁹
1 Mes	4,3 x 10 ⁹	3,8 x 10 ⁹	4,2 x 10 ⁹

TABLA 10

Periodo de Tiempo a 25 °C/60 % de HR	Estabilidad (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo					
	Comprimidos con Sabor a Naranja		Comprimidos Con Sabor a Goma de Mascar		Comprimidos con Sabor a Piña	
	Lacto	Bifido	Lacto	Bifido	Lacto	Bifido
2 Meses	1,19 x 10 ⁹	1,18 x 10 ⁹	1,08 x 10 ⁹	1,02 x 10 ⁹	1,18 x 10 ⁹	1,19 x 10 ⁹
3 Meses	1,8 x 10 ⁹	2,15 x 10 ⁹	1,95 x 10 ⁹	1,65 x 10 ⁹	2,35 x 10 ⁹	2,0 x 10 ⁹
4 Meses	5,6 x 10 ⁸	6,7 x 10 ⁸	7,75 x 10 ⁸	7,2 x 10 ⁸	6,15 x 10 ⁸	7,05 x 10 ⁸
5 Meses	6,95 x 10 ⁷	6,9 x 10 ⁷	5,85 x 10 ⁷	6,15 x 10 ⁷	5,55 x 10 ⁷	4,0 x 10 ⁷
6 Meses	5,8 x 10 ⁶	4,2 x 10 ⁶	3,15 x 10 ⁶	2,05 x 10 ⁵	3,9 x 10 ⁵	3,45 x 10 ⁵
7 Meses	2,05 x 10 ⁶	3,0 x 10 ⁶	2,86 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁵	1,95 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁵
8 Meses	2,8 x 10 ⁵	2,95 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁵	4,15 x 10 ⁴	4,25 x 10 ⁴

Tal como se indica en la Tabla 10, después de 8 meses, los comprimidos con sabor a naranja y los comprimidos con sabor a goma de mascar proporcionaron menos de 1,0 x 10⁶ recuentos totales/gramo de bacilos gram positivos y después de 7 meses, los comprimidos con sabor a piña proporcionaron menos de 1 x 10⁶ recuentos totales/gramo de bacilos gram positivos; en consecuencia, el estudio de estabilidad se interrumpió después del grupo de ocho meses.

10 EJEMPLO 5

ENVASE COMPUESTO SIN DESECANTE

La estabilidad de los tres lotes de sabor del Ejemplo 4 se sometió a ensayo en un envase compuesto de 100 comprimidos (33 de cada sabor más un comprimido adicional seleccionado al azar) sin un desecante mediante la colocación del envase compuesto en una botella de HDPE de 0,2 l a la temperatura controlada de 25 °C/60 % de HR y sometiendo a ensayo la estabilidad microbiológica de los comprimidos cada mes durante un periodo de 12 meses o hasta que se observó un recuento de ensayo inferior a 1 x 10⁶. Cinco comprimidos por grupo (seleccionados al azar de cada sabor) se analizaron para el recuento total de *L. acidophilus* y la subsp. *lactis* de *B. animalis* combinados a 1 mes y seis comprimidos por grupo (seleccionados al azar que cada sabor) se analizaron para *L. acidophilus* y la subsp. *lactis* de *B. animalis* independientemente para los periodos del tiempo restantes (en este experimento, se reservaron los seis comprimidos habituales por grupo para el probiótico agrupado combinado y cinco comprimidos por grupo para el probiótico agrupado combinado independientemente). Los resultados de los ensayos de estabilidad se exponen en las Tablas 11 y 12, respectivamente.

TABLA 11

Periodo de Tiempo a 25 °C/60 % de HR	Estabilidad (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo
1 Mes	4,55 x 10 ⁹

TABLA 12

Periodo de Tiempo a 25 °C/60 % de HR	Estabilidad (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo	
	<i>L. acidophilus</i>	<i>subsp. lactis</i> de <i>B. animalis</i>
2 Meses	4,55 x 10 ⁹	5,50 x 10 ⁹
3 Meses	1,5 x 10 ⁹	1,75 x 10 ⁹
4 Meses	3,2 x 10 ⁸	3,3 x 10 ⁸
5 Meses	5,35 x 10 ⁶	9,1 x 10 ⁶
6 Meses	3,5 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁵
7 Meses	1,3 x 10 ⁵	1,75 x 10 ⁵

Los resultados del ensayo de estabilidad fueron inferiores a 1 x 10⁶ después de seis meses, pero continuaron durante un mes adicional.

5

EJEMPLO 6

ENVASE COMPUESTO CON DESECANTE

- 10 La estabilidad de los tres lotes de sabor del Ejemplo 6 se sometió a ensayo en un envase compuesto de 100 comprimidos (33 de cada sabor más un comprimido adicional seleccionado al azar) con un desecante mediante la colocación del envase compuesto en una botella de HDPE de 0,2 l a la temperatura controlada de 25 °C/60 % de HR y sometiendo a ensayo la estabilidad microbiológica de los comprimidos a los 3 meses, 6 meses, 9 meses, y 12 meses, o hasta que se observó un recuento de ensayo inferior a 1 x 10⁶. Los comprimidos se analizaron para *L. acidophilus* y la subsp. *lactis* de *B. animalis* independientemente. Los resultados de los ensayos de estabilidad se exponen en la Tabla 13.

15

TABLA 13

Periodo de Tiempo a 25 °C/60 % de HR	Estabilidad (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo	
	<i>L. acidophilus</i>	<i>subsp. lactis</i> de <i>B. animalis</i>
3 Meses	1,34 x 10 ⁹	1,32 x 10 ⁹
6 Meses	2,65 x 10 ⁵	2,05 x 10 ⁵

- 20 Los resultados del ensayo de estabilidad fueron inferiores a 1 x 10⁶ después de seis meses; en consecuencia, el estudio se interrumpió después del grupo de seis meses.

EJEMPLO 7

- 25 PREPARACIÓN DE FORMA DE DOSIFICACIÓN PROBIÓTICA CON *L. ACIDOPHILUS*, *SUBSP. LACTIS* DE *B. ANIMALIS*, LACTITOL (PREBIÓTICO), Y OPC DE EXTRACTO DE PEPITA DE UVA (ANTIOXIDANTE)

- 30 Se prepararon lotes de comprimidos con sabor a naranja con PHARMABURST® C1, uno de los prebióticos de lactitol, es decir, CM 50 a un 7,7 % o FINLAC® DC (Xyrofin Oy Corp., Helsinki, Finlandia) a un 39,7 % con una disminución correspondiente de PHARMABURST® C1, y OPC de extracto de pepita de uva. Los lotes se usaron para someter a ensayo los siguientes parámetros: (1) las características organolépticas de productos que contienen lactitol y OPC; (2) el efecto del prebiótico lactitol sobre la estabilidad probiótica; y (3) el efecto de OPC sobre la estabilidad probiótica. Los ingredientes que se establecen en la preparación de los comprimidos para cada lote se exponen en la Tabla 14; el encabezado de cada lote especifica el edulcorante de lactitol usado y el número de comprimidos por lote.

35

TABLA 14

Ingredientes	Lote N° 1 Lactitol al 7,7 % (CM 50) 800 Comprimidos		Lote N° 2 Lactitol al 39,7 % (FINLAC® DC) 800 Comprimidos		Lote N° 3 Lactitol al 7,7 % (CM 50) 1500 Comprimidos		Lote N° 4 Lactitol al 39,7 % (FINLAC® DC) 1500 Comprimidos	
	mg/comp.	% en p/p	mg/comp.	% en p/p	mg/comp.	% en p/p	mg/comp.	% en p/p
<i>L. acidophilus</i>	50,00	7,69	50,00	7,69	50,00	7,69	50,00	7,69
subs. <i>Lactis</i> de <i>B. animalis</i>	50,00	7,69	50,00	7,69	50,00	7,69	50,00	7,69
OPC de extracto de pepita de uva (antioxidante)	10,00	1,54	10,00	1,54	-	-	-	-
PHARMABU RST® C1 (vehículo)	477,60	73,48	269,30	41,43	487,60	75,02	279,30	42,97
Lactitol (prebiótico)	50,00	7,69	258,30	39,74	50,00	7,69	258,30	39,74
Sucralosa (edulcorante)	0,60	0,09	0,60	0,09	0,60	0,09	0,60	0,09
Sabor a naranja natural y artificial secado por pulverización	0,60	0,09	0,60	0,09	0,60	0,09	0,60	0,09
Amarillo FD y C N° 6 laca A1	1,20	0,18	1,20	0,18	1,20	0,18	1,20	0,18
Estearato de Magnesio (lubricante)	10,00	1,54	10,00	1,54	10,00	1,54	10,00	1,54
Total	650,00	100,00	650,00	100,00	650,00	100,00	650,00	100,00

Los comprimidos de la Tabla 14 se prepararon por compresión directa en una máquina rotatoria usando una herramienta cóncava convencional redonda de 1,3 cm. La dureza de los comprimidos estaba en el intervalo de 8-10 kp. Cien de los comprimidos formados por compresión de cada lote se basaron en botellas de HDPE 0,2 l y la estabilidad se sometió a ensayo a una temperatura controlada hasta que se observó una reducción en el recuento del ensayo. La Tabla 15 proporciona los parámetros para el ensayo de estabilidad de los Lotes 1 a 4 de la Tabla 14 e incluye para cada lote de ensayo: la temperatura controlada usada, los períodos de tiempo del ensayo, y si se usó o no un desecante. Además, todas las muestras se sometieron a ensayo en el punto temporal 0 además de en los períodos de tiempo especificados en la Tabla 15.

TABLA 15

N° de Lote	Lote de Ensayo	Condición de Almacenamiento	Períodos de Tiempo para el Muestreo	Desecante
Lote N° 1	Lote de Ensayo 1	25 °C/60 % de HR	3, 6, 9, 10 meses	Si
Lote N° 1	Lote de Ensayo 2	25 °C/60 % de HR	3, 6, 9, 10 meses	No
Lote N° 1	Lote de Ensayo 3	30 °C/65 % de HR	mensual	Si
Lote N° 1	Lote de Ensayo 4	30 °C/65 % de HR	mensual	No
Lote N° 2	Lote de Ensayo 1	25 °C/60 % de HR	3, 6, 9, 10 meses	Si
Lote N° 2	Lote de Ensayo 2	25 °C/60 % de HR	3, 6, 9, 10 meses	No
Lote N° 2	Lote de Ensayo 3	30 °C/65 % de HR	mensual	Si

ES 2 500 166 T3

Nº de Lote	Lote de Ensayo	Condición de Almacenamiento	Períodos de Tiempo para el Muestreo	Desecante
Lote Nº 2	Lote de Ensayo 4	30 °C/65 % de HR	mensual	No
Lote Nº 3	Lote de Ensayo 1	25 °C/60 % de HR	3, 6, 9, 10 meses	Si
Lote Nº 3	Lote de Ensayo 2	25 °C/60 % de HR	3, 6, 9, 10 meses	No
Lote Nº 3	Lote de Ensayo 3	30 °C/65 % de HR	mensual	Si
Lote Nº 3	Lote de Ensayo 4	30 °C/65 % de HR	mensual	No
Lote Nº 3	Lote de Ensayo 5	40 °C/75 % de HR	2, 4, y 6 semanas	Si
Lote Nº 3	Lote de Ensayo 6	40 °C/75 % de HR	2, 4, y 6 semanas	No
Lote Nº 4	Lote de Ensayo 1	25 °C/60 % de HR	3, 6, 9, 10 meses	Si
Lote Nº 4	Lote de Ensayo 2	25 °C/60 % de HR	3, 6, 9, 10 meses	No
Lote Nº 4	Lote de Ensayo 3	30 °C/65 % de HR	mensual	Si
Lote Nº 4	Lote de Ensayo 4	30 °C/65 % de HR	mensual	No
Lote Nº 4	Lote de Ensayo 5	40 °C/75 % de HR	2, 4, y 6 semanas	Si
Lote Nº 4	Lote de Ensayo 6	40 °C/75 % de HR	2, 4, y 6 semanas	No

Los resultados del recuento de estabilidad para los lotes de ensayo de la Tabla 15 se exponen en la Tabla 16.

TABLA 16

LOTES Nº 3 Y 4, LOTES DE ENSAYO 5 Y 6 GRUPOS QUINCENALES A 40 °C/75 % DE HR CON O SIN DESECANTE				
Estabilidad (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo				
Periodos de Tiempo a 40 °C/75 % de HR	Lote 3 Lactitol al 7,7% /Sin OPC		Lote 4 Lactitol al 39,7%/Sin OPC	
	Lacto	Bifido	Lacto	Bifido
Punto Temporal 0	3,95 x 10 ⁹	4,30 x 10 ⁹	3,30 x 10 ⁹	2,80 x 10 ⁹
Lote de Ensayo 5 2 semanas (desecante)	4,65 x 10 ⁸	6,75 x 10 ⁸	4,9 x 10 ⁸	6,4 x 10 ⁵
Lote de Ensayo 6 2 semanas (sin desecante)	5,65 x 10 ⁸	6,75 x 10 ⁸	4,05 x 10 ⁸	5,25 x 10 ⁵
4 semanas Lote de Ensayo 5 (desecante)	1,87 x 10 ⁶	1,81 x 10 ⁷	2,3 x 10 ⁷	2,8 x 10 ⁷
Lote de Ensayo 6 4 semanas (sin desecante)	2,18 x 10 ⁸	3,20 x 10 ⁸	7,4 x 10 ⁷	9,35 x 10 ⁷
Lote de Ensayo 5 6 semanas (desecante)	3,75 x 10 ⁵	5,6 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁵
Lote de Ensayo 6 6 semanas (sin desecante)	1,01 x 10 ⁷	1,14 x 10 ⁷	1,35 x 10 ⁵	1,45 x 10 ⁵

- 5 A las seis semanas, el Lote de Ensayo 6 del Lote 3 (lactitol al 7,7 %, sin OPC, sin desecante) presentada lecturas de estabilidad superiores a 1×10^7 , lo que indica que el lactitol al 7,7 % (es decir, CM 50) y la ausencia de un desecante tiene un efecto positivo sobre la estabilidad probiótica de la forma de dosificación cuando se compara con formas de dosificación comparables preparadas con lactitol al 39,7 % (es decir, FINLAC®) y/o se almacenan con un desecante.
- 10 A las 6 semanas, los resultados para el Lote de Ensayo 5 del Lote 3 y de los Lotes de Ensayo 5 y 6 del Lote 4 eran todos inferiores a 1×10^6 .

TABLA 17

LOTES N° 1, 2, 3 Y 4, LOTES DE ENSAYO 3 Y 4 GRUPOS MENSUALES A 30 °C/65 % DE HR CON O SIN DESECANTE								
Períodos de Tiempo a 30 °C/65 % de H R	Estabilidad (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo							
	Lote N° 1 Lactitol al 7,7 % OPC		Lote N° 2 Lactitol al 39,7 % OPC		Lote N° 3 Lactitol al 7,7 % sin OPC		Lote N° 4 Lactitol al 39,7 % sin OPC	
	Lacto	Bifido	Lacto	Bifido	Lacto	Bifido	Lacto	Bifido
Punto Temporal 0	1,85 x 10 ⁹	1,25 x 10 ⁹	1,75 x 10 ⁹	1,80 x 10 ⁹	3,95 x 10 ⁹	4,30 x 10 ⁹	3,30 x 10 ⁹	2,80 x 10 ⁹
1 mes Lote de Ensayo 3 (desecante)	6,2 x 10 ⁸	6,1 x 10 ⁸	6,85 x 10 ⁸	5,2 x 10 ⁸	1,16 x 10 ⁹	1,15 x 10 ⁹	1,06 x 10 ⁹	1,08 x 10 ⁹
1 mes Lote de Ensayo 4 (sin desecante)	7,6 x 10 ⁸	6,15 x 10 ⁸	6,9 x 10 ⁸	7,75 x 10 ⁸	8,45 x 10 ⁸	6,75 x 10 ⁸	1,01 x 10 ⁹	9,5 x 10 ⁸
2 meses Lote de Ensayo 3 (desecante)	1,75 x 10 ⁷	4,0 x 10 ⁷	-	-	1,45 x 10 ⁷	6,45 x 10 ⁷	6,2 x 10 ⁷	9,6 x 10 ⁷
2 meses Lote de Ensayo 4 (sin desecante)	-	-	1,17 x 10 ⁸ ol	1,69 x 10 ⁸	-	-	-	-
3 meses Lote de Ensayo 3 (desecante)	7,95 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁶	5,85 x 10 ⁶	4,1 x 10 ⁶	7,7 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁵	4,75 x 10 ⁶	9,05 x 10 ⁶
3 meses Lote de Ensayo 4 (sin desecante)	6,0 x 10 ⁶	5,0 x 10 ⁶	6,85 x 10 ⁶	4,55 x 10 ⁶	1,50 x 10 ⁶	1,26 x 10 ⁶	1,25 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁶
4 meses Lote de Ensayo 3 (desecante)	5,45 x 10 ⁵	4,25 x 10 ⁵	3,7 x 10 ⁵	4,8 x 10 ⁵	3,4 x 10 ⁵	2,9 x 10 ⁵	5,35 x 10 ⁵	3,2 x 10 ⁵
4 meses Lote de Ensayo 4 (sin desecante)	3,3 x 10 ⁶	3,65 x 10 ⁶	4,1 x 10 ⁶	4,1 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶	2,05 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶
5 meses Lote de Ensayo 3 (desecante)	4,35 x 10 ⁵	1,95 x 10 ⁵	2,9 x 10 ⁵	2,95 x 10 ⁵	4,2 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁵	2,45 x 10 ⁵
5 meses Lote de Ensayo 4 (sin desecante)	4,8 x 10 ⁵	5,95 x 10 ⁵	2,25 x 10 ⁵	2,35 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁵	3,1 x 10 ⁵
6 meses Lote de Ensayo 3 (desecante)	8,35 x 10 ⁴	8,35 x 10 ⁴	1,60 x 10 ⁵	1,76 x 10 ⁵	1,29 x 10 ⁵	1,26 x 10 ⁵	1,43 x 10 ⁵	1,67 x 10 ⁵
6 meses Lote de Ensayo 4 (sin desecante)	1,55 x 10 ⁵	1,54 x 10 ⁵	1,04 x 10 ⁵	1,01 x 10 ⁵	1,26 x 10 ⁵	1,14 x 10 ⁵	1,37 x 10 ⁵	1,29 x 10 ⁵

5 Después de cinco meses, los resultados de todos los lotes del ensayo eran inferiores a 1×10^6 . Los estudios de estabilidad para el Lote N° 1, Lotes de Ensayo 3 y 4 (con y sin un desecante) se interrumpieron después del grupo de seis meses y los estudios de estabilidad para los lotes de los ensayos restantes se interrumpieron después del grupo de cinco meses.

10 Los resultados de la Tabla 17 muestran que el Lote de Ensayo 4 del Lote 1 (lactitol al 7,7 %, OPC, sin desecante) presentaba una estabilidad probiótica ligeramente mayor sobre los lotes de ensayo restantes.

TABLA 18

LOTES N° 1, 2, 3 Y 4, LOTES DE ENSAYO 1 Y 2 GRUPOS MENSUALES A 25 °C/60 % DE HR CON O SIN DESECANTE								
Períodos de Tiempo a 25 °C/60 % de H R	Estabilidad (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo							
	Lote N° 1 Lactitol al 7,7 % OPC		Lote N° 2 Lactitol al 39,7 % OPC		Lote N° 3 Lactitol al 7,7 % sin OPC		Lote N° 4 Lactitol al 39,7 % sin OPC	
	Lacto	Bífido	Lacto	Bífido	Lacto	Bífido	Lacto	Bífido
Punto Temporal 0	1,85 x 10 ⁹	1,25 x 10 ⁹	1,75 x 10 ⁹	1,80 x 10 ⁹	3,95 x 10 ⁹	4,30 x 10 ⁹	3,30 x 10 ⁹	2,80 x 10 ⁹
3 meses Lote de Ensayo 1 (desecante)	2,32 x 10 ⁷	2,62 x 10 ⁷	2,24 x 10 ⁷	1,68 x 10 ⁷	1,86 x 10 ⁷	1,60 x 10 ⁷	1,86 x 10 ⁷	1,71 x 10 ⁷
3 meses Lote de Ensayo 2 (sin desecante)	2,65 x 10 ⁷	2,22 x 10 ⁷	2,43 x 10 ⁷	1,92 x 10 ⁷	1,16x 10 ⁷	2,00 x 10 ⁷	1,06 x 10 ⁷	1,24 x 10 ⁷
6 meses Lote de Ensayo 1 (desecante)	8,35 x 10 ⁵	8,35 x 10 ⁵	1,60 x 10 ⁵	1,76 x 10 ⁵	1,29 x 10 ⁵	1,26 x 10 ⁵	1,43x 10 ⁵	1,67 x 10 ⁵
6 meses Lote de Ensayo 2 (sin desecante)	1,55 x 10 ⁵	1,54 x 10 ⁵	1,04 x 10 ⁵	1,01 x 10 ⁵	1,26 x 10 ⁵	1,14 x 10 ⁵	1,37x 10 ⁵	1,29 x 10 ⁵
9 meses Lote de Ensayo 1 (desecante)	0	0	2,3 x 10 ³	0	6,1 x 10 ⁶	6,6 x 10 ⁶	1,9 x 10 ⁶	7,7 x 10 ⁵
9 meses Lote de Ensayo 2 (sin desecante)	0	0	2,0 x 10 ¹	0	0	0	0	0
10 meses Lote de Ensayo 1 (desecante)	0	0	3,15 x 10 ²	0	3,3 x 10 ⁶	3,9 x 10 ⁶	1,06 x 10 ⁶	4,3 x 10 ⁵
10 meses Lote de Ensayo 2 (sin desecante)	0	0	0	0				

Los resultados de la Tabla 18 muestran que hasta 3 meses, todos los Lotes de Ensayo se sometían a ensayo de una forma relativamente consistente, con el Lote 1, Lotes de Ensayo 1 y 2 (lactitol al 7,7 %, OPC, con y sin desecante), teniendo los recuentos más elevados. A los 6 meses, el Lote N° 1, Lote de Ensayo 1 (lactitol al 7,7 %, OPC, con desecante) presentaba el número más elevado de colonias viables tanto de *L. acidophilus* como de la subsp. *lactis* de *B. animalis*. A los nueve meses, sin embargo, el Lote N° 1, Lote de Ensayo 1, no presentaba ninguna colonia positiva, mientras que los Lotes de Ensayo 3 (sin OPC, desecante) de ambos Lotes N° 3 y N° 4 aún presentaban colonias viables de ambas especies bacterianas a los diez meses. A los nueve y los diez meses, el Lote de Ensayo 3 del Lote 3 (lactitol al 7,7 %, sin OPC, desecante) presentaban un recuento significativamente más elevado de especies viables que el que presentaba el Lote de Ensayo 3 del Lote 4 (lactitol al 39,7 %, sin OPC, desecante).

EJEMPLO 8

15 PREPARACIÓN DE FORMA DE DOSIFICACIÓN PROBIÓTICA CON *L. ACIDOPHILUS*, SUBSP. *LACTIS* DE *B. ANIMALIS*, PALMITATO DE VITAMINA A, Y ÓXIDO DE CINCO ENCAPSULADO

Un lote de 500 comprimidos de una forma de dosificación probiótica de combinación con sabor a mango que contenía *L. acidophilus*, subsp. *lactis* de *B. animalis*, vitamina A, y óxido de cinc se preparó con los ingredientes que se exponen en la Tabla 19.

TABLA 19

Ingredientes	Comprimidos con Sabor a Mango 500 Comprimidos	
	mg/comp.	% en p/p
100 billones de colonias/gramo de <i>L. acidophilus</i>	50,00	7,46
100 billones de colonias/gramo de subsp. <i>lactis</i> de <i>B. animalis</i>	50,00	7,46
Óxido de Zinc Encapsulado	10,00	1,49
Palmitato de Vitamina A	6,80	1,01
PHARMABURST® C1 (vehículo)	539,10	80,46
Sucralosa (edulcorante)	0,90	0,13
Sabor a Mango Artificial P1 1040 S.D. Polvo	2,00	0,30
FD y C Colorante	1,20	0,18
Estearato de Magnesio (lubricante)	100	1,49
Total	670,0	100,00

Los comprimidos se prepararon por compresión directa en una máquina giratoria usando una herramienta cóncava convencional redonda de 1,3 cm. La dureza de los comprimidos estaba en el intervalo de 8-12 kp. Los comprimidos con sabor a mango se almacenaron con un desecante y se sometieron al ensayo de estabilidad para *L. acidophilus* y la subsp. *lactis* de *B. animalis* independientemente en puntos temporales variables en tres condiciones de almacenamiento diferentes: 40 °C/75 % de HR (Tabla 20); 35 °C/65 % de HR (Tabla 21); y 25 °C/60 % de HR (Tabla 22).

TABLA 20

Período de Tiempo a 40 °C/75 % de HR	Estabilidad (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo	
	Punto Temporal 0	4,6 x 10 ⁹
2 semanas	6,55 x 10 ⁸	7,5 x 10 ⁸
1 mes	2,25 x 10 ⁶	3,65 x 10 ⁶

TABLA 21

Período de Tiempo a 30 °C/65 % de HR	Estabilidad (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo	
	<i>L. acidophilus</i>	subsp. <i>lactis</i> de <i>B. animalis</i>
Punto Temporal 0	4,6 x 10 ⁹	5,45 x 10 ⁹
1 mes	3,6 x 10 ⁹	3,4 x 10 ⁹
2 meses	2,45 x 10 ⁸	3,00 x 10 ⁸
3 meses	2,26 x 10 ⁸	2,05 x 10 ⁸
8 meses	3,8 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁶
9 meses	3,1 x 10 ⁵	1,58 x 10 ⁶

TABLA 22

Período de Tiempo a 25 °C/60 % de HR	Estabilidad (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo	
	<i>L. acidophilus</i>	subsp. <i>lactis</i> de <i>B. animalis</i>
Punto Temporal 0	4,6 x 10 ⁹	5,45 x 10 ⁹

Período de Tiempo a 25 °C/60 % de HR	Estabilidad (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo	
	<i>L. acidophilus</i>	subsp. <i>lactis</i> de <i>B. animalis</i>
3 meses	2,17 x 10 ⁸	2,34 x 10 ⁸
6 meses	1,91 x 10 ⁷	1,87 x 10 ⁷

Las Tablas 21 y 22 muestran que las muestras sometidas a ensayo a 30 °C/65 % de HR y 25 °C/60 % de HR presentaban recuentos de estabilidad muy elevados a los 3 meses y las muestras sometidas a ensayo a 25 °C/60 % de HR presentaban recuentos de estabilidad elevados a los 6 meses lo que indica que la presencia de vitamina A y óxido de cinc puede tener un efecto positivo sobre la estabilidad de la forma de dosificación probiótica en estas condiciones durante un periodo de tiempo de 3 a 6 meses. De forma comparativa, los valores de los recuentos a los 3 meses para las muestras de las Tablas 21 y 22 son significativamente más elevados que los valores de los recuentos a los 3 meses para las muestras de las Tablas 17 y 18.

5

10 EJEMPLO 9

PREPARACIÓN DE FORMA DE DOSIFICACIÓN PROBIÓTICA CON *L. ACIDOPHILUS*, SUBSP. *LACTIS* DE *B. ANIMALIS*, Y OPC DE FUENTE DE CORTEZA DE PINO

15 Un lote de 600 comprimidos de una forma de dosificación probiótica de combinación de sabor a naranja que contenía *L. acidophilus*, la subsp. *lactis* de *B. animalis*, y OPC de corteza de pino se preparó con los ingredientes que se exponen en la Tabla 23.

TABLA 23

Ingredientes	Comprimidos con Sabor a Naranja 600 Comprimidos	
	mg/comp.	% en p/p
100 billones de colonias/gramo de <i>L. acidophilus</i>	50,00	7,69
100 billones de colonias/gramo de subsp. <i>lactis</i> de <i>B. animalis</i>	50,00	7,69
OPC de Corteza de Pino (antioxidante)	10,00	1,54
Lactitol (FINLAC® DC) (prebiótico)	50,00	7,69
PHARMABURST® C1 (vehículo)	477,60	73,48
Sucralosa (edulcorante)	0,60	0,09
Sabor a naranja natural y artificial secado por pulverización	0,60	0,09
FD y C Amarillo N° 6 Laca de Aluminio	120	0,18
Estearato de Magnesio (lubricante)	10,0	1,54
Total	650,0	100,00

20 Los comprimidos se prepararon por compresión directa en una máquina giratoria usando una herramienta cóncava convencional redonda de 1,3 cm. La dureza de los comprimidos estaba en el intervalo de 8-12 kp. Los comprimidos tal como se prepararon se almacenaron con un desecante y se sometieron a ensayo de estabilidad para *L. acidophilus* y la subsp. *lactis* de *B. animalis* tal como se expone en las Tablas 24, 25, y 26.

25

TABLA 24

Periodos de Tiempo a 40 °C/75 % de HR	Estabilidad (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo	
	<i>L. acidophilus</i>	subsp. <i>lactis</i> de <i>B. animalis</i>
Punto Temporal 0	1,06 x 10 ⁹	1,08 x 10 ⁹
2 semanas	1,06 x 10 ⁸	7,2 x 10 ⁷
1 mes	1,9 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶

Periodos de Tiempo a 40 °C/75 % de HR	Estabilidad (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo	
2 meses	2,2 x 10 ⁵	2,35 x 10 ⁵

TABLA 25

Periodos de Tiempo a 30 °C/65 % de HR	Estabilidad (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo	
	<i>L. acidophilus</i>	subsp. <i>lactis</i> de <i>B. animalis</i>
Punto Temporal 0	1,06 x 10 ⁹	1,08 x 10 ⁹
1 mes	4,3 x 10 ⁸	4,65 x 10 ⁸
2 meses	5,25 x 10 ⁸	5,8 x 10 ⁸
3 meses	2,4 x 10 ⁸	2,35 x 10 ⁸
4 meses	4,0 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶
6 meses	0	0

TABLA 26

Periodos de Tiempo a 25 °C/60 % de HR	Estabilidad (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo	
	<i>L. acidophilus</i>	subsp. <i>lactis</i> de <i>B. animalis</i>
Punto Temporal 0	1,06 x 10 ⁹	1,08 x 10 ⁹
3 meses	8,0 x 10 ⁸	7,75 x 10 ⁸
6 meses	1,7 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁸
9 meses	9,4 x 10 ⁷	3,1 x 10 ⁷

5 La Tabla 25 muestra un porcentaje elevado de colonias vivas de ambas especies bacterianas a 30 °C/65 % de HR a los 6 meses y la Tabla 26 muestra un porcentaje muy elevado de colonias vivas de ambas especies bacterianas a 25 °C/60 % de HR a los 9 meses, lo que indica que quizá la OPC de corteza de pino aumenta la estabilidad de las formas de dosificación probióticas en las condiciones especificadas. De forma comparativa, los valores de los recuentos a los 3 meses para las muestras de las Tablas 25 y 26 (OPC de corteza de pino, FINLAC® lactitol, desecante) son significativamente más elevados que los valores de los recuentos a los 3 meses para las muestras del Lote 2, Lote de Ensayo 2 (OPC de pepita de uva, FINLAC® lactitol, desecante) en las Tablas 17 y 18.

EJEMPLO 10

15 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE *L. ACIDOPHILUS* JUNTO CON MANITOL Y/O SORBITOL

Dos lotes de 200 comprimidos probióticos se prepararon con *L. acidophilus* y manitol (Lote A) y *L. acidophilus* y sorbitol (Lote B). La Tabla 27 expone los ingredientes que se usaron para preparar los comprimidos.

TABLA 27

	Lote A Manitol 200 Comprimidos		Lote B Sorbitol 200 Comprimidos	
	mg/comp.	% en p/p	mg/comp.	% en p/p
<i>L. acidophilus</i>	50,0	10,0	50,0	10,0
Manitol	440,0	88,00	-	-
Sorbitol	-	-	440,0	88,00
Estearato de Magnesio (lubricante)	10,0	2,00	10,00	2,00
Total	500,00	100,00	500,00	100,00
Dureza del Comprimido	5-7 kp		24-27 kp	

ES 2 500 166 T3

Los comprimidos se prepararon por compresión directa en una máquina giratoria usando una herramienta cóncava convencional redonda de 1,3 cm. Tal como se muestra en la Tabla 27, la dureza de los comprimidos varió de forma espectacular debido las características del manitol y del sorbitol. La Tabla 28 muestra los resultados del ensayo de estabilidad para *L. acidophilus* a 40 °C/75 % de HR sin un desecante en tres puntos temporales.

5

TABLA 28

Periodos de Tiempo a 40 °C/75 % de HR	Estabilidad (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo	
	Lote A Manitol	Lote B Sorbitol
Punto Temporal 0	2,65 x 10 ⁸	4,1 x 10 ⁸
3 meses	0	0
1 meses	0	0

Los resultados de la Tabla 28 muestran que los cultivos probióticos en los comprimidos no pudieron sobrevivir al almacenamiento a 40 °C/75 % de HR lo que indica que manitol y sorbitol solos no tienen efecto sobre la estabilidad del *L. acidophilus* a 40°C/75% RH.

10

Como un control para el ensayo de los Lotes A y B, se prepararon formulaciones probióticas con los vehículos PHARMABURST® CI (Lote C; SPI Polyols, New Castle, DE) y STARCH 1500® (Lote D; Colorcon, Inc., West Point, PA). Los ingredientes para las formulaciones de control se exponen en la Tabla 29.

15

TABLA 29

	Lote C STARCH 1500® 200 Comprimidos		Lote D PHARMABURST® 200 Comprimidos	
	mg/comp.	% en p/p	mg/comp.	% en p/p
<i>L. acidophilus</i>	50,0	10,0	50,0	10,0
PHARMABURST® C1 (vehículo)	-	-	440,0	88,00
STARCH 1500® (vehículo)	440,0	88,00		
Estearato de Magnesio (lubricante)	10,0	2,00	10,00	2,00
Total	500,00	100,00	500,00	100,00
Dureza del Comprimido	2-3 Kp		8-10 kp	

Los comprimidos se prepararon por compresión directa en una máquina giratoria usando una herramienta cóncava convencional redonda de 1,3 cm. La dureza de los comprimidos variaba con las características de cada formulación. Los lotes de control se almacenaron durante dos semanas a 40 °C/75 % de HR sin un desecante y se sometieron a ensayo para *L. acidophilus* en dos períodos de tiempo, que se exponen en la Tabla 30.

20

TABLA 30

Periodos de Tiempo a 40 °C/75 % de HR	Estabilidad (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo	
	Lote C STARCH 1500®	Lote D PHARMABURST®
Punto Temporal 0	4,45 x 10 ⁸	3,0 x 10 ⁹
2 semanas	8,2 x 10 ³	2,65 x 10 ³
1 mes	0	0

Los resultados de la Tabla 30 muestran que la presencia de PHARMABURST® solo proporciona un aumento limitado en el aumento de la forma de dosificación probiótica a partir del punto temporal 0 a las 2 semanas a 25 °C/60 % de HR.

25

EJEMPLO 11

ENSAYO DE SINERGIA DE PHARMABURST®, LACTITOL, Y OPC SOBRE LA ESTABILIDAD PROBIÓTICA

30

Para determinar si el lactitol y las OPC tienen un efecto sinérgico con el vehículo PHARMABURST® de las Tablas 29 y 30, y de este modo potencian la estabilidad del probiótico de *L. acidophilus*, se prepararon cuatro lotes de comprimidos y se sometieron a ensayo en las condiciones de almacenamiento rigurosas de 40 °C/75 % de HR. Se prepararon las siguientes formulaciones paralelas: (1) PHARMABURST® CI (abreviado como "PHRMBRST" en las Tablas 31 y 32) y lactitol con estearato de magnesio (Lote E); (2) PHARMABURST® C1 y lactitol con estearato cálcico (Lote F); (3) PHARMABURST® CI y OPC de corteza de pino con lactitol (Lote G); y (4) PHARMABURST® C1 y OPC de corteza de pino sin lactitol (Lote H). Todas las formulaciones paralelas se colocaron en un ensayo de estabilidad acelerado de acuerdo con las formulaciones que se exponen en la Tabla 31.

TABLA 31

Ingredientes	Lote E PHRMBRST®, Lactitol, y Estearato de Mg 200 Comprimidos		Lote F PHRMBRST®, Lactitol, y Estearato de Ca 200 Comprimidos		Lote G PHRMBRST®, Lactitol, OPC, y Estearato de Mg 200 Comprimidos		Lote H PHRMBRST®, OPC, y Estearato de Mg 200 Comprimidos	
	mg/comp.	% en p/p	mg/comp.	% en p/p	mg/comp.	% en p/p	mg/comp.	% en p/p
<i>L. acidophilus</i>	50,00	10,00	50,00	10,00	50,00	10,00	50,00	10,00
PHARMABURST® C1 (vehículo)	390,00	78,00	390,00	78,00	384,00	76,40	434,00	86,80
Lactitol (prebiótico)	50,00	10,00	50,00	10,00	50,00	10,00	-	-
OPC de Corteza de Pino (antioxidante)	-	-	-	-	6,00	1,20	6,00	1,20
Estearato Cálcico	-	-	10,00	2,00	-	-	-	-
Estearato de Magnesio	10,00	2,00	-	-	10,00	2,00	10,00	2,00
Total	500,00	100,00	500,00	100,00	500,00	100,00	500,00	100,00
Dureza	8-10 kp		8-10 kp		8-10 kp		8-10 kp	

Los comprimidos se prepararon por compresión directa en una máquina giratoria usando una herramienta cóncava convencional redonda de 1,3 cm. La dureza de dos comprimidos variaba con las características de cada formulación. Todas las muestras se almacenaron durante un mes a 40 °C/75 % de HR sin un desecante y se sometieron a ensayo para *L. acidophilus* en los períodos de tiempo especificados en la Tabla 32.

TABLA 32

Periodos de Tiempo a 40 °C/75 % de HR	Estabilidad de <i>L. acidophilus</i> (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo			
	Lote E PHRMBRST®, Lactitol, y Estearato de Mg	Lote F PHRMBRST®, Lactitol, y Estearato de Ca	Lote G PHRMBRST®, Lactitol, OPC, y Estearato de Mg	Lote H PHRMBRST®, OPC, y Estearato de Ca
Punto Temporal 0	5,6 x 10 ⁹	4,5 x 10 ⁹	2,2 x 10 ⁹	3,7 x 10 ⁹
2 semanas	1,59 x 10 ⁸	3,55 x 10 ⁷	1,61 x 10 ⁷	4,95 x 10 ⁷
1 mes	0	0	0	0

EJEMPLO 12

EL EFECTO DE LACTITOL Y PHARMABURST® SOBRE LA ESTABILIDAD DE *L. ACIDOPHILUS* A 40 °C/75 % DE HR

Para someter a ensayo si se está produciendo una reacción sinérgica entre el lactitol y PHARMABURST® para dar como resultado una mayor estabilidad de *L. acidophilus*, se formularon tres lotes adicionales de comprimidos (Lotes I, J, y K) tal como se expone en la Tabla 33; los resultados de estabilidad para los comprimidos en los tres lotes a 40 °C/75 % de HR se exponen en la Tabla 34.

TABLA 33

Ingredientes	Lote I Lactitol 200 Comprimidos		Lote J PHARMABURST® 200 Comprimidos		Lote K Lactitol y PHARMABURST®, 200 Comprimidos	
	mg/comp.	% en p/p	mg/comp.	% en p/p	mg/comp.	% en p/p
<i>L. acidophilus</i>	50,00	10,00	50,00	10,00	50,00	10,00
PHARMABURST® C1 (vehículo)	-	-	440,00	88,00	40,00	8,00
Lactitol (prebiótico)	440,00	88,00	-	-	400,00	80,00
Estearato de Magnesio	10,00	2,00	10,00	2,00	10,00	2,00
Total	500,00	100,00	500,00	100,00	500,00	100,00

TABLA 34

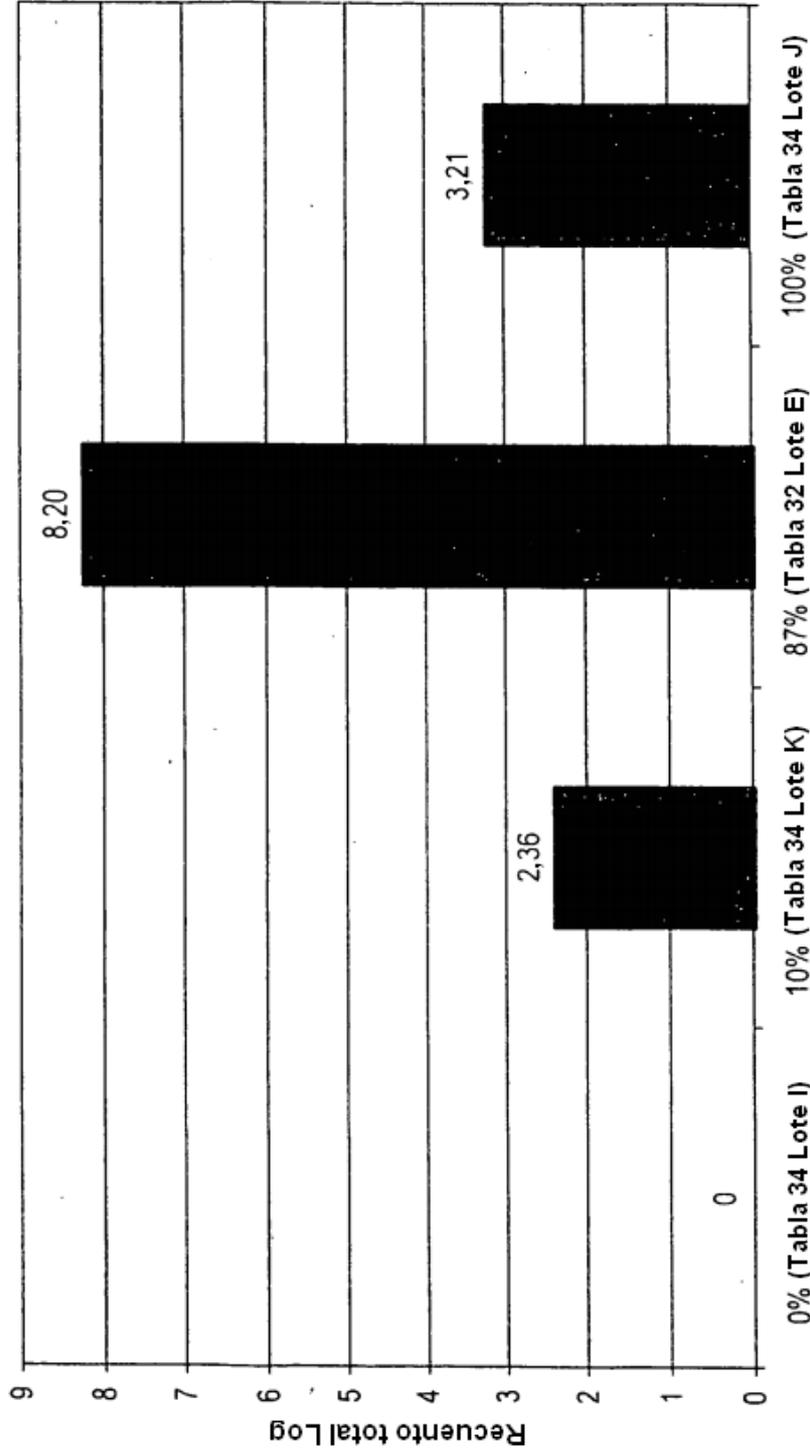
Periodos de Tiempo a 40 °C/75 % de HR	Estabilidad de <i>L. acidophilus</i> (Presencia de bacilo Gram Positivo, Anaerobio) Recuento Total/gramo		
	Lote I Lactitol	Lote J PHARMABURST®	Lote K Lactitol y PHARMABURST®
Punto Temporal 0	4,4 x 10 ⁸	4,4 x 10 ⁸	4,1 x 10 ⁸
2 semanas	0	1,62 x 10 ³	2,3 x 10 ²

5 Los resultados de la Tabla 34 muestran que el lactitol solo no muestra colonias viables de *L. acidophilus* después de dos semanas a 40 °C/75 % de HR mientras que PHARMABURST® solo y lactitol con incluso un porcentaje en peso relativamente bajo de PHARMABURST® no mostraba colonias viables a las 2 semanas en las condiciones de almacenamiento rigurosas de 40 °C/75 % de HR.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende al menos una especie probiótica en un vehículo formado por al menos dos alcoholes de azúcar, en la que al menos esos dos alcoholes de azúcar comprenden manitol y sorbitol.
2. Un método para mejorar la estabilidad de una composición probiótica que comprende combinar al menos una especie probiótica con un vehículo formado por al menos dos alcoholes de azúcar, en el que al menos esos dos alcoholes de azúcar comprenden manitol y sorbitol.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en los que el vehículo comprende adicionalmente:
- (i) un agente disgregante seleccionado entre el grupo que consiste en croscarmelosa sódica, crospovidona, goma de gelano, hidroxipropil celulosa, almidón, y glicolato sódico de almidón;
 - 15 (ii) una sustancia de deslizamiento seleccionada entre el grupo que consiste en dióxido de silicio, dióxido de silicio coloidal, y talco; o
 - (iii) un agente lubricante seleccionado entre el grupo que consiste en estearato cálcico, estearato de magnesio, ácido esteárico, estearil fumarato sódico, y ácidos grasos basados en vegetales.
- 20 4. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en los que el vehículo está presente en la composición en un intervalo de un 30 % en p/p a un 98 % en p/p.
5. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en los que los al menos dos alcoholes de azúcar están formados por manitol, sorbitol, y lactitol.
- 25 6. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en los que la menos una especie probiótica se selecciona entre el grupo que consiste en *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, subsp. *lactis* de *B. animalis*, *B. longum*, *Streptococcus thermophilis*, *Enterococcus faecalis*, y *E. faecium*.
- 30 7. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en los que la al menos una especie probiótica está presente en la composición en un intervalo de 10^6 a 10^{10} colonias por unidad de dosificación.
8. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, que comprenden adicionalmente un fitonutriente, y en los que el fitonutriente se selecciona opcionalmente entre catequinas, polifenoles, y proantocianidinas oligoméricas (OPC).
- 35 9. La composición o método de la reivindicación 8, en los que la OPC está presente en la composición en un intervalo de un 0,5 % en p/p a un 10 % en p/p.
- 40 10. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, que comprenden adicionalmente una vitamina seleccionada entre el grupo que consiste en vitamina A (retinol), vitamina B₂ (riboflavina), vitamina B₃ (niacina), vitamina B₅ (ácido pantoténico), vitamina B₆ (piridoxina), vitamina B₇ (biotina), vitamina B₉ (ácido fólico), vitamina B₁₂ (cianocobalamina), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina D₁ (lamisterol), vitamina D₂ (ergocalciferol), vitamina D₃ (dihidrotaquisterol), vitamina D₄ (7-deshidrosterol), vitamina E (tocoferol), y vitamina K (naftoquinona).
- 45 11. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, que comprenden adicionalmente un mineral dietético seleccionado entre el grupo que consiste en calcio, cloruro, magnesio, fósforo, potasio, sodio, y azufre.
- 50 12. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, que comprenden adicionalmente un mineral traza seleccionado entre el grupo que consiste en cromo, cobalto, cobre, flúor, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, selenio, y cinc.
- 55 13. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en los que la composición es una forma de dosificación oral seleccionada entre el grupo que consiste en comprimidos, comprimidos encapsulados, y cápsulas.
- 60 14. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en los que la composición es un polvo que se mezcla en un líquido, en la que el líquido se selecciona entre el grupo que consiste en agua, leche, zumo y yogur.
- 65 15. La composición de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en los que la composición es una goma de mascar.

Estabilidad de *L. acidophilus* después de 2 semanas a 40 °C/75 % de HR



Relación de Pharmaburst C1:Lactitol

Figura 1