

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 416**

51 Int. Cl.:

A61K 9/46 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 15/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.01.2012 PCT/IB2012/000095**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2012 WO12101500**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2012 E 12706669 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 2667849**

54 Título: **Composición efervescente en forma sólida para su uso en aplicaciones vaginales para el tratamiento de infecciones vaginales**

30 Prioridad:

28.01.2011 IT MI20110107
01.03.2011 IT MI20110316

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2020

73 Titular/es:

PROBIOTICAL S.P.A. (100.0%)
Via E. Mattei 3
28100 Novara, IT

72 Inventor/es:

MOGNA, GIOVANNI;
STROZZI, GIAN PAOLO y
MOGNA, LUCA

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 751 416 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición efervescente en forma sólida para su uso en aplicaciones vaginales para el tratamiento de infecciones vaginales

5 La presente invención se refiere a una composición efervescente en forma sólida para su uso en aplicaciones vaginales para el tratamiento de infecciones vaginales.

10 Se conoce bien que la composición de microflora intestinal y urogenital representa un punto crítico para la salud y el bienestar de un individuo. El ecosistema vaginal consiste en células epiteliales que recubren la vagina y el útero, células glandulares que secretan en la luz del órgano y flora bacteriana compleja representada por diferentes especies de microorganismos.

15 Estos microorganismos tienen la capacidad de fermentar glicógeno procedente de la descomposición de células parabasales de la mucosa vaginal eutrófica, con la consiguiente producción de ácido láctico, cuyo efecto final es el establecimiento y mantenimiento de un entorno vaginal ácido (con valores de pH de 4-4,5 en condiciones fisiológicas).

20 Los H⁺ que derivan del ácido láctico contribuyen a la formación de peróxido de hidrógeno. Esta molécula es tóxica para un gran número de especies bacterianas que carecen de la enzima catalasa. A nivel de secreciones vaginales, se alcanzan fácilmente concentraciones de 0,75-5 µg/ml y son abundantemente suficientes para que se exprese el efecto tóxico.

25 La acción combinada de peróxido de hidrógeno, peroxidasa uterina (producida por el cuello uterino y el endometrio) e iones Cl⁻ e I⁻ también limita el crecimiento bacteriano activando directamente polimorfonucleados, que ejercen una acción bactericida en los espacios intercelulares epiteliales. En las mujeres, debido a una variedad de factores exógenos y endógenos, tales como la ingestión de antibióticos, estados de estrés, modulaciones hormonales asociadas con el embarazo y el ciclo menstrual o la ingestión de altas concentraciones de estrógenos, se produce frecuentemente un desequilibrio en el ecosistema vaginal. La alteración en el equilibrio del ecosistema vaginal conduce a una prevalencia de los denominados microorganismos "oportunistas" (por ejemplo, *Candida albicans* y *glabrata*) y/o microorganismos patógenos (por ejemplo, *Neisseria gonorrhoeae* y *Trichomonas vaginalis*) que pueden conducir a candidiasis, vaginitis o formas de vaginosis.

35 Los datos epidemiológicos muestran que actualmente las infecciones vaginales afectan a más de mil millones de mujeres en todo el mundo cada año, con graves repercusiones desde el punto de vista socioeconómico. La terapia generalmente adoptada es una terapia antibiótica y/o una fungicida, que habitualmente proporciona buenos resultados a corto plazo, pero muestra que es incapaz de prevenir infecciones recurrentes debido a la resistencia cada vez mayor de patógenos. Además, no todos los sujetos que necesitan el tratamiento son capaces de emprender y tolerar una terapia antibiótica o fungicida.

40 Se conoce el uso de microorganismos capaces de restaurar la composición correcta de microflora vaginal. Sin embargo, el modo de administración de los microorganismos en el entorno vaginal representa un factor muy crítico. Se conoce que, por ejemplo, cápsulas blandas de gelatina, habitualmente denominadas geles blandos, implican la suspensión del componente probiótico en una matriz oleosa que, después de la aplicación del producto, tiende a constituir una barrera física capaz de ralentizar o inhibir casi totalmente la capacidad de dicho componente probiótico para colonizar la mucosa vaginal. Además, la matriz oleosa puede ejercer un efecto tóxico sobre los microorganismos, hasta el punto de reducir considerablemente el número y la viabilidad de los mismos.

50 Por ejemplo, las cápsulas pueden requerir un tiempo relativamente largo para disolverse y en cualquier caso no aseguran una dispersión adecuada de los principios activos a lo largo del entorno vaginal.

55 Por ejemplo, suspensiones hidrófilas, o hidrogeles, implican un modo de aplicación que no es ni fácil ni muy cómodo. De hecho, los sujetos deben permanecer tumbados durante al menos 20-30 minutos después su aplicación de manera que se evite que el producto se escape.

Finalmente, los comprimidos vaginales tradicionales plantean un problema de alta mortalidad de los microorganismos durante su fabricación y además no son capaces de asegurar una distribución adecuada de microorganismos en el entorno vaginal.

60 Por tanto, existe la necesidad de tener una composición capaz de administrar bacterias probióticas en el entorno vaginal y asegurar una dispersión/distribución completa de las mismas.

Además, existe la necesidad de tener una forma farmacéutica que pueda administrarse fácilmente y sea práctica de usar.

65 En particular, existe la necesidad de tener una composición que represente una alternativa válida a la terapia

antibiótica y/o fungicida y, al mismo tiempo, represente una mejora sobre las formas de administración conocidas.

El solicitante ha descubierto de manera sorprendente que una formulación probiótica en forma de una composición sólida preparada adecuadamente es capaz de resolver los problemas que persisten en la técnica anterior.

El documento WO 2008/065492 de la técnica anterior se refiere a una composición para la administración de principios biológicamente activos en ginecología y campo rectal y usos de los mismos. El documento EP 0956858 de la técnica anterior se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen lactobacilos para el tratamiento de infecciones vaginales.

El contenido de la presente invención es una composición efervescente en forma sólida, tal como se expone en la reivindicación independiente adjunta 1.

Otras realizaciones preferidas de la presente invención se exponen en las reivindicaciones dependientes adjuntas.

La tabla 1 muestra las cepas bacterianas sometidas a prueba por el solicitante y que forman parte del contenido de la presente invención.

La tabla 2 muestra un ejemplo de una composición según la invención.

La tabla 3 muestra los datos de mortalidad para las bacterias probióticas según las diferentes presiones ejercidas y la estabilidad de los comprimidos (expresada como la semivida de la carga bacteriana) tras 2 años de almacenamiento de los mismos a 25°C.

La tabla 4 muestra una composición que no es según la presente invención.

La tabla 5 muestra una composición en forma de comprimido que no es según la presente invención.

El solicitante realizó una larga e intensa actividad de investigación experimental con el objetivo de identificar la composición cualitativa y cuantitativa óptima para preparar la composición de la presente invención, así como las condiciones de operación para la preparación de la misma.

La composición de la presente invención es una composición efervescente. La efervescencia se debe a la formación de dióxido de carbono que se produce cuando un sistema ácido-base que comprende un ácido orgánico y una sal del anión de carbonato y/o bicarbonato se pone en contacto con el agua/la humedad presente en la cavidad vaginal. El sistema ácido-base es capaz de mantener estable el pH intravaginal dentro de un intervalo comprendido desde 3 hasta 5,5, preferiblemente desde 4 hasta 5. Ventajosamente, el pH intravaginal está comprendido desde 4,2 hasta 4,5.

La composición de la presente invención es una composición efervescente en forma sólida. En una realización preferida, el ácido orgánico está en forma sólida, preferiblemente un polvo o gránulos, y la sal del anión de carbonato y/o bicarbonato está en forma sólida, preferiblemente un polvo o gránulos.

En una realización preferida, la composición efervescente en forma sólida está en forma de un comprimido, un óvulo, una pastilla o gránulos.

El ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste en, o alternativamente que comprende, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido láctico y mezclas de los mismos. En una realización preferida, el ácido orgánico es ácido cítrico.

El solicitante ha encontrado que el uso de ácido adípico y/o ascórbico como el ácido orgánico presente en el sistema ácido-base mencionado anteriormente provoca un efecto tóxico sobre los microorganismos, dando como resultado la mortalidad de los mismos en el momento de la preparación de la composición en forma sólida, por ejemplo como polvo o gránulos. En el caso de la preparación de un comprimido, dicha mortalidad se produce después de que los componentes se mezclen para proporcionar una composición en forma sólida, por ejemplo como polvo o gránulos, pero antes de la compresión. Por tanto, la composición de la presente invención no contiene ácido adípico y/o ácido ascórbico.

La sal del anión de carbonato y/o bicarbonato se selecciona del grupo que consiste en o, alternativamente, que comprende: carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de calcio, carbonato de magnesio, carbonato de glicina de sodio, bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio, bicarbonato de calcio, bicarbonato de magnesio, lactato de sodio, lactato de potasio, lactato de carbonato y mezclas de los mismos. Preferiblemente, dicha sal se selecciona del grupo que consiste en o, alternativamente, que comprende una sal del anión de bicarbonato. En una realización preferida, la sal es bicarbonato de sodio.

En una realización preferida, la cantidad de la sal del anión de carbonato o bicarbonato comprende desde el 1 hasta

el 15% en peso, en relación con el peso total de la composición. Preferiblemente, comprende desde el 3 hasta el 13% en peso, en relación con el peso total de la composición; incluso más preferiblemente, comprende desde el 4 hasta el 12% en peso, en relación con el peso total de la composición. Ventajosamente, comprende desde el 5 hasta el 10% en peso, en relación con el peso total de la composición.

5 En una realización preferida, la cantidad de bicarbonato de sodio comprende desde el 1 hasta el 15% en peso, en relación con el peso total de la composición. Preferiblemente, comprende desde el 3 hasta el 13% en peso, en relación con el peso total de la composición; incluso más preferiblemente comprende desde el 5 hasta el 10% en peso, en relación con el peso total de la composición. Ventajosamente, comprende desde el 5 hasta el 10% en peso, en relación con el peso total de la composición.

En una realización preferida, el sistema ácido-base consiste en ácido cítrico y bicarbonato de sodio en una cantidad en peso tal como se describió anteriormente.

15 El solicitante ha encontrado que cuando la sal del anión de carbonato o bicarbonato, por ejemplo bicarbonato de sodio, es más del 15% en peso, en relación con el peso total de la composición, se manifiesta un efecto tóxico frente a los microorganismos debido a un efecto osmótico.

20 La cantidad de ácido orgánico que va a usarse en el sistema ácido-base se calcula una vez que se ha determinado la cantidad de la sal del anión de carbonato o bicarbonato usada según las concentraciones descritas anteriormente. La cantidad de ácido orgánico usada es estequiométrica y es una función de la sal usada y sólo sirve con el fin de formar dióxido de carbono. En presencia de dicha sal, el ácido orgánico es capaz de desarrollar efervescencia, debido a la formación de dióxido de carbono, después de la hidratación dentro de la cavidad vaginal.

25 El comprimido efervescente, adecuadamente formulado, es capaz de administrar una gran población de bacterias lácticas para una rápida colonización de todo el epitelio y la mucosa vaginal. Gracias al sistema efervescente estabilizado y con control de pH, las bacterias lácticas se administran en la cavidad vaginal en un buen estado fisiológico que les permite crecer y multiplicarse.

30 Ventajosamente, la composición de la presente invención, en forma de comprimido efervescente, es capaz de asegurar una distribución óptima de las bacterias sobre la mucosa vaginal. Además, dicha composición es capaz de asegurar y mantener un entorno anaerobio o microaerófilo dentro de la cavidad vaginal gracias a la formación de dióxido de carbono.

35 El solicitante ha encontrado que una mezcla que comprende o, alternativamente, consiste en [celulosa microcristalina:arabinogalactano], preferiblemente en una razón en peso de 1:1 a 3:1, es capaz de conservar el número y la viabilidad de las células de los microorganismos cuando se desea obtener un comprimido a partir de la composición en forma de polvo.

40 En una realización preferida, la composición de la presente invención comprende una mezcla que contiene [celulosa microcristalina:arabinogalactano] en una razón en peso de 1:1 a 3:1.

Preferiblemente, se usa arabinogalactano derivada de plantas. Ventajosamente, se usa arabinogalactano derivada de alerce (por ejemplo, FiberAid®, de la gama de productos Larex® distribuidos por Lonza Inc. EE.UU.).

45 El solicitante ha encontrado del mismo modo que usando almidón de maíz como sustancia de agregación en la composición de la presente invención proporciona resultados insatisfactorios cuando la composición en forma de polvo se usa para preparar comprimidos, ya que los comprimidos obtenidos tras la compresión del polvo están descabezados.

50 Una mezcla que comprende o, alternativamente, consiste en [celulosa microcristalina:arabinogalactano] en una razón en peso de 1:1 a 3:1, por el contrario, permite que se obtengan comprimidos sin la aparición de descabezamiento. Por tanto, los comprimidos obtenidos a partir de la composición de la presente invención no contienen almidón de maíz. En lugar de almidón de maíz, se usa una mezcla que contiene [celulosa microcristalina:arabinogalactano] en una razón en peso preferiblemente comprendida desde 1:1 hasta 3:1. La celulosa microcristalina puede reemplazarse de manera o bien parcial o bien completa por celulosa en forma de polvo. Tanto la celulosa microcristalina como la celulosa en forma de polvo están presentes en la lista de aditivos alimentarios como E460.

60 La arabinogalactano es un biopolímero que consiste en monómeros de arabinosa y galactosa. Existen dos clases de arabinogalactanos: las derivadas de plantas y las de origen microbiano.

La celulosa microcristalina (o celulosa en forma de polvo) está presente en una cantidad comprendida desde el 2 hasta el 45% en peso, en relación con el peso total de la composición, preferiblemente desde el 5 hasta el 25%.

65 La arabinogalactano está presente en una cantidad comprendida desde el 5 hasta el 30% en peso, en relación con

el peso total de la composición, preferiblemente desde el 10 hasta el 20%.

Preferiblemente, la composición de la presente invención puede comprender además al menos un componente adicional seleccionado del grupo que comprende: carboximetilcelulosa de sodio, hidrogenofosfato de calcio anhidro e hidroxipropilmetilcelulosa.

Dicho al menos un componente adicional está presente en la composición de la presente invención en una cantidad total que oscila desde el 3 hasta el 70% p/p, más preferiblemente desde el 6 hasta el 40% p/p, e incluso más preferiblemente desde el 10 hasta el 25% p/p, en relación con el peso total de la composición.

Según una realización preferida de la invención, la composición de la presente invención comprende además estearato de magnesio en una cantidad del 0,5% al 7% p/p, preferiblemente del 1% al 3,5% p/p, en relación con el peso total de la composición.

Según una realización preferida de la invención, la composición de la presente invención puede comprender además dióxido de silicio en una cantidad del 0,5% al 4% p/p, preferiblemente del 1% al 2% p/p, en relación con el peso total de la composición.

Según una realización preferida de la invención, la composición de la presente invención puede comprender además palmitato de sacarosa en una cantidad del 0,5% al 7% p/p, preferiblemente del 1% al 3,5% p/p, en relación con el peso total de la composición.

Según una realización preferida de la invención, la composición de la presente invención puede comprender además una mezcla de glicéridos (grasas saponificables) en una cantidad del 0,5% al 10% p/p, preferiblemente del 2% al 7% p/p, en relación con el peso total de la composición. Según una realización preferida de la invención, la composición puede comprender además desde el 0,5% hasta el 10% p/p, preferiblemente desde el 1% hasta el 5% p/p, de éster de sacarosa, estando los porcentajes expresados en relación con el peso total de la composición.

La composición de la invención es para aplicaciones vaginales para el tratamiento de infecciones vaginales tales como vaginitis, vaginosis, candidiasis, gonorrea, herpes y úlcera venérea.

En una realización preferida, la composición está en forma de un comprimido. Alternativamente, el comprimido puede recubrirse con uno o más materiales poliméricos conocidos en la técnica.

En relación a la población microbiana de las formulaciones según la presente invención, resulta ventajoso usar microorganismos probióticos, usados de manera individual o en una mezcla, incluso una que consiste en diferentes géneros o especies.

Los microorganismos probióticos son por definición microorganismos, predominantemente bacterias de origen humano, que son capaces de inducir efectos beneficiosos si se toman regularmente en una cantidad suficiente y durante una cantidad de tiempo adecuada.

La composición de la presente invención comprende al menos una cepa bacteriana probiótica que tiene la capacidad de reducir y/o eliminar la presencia de agentes patógenos seleccionados del grupo que comprende: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Herpes simplex* y *Haemophilus ducreyi*.

Preferiblemente, dicha cepa bacteriana pertenece a al menos una especie seleccionada del grupo que consiste en: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium catenulatum* o *Bifidobacterium infantis*.

Entre las especies bacterianas mencionadas anteriormente, las cepas bacterianas enumeradas en la tabla 1 han demostrado ser particularmente preferidas.

En una realización preferida, las cepas bacterianas se seleccionan de entre: *Lactobacillus salivarius* CRL 1328, *Lactobacillus paracasei* CRL 1289, *Lactobacillus gasseri* CRL 1259, *Lactobacillus crispatus* CRL 1251, *Lactobacillus crispatus* CRL 1266, *Lactobacillus acidophilus* CRL 1294, *Lactobacillus paracasei* LPC 00, *Lactobacillus plantarum* LP 02 y *Lactobacillus fermentum* LF 10.

En una realización preferida, la composición de la presente invención, preferiblemente en forma de un comprimido, comprende al menos dos cepas seleccionadas del grupo mencionado anteriormente.

En una realización preferida, la composición de la presente invención, preferiblemente en forma de un comprimido, comprende al menos tres cepas seleccionadas del grupo mencionado anteriormente.

5 En una realización preferida, la composición de la presente invención, preferiblemente en forma de un comprimido, comprende al menos cuatro cepas seleccionadas del grupo mencionado anteriormente.

Las cepas seleccionadas de entre: *Lactobacillus salivarius* CRL 1328, *Lactobacillus paracasei* CRL 1289, *Lactobacillus gasseri* CRL 1259, *Lactobacillus crispatus* CRL 1266 y *Lactobacillus fermentum* LF 10 han demostrados ser ventajosas.

10 En los comprimidos según la invención, los microorganismos, preferiblemente usados en forma de un cultivo liofilizado que tiene un recuento viable generalmente comprendido desde 10 hasta 200 mil millones de unidades formadoras de colonias (UFC)/gramo, están presentes preferiblemente en una cantidad del 0,5 al 20% p/p, preferiblemente del 1 al 15% p/p, incluso más preferiblemente del 3 al 10% p/p, en relación con el peso total del comprimido.

15 En una de las realizaciones preferidas, para potenciar la eficacia probiótica de las formulaciones según la presente invención, se introducen componentes prebióticos específicos en la mezcla en polvo, de manera que se obtiene una composición simbiótica. El componente prebiótico es generalmente una mezcla no digerible de naturaleza sacárida, al menos parcialmente soluble en agua o en una disolución acuosa, que estimula el crecimiento y/o la actividad de una o más cepas bacterianas probióticas tal como se describió anteriormente. Entre estos agentes prebióticos, se prefieren fibras dietéticas.

20 Preferiblemente, dicha fibra prebiótica se selecciona del grupo que comprende: fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), trans-galactooligosacáridos (TOS), xilooligosacáridos (XOS), oligosacáridos de quitosano (COS), α -galactósidos (tales como rafinosa y estaquiosa), pectinas, gomas, gomas parcialmente hidrolizadas, inulina, zaragatona, goma arábica, algarrobo, fibra de avena o de bambú, fibras cítricas y, en general, fibras que contienen una parte soluble y una insoluble, en una razón variable entre sí.

25 Ventajosamente, dicha fibra prebiótica se selecciona de entre fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) y xilooligosacáridos (XOS). Las levaduras del género *Candida* no usan estas fibras, lo que por tanto conduce a una ventaja competitiva para las cepas bacterianas presentes en la composición de la presente invención.

30 Preferiblemente, el componente prebiótico está presente en la composición en una cantidad de hasta el 70% p/p, preferiblemente comprende desde el 5 hasta el 50% p/p, incluso más preferiblemente desde el 10 hasta el 30% p/p, en relación con el peso total de la composición.

35 En una realización preferida, la composición según la invención puede contener componentes activos adicionales, por ejemplo vitaminas, minerales, extractos vegetales u otros compuestos con un efecto que es sinérgico con o complementario al de la población de microorganismos presente en las formulaciones según la invención.

40 Preferiblemente, dichos componentes activos adicionales están presentes en la composición en una cantidad de hasta el 70% p/p, preferiblemente comprendida desde el 0,5 hasta el 40% p/p, incluso más preferiblemente desde el 1 hasta el 20% p/p, en relación con el peso total de la composición.

45 La combinación de excipientes tecnológicos de compresión y efervescencia según la presente invención asegura una cohesividad adecuada de los polvos del comprimido y produce la cinética de liberación deseada de los principios activos tras la ingestión de los mismos.

50 El mezclado de los diversos componentes, generalmente en forma de polvo, puede realizarse añadiendo los componentes en cualquier orden, teniendo cuidado de añadir el cultivo de microorganismos, preferiblemente en forma de un liofilizado, como último componente, para evitar la posibilidad de que un tiempo de mezclado excesivo pueda inducir un choque mecánico en la pared de las células bacterianas, con el consiguiente sufrimiento y estabilidad reducida del producto final.

55 Las formulaciones producidas según el método de la presente invención se caracterizan por una excelente fluidez, un parámetro que favorece la carga uniforme de los troqueles (es decir, el espacio dedicado a la acomodación de la cantidad de polvo específica que va a comprimirse) en las máquinas de compresión. Dichas máquinas de compresión normalmente comprenden un dispositivo para cargar los troqueles (generalmente representado por una tolva para administrar la mezcla en polvo) y un disco de metal de radio adecuado, en cuyo grosor se obtienen los troqueles de las mismas; éstas están presentes en un número variable dependiendo de la máquina, y la etapa de compresión del polvo tiene lugar en la misma, gracias al movimiento sinérgico y simultáneo de dos partes móviles de la máquina, definidas como punzones.

60 Durante la etapa de compresión, el punzón inferior define, con su posición, el volumen del troquel (y por tanto la cantidad de polvo cargado cada vez), mientras que el punzón superior, posicionado fuera del troquel durante la

carga del mismo con la mezcla en polvo, es capaz de bajar durante la etapa de compresión y ponerse en contacto con el polvo presente en el troquel, imponiéndose así, gracias a la fuerza ejercida, a deformación mecánica más o menos marcada sobre las partículas que constituyen el polvo. Al final de la etapa de compresión, el punzón superior se eleva, alejándose así del troquel, y posteriormente el punzón inferior también se eleva, expulsando el comprimido recién formado del troquel.

Dichas máquinas de compresión comprenden además varios dispositivos para controlar los principales parámetros de funcionamiento (posición del punzón inferior al comienzo del ciclo de compresión, posición más baja alcanzada por el punzón superior durante el ciclo de compresión, velocidad de rotación del disco en el que están presentes los troqueles, y así sucesivamente). Existen máquinas de compresión alternativas y rotarias, según los modos de funcionamiento generales de la máquina y, por consiguiente, el número de comprimidos que es capaz de producir en una unidad de tiempo dada. Por tanto, los comprimidos pueden producirse usando máquinas de compresión conocidas en la técnica y usando punzones de forma variable, preferiblemente punzones convexos y ovalados redondos de doble radio.

La fuerza de compresión aplicada durante la fabricación se evalúa cuantificando, con un durómetro, la fuerza requerida para romper un comprimido. Dicha fuerza se mide en Kp (kilopondios) (1 Kp = 9,807 Newtons (N)). El efecto negativo de la compresión sobre la población de microorganismos se manifiesta tanto cuando las fuerzas aplicadas son altas, por ejemplo en comprimidos con una dureza de 10-12 Kp, como cuando son bajas, tal como, por ejemplo, en comprimidos con una dureza de 5-6 Kp. La desventaja de usar fuerzas altas es una reducción más grande en el número de microorganismos, mientras que con fuerzas bajas generalmente se obtiene una cohesión reducida del comprimido. Ventajosamente, los comprimidos de la presente invención muestran una fuerza de compresión comprendida desde 5 hasta 12 Kp, dependiendo del tipo de comprimido que se desea obtener.

En pruebas de fabricación en comprimidos que contienen *L. paracasei* LPC 00, *L. acidophilus* LA 02 y *L. salivarius* CRL 1328 (tabla 2), el solicitante obtuvo resultados muy positivos tanto en cuanto a supervivencia como en cuanto a estabilidad posterior.

En particular, se observó una mortalidad que oscilaba desde el 4 hasta el 15% cuando la fuerza de compresión aplicada fue tal como para obtener comprimidos con una dureza comprendida desde 5 hasta 6 Kp y una mortalidad que oscilaba desde el 10 hasta el 25% cuando la fuerza de compresión aplicada fue tal como para obtener comprimidos con una dureza comprendida desde 10 hasta 12 Kp. Otra ventaja del método según la invención es que permite la producción de comprimidos suficientemente cohesivos incluso a fuerzas de compresión bajas, por ejemplo comprimidos con una dureza de 5-6 Kp.

Los comprimidos preparados según la presente invención se sometieron a prueba para evaluar el tiempo de desintegración según la Farmacopea Europea, ed. X, ref. 2.9.1. Se sometió a prueba la friabilidad de comprimidos no recubiertos según la ref. 2.9.7 y la resistencia a la rotura según la ref. 2.9.8.

La tabla 2 muestra un ejemplo de una composición según la invención.

La tabla 3 muestra los datos de mortalidad para las bacterias probióticas (composición mostrada en la tabla 2) según las diferentes presiones ejercidas y la estabilidad de los comprimidos (expresados como la semivida de la carga bacteriana) tras 2 años de almacenamiento de las mismas a 25°C. Los comprimidos obtenidos con las formulaciones según la invención tenían un grosor de aproximadamente 7,7 mm en el caso de comprimidos con un alto grado de dureza y aproximadamente 8,4 mm en el caso de comprimidos con un bajo grado de dureza.

En la tabla 3, la estabilidad se expresa como la semivida del componente probiótico de la formulación, es decir el tiempo que transcurre antes de que se reduzca a la mitad el recuento celular viable inicial.

También se midieron los siguientes:

- (1) Número de células viables 1×10^9 UFC/g de polvo esperadas en tiempo cero
- (2) Número de células viables 1×10^9 UFC/g de polvo encontradas en tiempo cero
- (3) % de mortalidad debido a la compresión
- (4) Número de células viables 1×10^9 UFC/comprimido tras 2 años a 25°C
- (5) Semivida en días

Los datos anteriores se obtuvieron evaluando el número de bacterias probióticas presentes en la composición en polvo y en la composición tras la compresión usando el método de recuento de placas viables, según los métodos conocidos por los expertos en la técnica.

En el caso de la composición en polvo, se resuspendió una cantidad comprendida desde 1 hasta 4 gramos de muestra en un volumen adecuado de un medio líquido estéril, generalmente una solución salina de cloruro de sodio al 0,85%, a la que se le añade peptona bacteriológica en una proporción de 1 g/litro.

5 Tras la disolución del polvo y la posterior homogeneización con un instrumento impulsado por pistón adecuado, el número de células/ml se reduce por medio de diluciones en serie de base 10 posteriores.

10 En la práctica, se transfiere 1 ml de la dilución más concentrada cada vez, usando una pipeta estéril, a 9 ml de diluyente; esta operación se realiza un número de veces que es suficiente para llevar la cantidad de microorganismos presentes por ml de diluyente a un número comprendido desde 10 hasta 300, de manera que después de su transferencia a una placa de Petri y la adición de un medio de cultivo agarizado adecuado, forman colonias separadas, y por tanto contables.

15 En el caso de los comprimidos, se observó un protocolo que contempla la trituración previa de tres a cinco comprimidos y la continuación del análisis tal como se describió anteriormente para la composición en polvo.

20 Los datos experimentales demuestran una baja mortalidad tanto en comprimidos con un alto grado de dureza (aproximadamente el 16,4% de la población inicial) como en aquellos con un grado de dureza más bajo (aproximadamente el 8,2% de la población inicial). Un aspecto ventajoso adicional de la composición de la presente invención es la estabilidad mejorada, a lo largo del tiempo, de los microorganismos probióticos (componente probiótico) presentes en la misma en comparación con la estabilidad típica de una formulación de la técnica anterior. Esta ventaja se debe al uso de una mezcla que contiene [celulosa microcristalina:arabinogalactano] en una razón en peso preferiblemente comprendida desde 1:1 hasta 3:1. Esta mezcla es capaz de limitar en gran medida el daño mecánico provocado a las células bacterianas probióticas por la etapa de compresión y permite que se obtengan comprimidos sin la aparición de descabezamientos.

30 El solicitante ha encontrado que la semividas del componente probiótico en la composición en polvo y en los comprimidos de dureza variable fabricados con una formulación según la invención son muy similares, demostrando el hecho de que los componentes tecnológicos usados son capaces de minimizar el daño mecánico provocado por la etapa de compresión.

Ventajosamente, los comprimidos según la invención muestran una alta tasa de supervivencia de los microorganismos probióticos incluso después de la etapa de compresión.

35 Un aspecto ventajoso adicional es la capacidad para liberar dióxido de carbono cuando el comprimido se desintegra, dando como resultado la creación de un entorno anaerobio o microaerófilo particularmente favorable para la colonización vaginal por los probióticos usados.

40 La efervescencia es capaz además de asegurar una distribución adecuada y homogénea del principio activo probiótico en el entorno vaginal aumentando la eficacia de la colonización.

45 Las composiciones de la presente invención hacen posible la obtención de comprimidos que contienen microorganismos probióticos que son eficaces y estables a lo largo del tiempo, incluso a temperaturas no refrigeradas, porque los componentes que forman la composición se han elegido y seleccionado con el objetivo de reducir la mortalidad debido al mezclado y la mortalidad debido a la compresión sin perjudicar a la cohesión del polvo. Por esta razón, la composición de la presente invención, preferiblemente en forma de un comprimido, no contiene ni ácido adípico ni ácido ascórbico, la cantidad de la sal del anión de carbonato o bicarbonato presente es inferior al 15% en peso, en relación con el peso total de la composición, y se usa una mezcla de celulosa microcristalina y arabinogalactano en lugar de almidón de maíz.

50 El solicitante llegó a estos resultados comenzando a partir de una composición que demostró ser inadecuada (tabla 4).

55 La composición de la tabla 4 muestra: el 80,8% de mortalidad debido al mezclado, el 40,5% de mortalidad debido a la compresión y una mortalidad global (mezclado + compresión) del 88,6%.

60 La composición de la tabla 4 muestra mortalidad notable ya a nivel de polvo, antes de la compresión. El pH de la disolución (en solución salina en una razón de 1:10) no es un problema, ya que es igual a 5,22 para la primera formulación y 5,53 para la segunda.

65 Se encontró que el ácido adípico era tóxico. Pero esta toxicidad sólo representa una determinada parte de la mortalidad observada (aproximadamente el 60% de la mortalidad total). Se encontró que el ácido ascórbico era tóxico. Pero esta toxicidad sólo representa una parte adicional de la mortalidad. Retirando el ácido ascórbico de la composición de la tabla 4 se reduce la mortalidad desde el 73,8 hasta el 26,7%. El ácido adípico, por sí solo, es en cualquier caso tóxico (45,8% a pH 4,24); su toxicidad parece aumentar en presencia de ácido ascórbico. Por tanto, el ácido ascórbico parece mostrar una toxicidad sinérgica con la del ácido adípico.

Sin embargo, es importante observar que la suma de la toxicidad debida al ácido adípico y al ácido ascórbico no representa la mortalidad global observada.

5 Por esta razón, el solicitante investigó la presencia de otros componentes capaces de tener un efecto tóxico con el objetivo de justificar la toxicidad total observada en la composición de la tabla 4.

Por tanto, algún otro componente (aparte del pH, que ya se ha considerado) debe justificar la toxicidad restante de la misma manera que el ácido adípico y ascórbico.

10 Se determinó que un grado de mortalidad se debe a la presión osmótica, dada por el bicarbonato presente en una cantidad excesiva. Se reveló que esta mortalidad era igual a aproximadamente el 20%. El ácido adípico, el ácido ascórbico y los efectos osmóticos mediados por el bicarbonato son responsables de la toxicidad observada. El bicarbonato por sí mismo no es tóxico: se vuelve así sólo debido al efecto osmótico.

15 Por tanto, se preparó una composición (tabla 5) sin ácido adípico ni ácido ascórbico y con una cantidad de anión de bicarbonato (por ejemplo, bicarbonato de sodio) de menos del 15% en peso, en relación con el peso total de la composición.

20 Por ejemplo, 84 mg de bicarbonato de sodio constituyen 1 milimol y el CO₂ que se libera ocupa un volumen total de 25,4 ml a 37°C y a presión atmosférica. La cantidad de ácido cítrico se eligió de tal manera que se garantizara una liberación completa del CO₂ del bicarbonato de sodio a los valores de pH observados después de la disolución del comprimido.

25 La composición de la tabla 5 mostró problemas cuando se sometió a una etapa de compresión para preparar los comprimidos.

30 El polvo (tabla 5) mostró malas propiedades cohesivas debido al uso de almidón de maíz en una formulación con un bajo contenido de humedad. Todos los comprimidos producidos por la máquina de compresión se descabezaron incluso antes de pasar a través del desempolvador.

Después de esta prueba de compresión, el solicitante procedió a reemplazar el almidón de maíz con una mezcla que contenía [celulosa microcristalina:arabinogalactano] en una razón en peso preferiblemente comprendida desde 1:1 hasta 3:1.

35 Tabla 1

Cepa seleccionada	Número de depósito	Fecha de depósito	Depositante
<i>Lactobacillus salivarius</i> CRL1328	DSM 24441	04.01.2011	Probiotical SpA (bajo licencia de Cerela)
<i>Lactobacillus paracasei</i> CRL 1289	DSM 24440	04.01.2011	Probiotical SpA (bajo licencia de Cerela)
<i>Lactobacillus gasseri</i> CRL 1259	DSM 24512	25.01.2011	Probiotical SpA (bajo licencia de Cerela)
<i>Lactobacillus crispatus</i> CRL 1251	DSM 24438	04.01.2011	Probiotical SpA (bajo licencia de Cerela)
<i>Lactobacillus crispatus</i> CRL 1266	DSM 24439	04.01.2011	Probiotical SpA (bajo licencia de Cerela)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL 1294	DSM 24513	25.01.2011	Probiotical SpA (bajo licencia de Cerela)

ES 2 751 416 T3

<i>Lactobacillus fermentum</i> LF 5	CNCMI-789	21.07.1988	Probiotical SpA
<i>Lactobacillus fermentum</i> LF 10	DSM 19187	20.03.2007	Probiotical SpA
<i>Lactobacillus fermentum</i> LF 09	DSM 18298	24.05.2006	Probiotical SpA
<i>Lactobacillus fermentum</i> LF 11	DSM 19188	20.03.2007	Probiotical SpA
<i>Lactobacillus paracasei</i> LPC 00	LMG	31.01.2002	Probiotical SpA
	P-21380		
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 01	LMG P-21021	16.10.2001	Laboratorio Microbiológico Grana Provolone SRL
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 02	LMG P-21020	16.10.2001	Laboratorio Microbiológico Grana Provolone SRL
<i>Lactobacillus pentosus</i> LPS 01	DSM 21980	14.11.2008	Probiotical SpA
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 02	DSM 21717	06.08.2008	Probiotical SpA
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR 04	DSM 16605	20.07.2004	Probiotical SpA
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR 05	DSM 19739	27.09.2007	Probiotical SpA
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR 06	DSM 21981	14.11.2008	Probiotical SpA
<i>Lactobacillus paracasei</i> LPC 08	DSM 21718	06.08.2008	Probiotical SpA
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LDD 01 (MB 386)	DSM 22106	10.12.2008	Probiotical SpA (Steve Jones srl)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSM 17938		BioGaia
<i>Lactobacillus reuteri</i> LRE 01	DSM 23877	05.08.2010	Probiotical SpA
<i>Lactobacillus reuteri</i> LRE 02	DSM 23878	05.08.2010	Probiotical SpA
<i>Lactobacillus reuteri</i> LRE 03	DSM 23879	05.08.2010	Probiotical SpA
<i>Lactobacillus reuteri</i> LRE	DSM 23880	05.08.2010	Probiotical SpA

04			
<i>Lactobacillus salivarius</i> LS03	DSM 22776	23.07.2009	Probiotical SpA
<i>Lactobacillus plantarum</i> PR ci	LMG P-21022	16.10.2001	Laboratorio Microbiológico Grana Provolone SRL
<i>Lactobacillus plantarum</i> 776/2 hi	LMG P-21023	16.10.2001	Laboratorio Microbiológico Grana Provolone SRL
<i>Lactobacillus pentosus</i> 9/1 ei	LMG P-21019	16.10.2001	Laboratorio Microbiológico Grana Provolone SRL

Tabla 2

Composición	mg/comprimido
Cepas bacterianas: <i>L. paracasei</i> LPC 00, <i>L. acidophilus</i> LA 02 y <i>L. salivarius</i> CRL 1328 con una concentración comprendida desde 20 hasta 100 x 10 ⁹ UFC/g	58
Fructooligosacáridos (FOS)	327
Arabinogalactano	250
Celulosa microcristalina	270
Hidrogenofosfato de calcio anhidro	95
Mezcla de glicéridos	65
Ácido cítrico	64
Bicarbonato de sodio	56
Fibra alimenticia insoluble	43
Palmitato de sacarosa	26
Dióxido de silicio	26
Estearato de magnesio	20
TOTAL (1 comprimido)	1.300

Tabla 3

		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Formulación Tabla 2	Polvo	5,9	6,1	/	1,3	327
	Comprimidos con bajo grado de dureza (5-6 Kp)	/	5,6	8,2	1,2	328
	Comprimidos con alto grado de dureza (10-12 Kp)	/	5,1	16,4	1	292

Tabla 4: composición inadecuada

Composición	mg/comprimido
Cepas bacterianas: (<i>L. paracasei</i> LPC 00, <i>L. acidophilus</i> LA 02, <i>L. paracasei</i> CRL 1289 con una concentración comprendida desde 20 hasta	291

ES 2 751 416 T3

100x10 ⁹ /gramo)	
Almidón de maíz	335
Acido adípico	268
Bicarbonato de sodio	210
Ácido ascórbico	100
Estearato de magnesio	42
Lactosa anhidra	34
Ácido esteárico	12
Dióxido de silicio	8
TOTAL: (1 comprimido)	1.300

Tabla 5: composición de 1.300 mg

Componentes	mg/comprimido
Cepas bacterianas: (<i>L. paracasei</i> LPC 00, <i>L. acidophilus</i> LA 02, <i>L. paracasei</i> CRL 1328 con una concentración comprendida desde 20 hasta 10 ⁹ /gramo)	199
Arabinogalactano	300
Galactooligosacáridos (GOS)	315
Almidón de maíz	315
Fibra alimenticia insoluble	43
Ácido cítrico	38
Estearato de magnesio	34
Bicarbonato de sodio	28
Dióxido de silicio	18
Ácido esteárico	10
TOTAL (1 comprimido)	1.300

REIVINDICACIONES

1. Composición efervescente en forma sólida que comprende:
- 5 - un sistema ácido-base que comprende un ácido orgánico y una sal del anión de carbonato y/o bicarbonato; estando dicha sal presente en una cantidad comprendida desde el 1 hasta el 15% en peso, en relación con el peso total de la composición, con la condición de que la composición no contiene ni ácido adípico ni ácido ascórbico,
- 10 - una mezcla que comprende celulosa microcristalina y arabinogalactano, en la que dicha celulosa microcristalina y arabinogalactano están presentes en una razón en peso comprendida desde 1:1 hasta 3:1,
- 15 - al menos una cepa bacteriana probiótica que tiene la capacidad de reducir y/o eliminar la presencia de agentes patógenos seleccionados del grupo que comprende: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Herpes simplex* y *Haemophilus ducreyi*,
- siendo dicha composición para su uso en aplicaciones vaginales para el tratamiento de infecciones vaginales.
- 20 2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha composición está en forma de un comprimido, un óvulo, una pastilla o gránulos.
3. Composición para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que el ácido orgánico se selecciona del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido láctico y mezclas de los mismos; preferiblemente, el ácido orgánico es ácido cítrico.
- 25 4. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la sal del anión de carbonato y/o bicarbonato se selecciona del grupo que consiste en: carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de calcio, carbonato de magnesio, carbonato de glicina de sodio, bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio, bicarbonato de calcio, bicarbonato de magnesio, lactato de sodio, lactato de potasio, lactato de carbonato y mezclas de los mismos; preferiblemente, es una sal del anión de bicarbonato.
- 30 5. Composición para su uso según la reivindicación 4, en la que la sal del anión de carbonato y/o bicarbonato está presente en una cantidad comprendida desde el 3 hasta el 13% en peso, en relación con el peso total de la composición; preferiblemente en una cantidad comprendida desde el 4 hasta el 12% en peso, en relación con el peso total de la composición; incluso más preferiblemente en una cantidad comprendida desde el 5 hasta el 10% en peso, en relación con el peso total de la composición.
- 35 6. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el sistema ácido-base consiste en bicarbonato de sodio y ácido cítrico, y en la que el bicarbonato de sodio está presente en una cantidad comprendida desde el 3 hasta el 13% en peso, en relación con el peso total de la composición; preferiblemente en una cantidad comprendida desde el 4 hasta el 12% en peso, en relación con el peso total de la composición; incluso más preferiblemente en una cantidad comprendida desde el 5 hasta el 10% en peso, en relación con el peso total de la composición.
- 40 7. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicha al menos una cepa bacteriana probiótica pertenece a al menos una especie seleccionada del grupo que consiste en: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium catenulatum* o *Bifidobacterium infantis*; dicha al menos una cepa bacteriana se selecciona preferiblemente de entre: *Lactobacillus salivarius* CRL 1328, *Lactobacillus paracasei* CRL 1289, *Lactobacillus gasseri* CRL 1259, *Lactobacillus crispatus* CRL 1251, *Lactobacillus crispatus* CRL 1266, *Lactobacillus acidophilus* CRL 1294, *Lactobacillus paracasei* LPC 00, *Lactobacillus plantarum* LP 02 y *Lactobacillus fermentum* LF 10.
- 50 8. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dicha composición es para el tratamiento de vaginitis, vaginosis, candidiasis, gonorrea, herpes y úlcera venérea.
- 55 60