



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 01011**

(22) Data de depozit: **29/11/2017**

(41) Data publicării cererii:
30/08/2018 BOPI nr. **8/2018**

(71) Solicitant:
• **LABORATOARELE MEDICA SRL,**
*STR. FRASINULUI NR. 11, OTOPENI, IF,
RO*

(72) Inventatori:
• **OPRIȚA ELENA IULIA,**
*STR. VĂLEA IALOMIȚEI NR.6, BL.C 10,
ET.9, SC.C, AP.184, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;*

• **OANCEA ANCA OLGUȚA,** *STR. PAȘCANI
NR. 5, BL. D7, SC. E, AP. 45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;*
• **CRĂCIUNESCU OANA,**
*BD.NICOLAE GRIGORESCU NR.33, BL.A 1,
SC.3, AP.33, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;*
• **STANCIUC ANA-MARIA,**
*STR.NIȚU VASILE NR.66, BL. 25, SC.2,
AP.52, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;*
• **MORARU ANGELA,** *STR. PETRICANI
NR. 1R, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;*
• **MORARU IONUȚ,** *STR. PETRICANI
NR. 1R, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO*

(54) **COMPOZIȚIE MUCOADEZIVĂ PENTRU MENȚINEREA ȘI/SAU
REECHILIBRAREA MICROFLOREI VAGINALE**

(57) Rezumat:

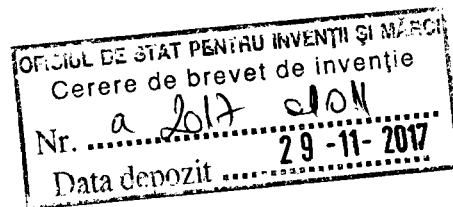
Invenția se referă la o compoziție mucoadezivă pentru menținerea și/sau re-echilibrarea microflorei vaginale. Compoziția, conform invenției, este constituită în părți în greutate din 50...80 părți soluție aposă formată din 20...60% copolimer de tip Poloxamer P407, 1...5% nanoceluloză bacteriană, eventual, 5...10% chitosan, respectiv 0,1...5% pulbere de cactus, 5...20 părți în greutate compuși post biotici de tip acid lactic și acid citric, eventual 2...6 părți în greutate uleiuri esențiale

alese dintre ulei esențial de cimbru și arbore de ceai, respectiv 5...10 părți în greutate oligozaharide prebiotice alese dintre inulină și fructo-oligozaharide, și 4...10 părți în greutate extracte hidrogliceroalcoolice de concentrație 50% alese dintre merișor și semințe de struguri.

Revendicări: 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





DESCRIEREA INVENTIEI

Compozitie mucoadeziva pentru mentinerea si/sau re-echilibrarea microflorei vaginale

Prezența invenție se refera la o compozitie mucoadeziva sub forma de gel pe baza de compusi naturali care contine: uleiuri esentiale, oligozaharide probiotice, polifenoli prebiotici, compusi postbiotici și mucoadezivi și care este destinata mentinerii/re-echilibrării microflorei vaginale prin protejarea și stimularea populatiilor locale de lactobacili vaginali.

Sunt cunoscute diferite compoziții mucoadezive care sunt destiate reechilibrării microflorei vaginale. Microflora vaginala normala la femeile aflate la varsta reproducerii este caracterizata de dominanța bacteriilor producatoare de acid lactic din grupul *Lactobacillus ssp.* care mentine pH-ul acid al lichidelor vaginale, care este un biomarker al starii de sanatate (*Palmeira-de-Oliveira R. et al, Advanced Drug Delivery Reviews 92, 2015:105-122*).

Dezechilibrarea florei microbiene vaginale determina înlocuirea biofilmului protector, cu lactobacilii benefici, cu biofilme formate din patogeni. Infecțiile rezultate, cu biofilme patogene dominate de bacterii anaerobe (vaginita bacteriana), bacterii aerobe (vaginita aeroba), ciuperci microscopice din genul *Candida* (vulvovaginita candidozica), sunt asociate cu probleme majore de sanatate - endometrioze, naștere prematura, avort spontan, boala inflamatorie pelviana, boli cu transmisie sexuala (*Rothman, K.J., et al., Epidemiology, 2003;14(3):340-348; Guerra, B., et al., European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology, 2006;128(1-2):40-45; Gallo, M.F., et al., Annals of Epidemiology, 2012;22(3):p.213-220*). Reducerea abundenței lactobacililor benefici favorizeaza infecțiile virale și cresc riscul de cancer (*Mitra, A., et al., Microbiome, 2016;4:15*).

Infecțiile vaginale sunt atat de raspandite incat ele reprezinta motivul cel mai frecvent pentru care femeile cer consultatiile medicale. O serie de statistici au estimat ca mai mult de 70% din femeile adulte au avut probleme vaginale și au utilizat produse vaginale pentru tratarea infectiilor. Studiile recente au demonstrat proprietatile antimicrobiene, antifungice și imunomodulatoare ale acidului lactic produs de lactobacili și au evaluat folosirea acidului lactic sau a lactobacililor probiotice in prevenirea sau tratarea vaginitelor bacteriene (*Tachedjian G. et al, Research in Microbiology, 2017:1-11*).

Intrucat microorganismele incluse in biofilme nu sunt eficient eliminate de sistemul imun si nici complet eradicate de antibiotice sau alte substante farmaceutice de sinteza precum antifungicele clotrimazol si metronidazol, infectiile vaginale asociate biofilmelor patogene sunt persistente și recurente (Cerca, N., et al., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005;56(2):331-336; Tobudic, S., et al., *Mycoses*, 2012. 55(3):199-204; Machado, D., et al., *Frontiers in Microbiology*, 2016;6:15-28).

In ultimii ani, exista un interes crescut privind dezvoltarea de noi produse alternative pentru combaterea a dezechilibrelor microflorei vaginale. Sunt cunoscute unele produse alternative care contin tulpini lactice probiotice (Liu, Y., et al., 2012, US 8329447 B2), dar acestea prezinta dezavantajul ca au o eficacitate limitata. In cazul prezentei in vaginul tratat a lactobacililor din aceeași specie, datorita concurenței intra-specifice și pot determina efecte negative, ca de ex. infectii ale tractului urinar (Czaja, C.A., et al., *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2007).

O alternativa la utilizarea de probiotice o reprezinta prebioticele de noua generatie cum sunt polifenolii din extractele vegetale, compuși care stimuleaza specific dezvoltarea populatiilor de probiotice prezente natural in microbiocenozele umane. In unele compozitii, prebioticele sunt singurele ingrediente active, in altele sunt asociate cu extracte vegetale estrogenice, care favorizeaza trofismul mucoasei vaginale (Bou, A.S., 2010, EP 2303300 B1) sau cu antibiotice triazolice anti-*Candida* (Dikovskiy, A.V., O.V. Dorozhko, and A.B. Rudoi, 2015, US 8980303 B2).

Sistemele de termogelificare au fost dezvoltate pentru imbunatatirea distributiei in administrarea vaginala, deoarece ele prezinta o difuzare/raspandire/imprastiere ca lichide la temperatura camerei si o tranzitie sol-gel la temperaturile fiziologice ale corpului. In plus, dupa gelifiere, aceste sisteme pot prezenta mucoadeziune și, astfel, imbunatatesc retentia in cavitatea vaginala. Temperatura de gelificare (T_{gel}) specifica fiecarui sistem de termogelificare este un parametru crucial pentru performantele lor, situandu-se in intervalul de 25-37°C. Proprietatile de termogelificare ale formulilor vaginale se bazeaza pe utilizarea unor polimeri specifici, dintre care poloxamerii au fost cei mai studiati. La temperatura fiziologica si in concentratii adecvate, solutiile de poloxamer sufera o schimbare in proprietatile miceliare, interactiile hidrofobe care au dus la o tranzitie reversibila sol-gel (Palmeira-de-Oliveira et al., 2015, *Advanced Drug Delivery Reviews* 92:105-122).

Se cunoaște rolul polimerilor mucoadezivi: poloxamer, chitosan, derivati de celuloza si combinatii ale acestora, in obtinerea diferitelor filme/suporturi solide pentru utilizarea in tratamentul infectiilor urogenitale, in special al infectiilor vaginale (US20170224749 A1/10.08.2017). Sunt disponibili poloxameri farmaceutici sub denumirea comerciala Lutrol® (Europa) si marca Pluronic® (BASF), Pluronic® F127 (poloxamer 407, P407) si Pluronic® F68 (poloxamer 188, P188) (SUA) (*Palmeira-de-Oliveira et al., 2015, Advanced Drug Delivery Reviews 92:105–122*).

Uleiurile esentiale au o capacitate semnificativa de a elimina biofilmele formate de microorganismele patogene din vagin (*Bogavac, M., et al., Journal of Applied Microbiology, 2015; 119(3):697-710*) și sunt considerate o componenta majora a noilor strategii de tratare locala a dezechilibrelor microflorei intestinale. Uleiurile esențiale **inhibă însă și dezvoltarea lactobacililor** (Dunn, L.L., et al. *Journal of Food Science*, 2016. **81**(2): p. M438-M444.). Pentru creșterea selectivității uleiurilor esențiale față de microflora vaginală benefică **sunt necesare noi soluții tehnice**, prin care să fie protejați lactobacilii de stresul exercitat de uleiurile esențiale, și prin care să se stimuleze suplimentar dezvoltarea lactobacililor.

Problema pe care o rezolva prezenta inventie consta in realizarea unei noi compozitii mucoadezive, în care sunt incluse uleiuri esentiale cu puternic efect antimicrobian (cimbru, arbore de ceai), prebiotice polifenolice de noua generatie (extracte concentrate de merisor, pelin, seminte de struguri) și compuși postbiotici (acid lactic, acid citric), destinate protejarii și stimulării populatiilor locale de lactobacili vaginali.

Compozitia mucoadeziva, conform inventiei, consta dintr-un gel adeziv obtinut din amestecarea a 50 - 80 parti in greutate solutie apoasa de compusi mucoadezivi, alesi dintre 20 - 60% poloxamer P407, 1-5% nanoceluloză bacteriană, 5-10% chitosan cu greutatea moleculara 190-375 kDa și grad de deacetilare de 80% sau 0,1-5% pulbere de cactus, *Opuntia ficus indica*; 2...6 parti in greutate uleiuri esentiale, alese dintre uleiul esential de cimbru si arbore de ceai; 5-10 parti in greutate oligozaharide prebiotice, alese intre inulina și fructo-oligozaharide; 4-10 parti in greutate extracte hidrogliceroalcoolice de concentratie 50%, cu un continut bogat in polifenoli prebiotici, alese intre merisor, pelin, seminte de struguri si 5-20 parti in greutate compusi post-biotici, alesi intre acid lactic si acid citric.

Prezenta inventie prezinta urmatoarele avantaje:

- compozitia este un gel adeziv, care raspunde la variatiile de temperatura, fiind gel consistent la temperatura camerei și devine un gel fluid la temperatura corpului;
- gelul prezinta rol multiplu: reducerea pierderii de uleiuri volatile în timpul pastrarii la temperatura camerei, ușurinta aplicarii gelului consistent, o mai buna mucoadezivitate și vâscozitate dupa aplicare;
- gelurile sunt biodegradabile, biocompatibile, stabile in timp si alcatuite din compusi naturali netoxici;
- componentele utilizate pentru formularea ca gel adeziv au și rolul a sustine reumectarea epitelilului vaginal;
- adaugarea de polifenoli anti-oxidanti asigura protectia atat a lactobacililor, cat și a celulelor epitelului vaginal, inclusiv prin stimularea trofismului de tip (fito)estrogenic;
- compusi post-biotici, acid lactic si acid citric, sustin nu numai dezvoltarea lactobacililor (inclusiv datorita scaderii pH-ului), dar au și un efect imunomodulator;
- compozitia prezinta efect antimicrobian fata de agentii patogeni prin uleiurile esentiale de cimbru și arbore de ceai;
- procedeul de obtinere este fezabil si nu necesita echipamente cu grad ridicat de complexitate.

Prezenta propunere de inventie se ilustreaza prin urmatoarele exemple:

Exemplul 1

Intr-un vas de sticla de 500ml s-a introdus o solutie de 80 ml nanoceluloza bacteriana de concentratie 0,4%..0,6%, preparata in prealabil, care s-a mentinut sub agitare pe o baie de apa la temperatura de 5°C, timp de 10..20 minute. In acelasi vas, s-au adaugat apoi 10.. 15 g poloxamer P407 si 1..3 g chitosan. Solutia s-a omogenizat timp de 2..3 ore, dupa care s-a adus la temperatura camerei. Dupa ce solutia a ajuns la temperatura de 20...24 °C, s-a adaugat 0.5..1 g de pulbere de cactus (*Opuntia ficus indica*). Dupa agitarea continua timp de 2..4 ore a acestui amestec de compusi mucoadezivi, s-a obtinut o solutie vascoasa, omogena, peste care s-au adaugat 3..6 g de inulina, compus prebiotic.

Separat, intr-un alt vas de sticla de 100ml, s-a preparat amestecul de uleiuri esentiale si extracte vegetale bogate in polifenoli prin inglobarea a 0,2...0,4 g solutie ulei esential de cimbru in 1..2 g de extract hidroglicerinic de seminte de struguri, cu concentratia de 50%, sub agitare, la temperatura camerei.

Amestecul astfel obtinut s-a adaugat sub agitare continua peste solutia de mucoadezivi, preparata mai sus. Compozitia obtinuta se prezinta sub forma unei solutii vascoase, cu pH intre 7 si 8. S-au adaugat apoi 1..1,2 g acid lactic si 0,3..0,6 g acid citric. Compozitia obtinuta dupa adaugarea acestor compusi post-biotici se prezinta sub forma de gel, cu pH variind intre 4...4,5.

Nanoceluloza bacteriana folosita este o nanoceluloza preparata din membrane de Kombucha (Dima, S. et al. *Polymers*, 2017 9(8), 374). Poloxamer 407 este un copolymer alcătuit dintr-un bloc central hidrofobic de polipropilen-glicol flancat de 3 locuri hidrofilice de polietilenglicol (PEG), comercializat sub denumirile comerciale de Pluronic F127 (BASF) sau Synperonic PE/F 127 (Croda). Chitosanul este un chitosan cu masa moleculara 190-375 kDa și grad de deacetilare de 80%. Pulberea de cactus folosita în extractul de mai sus este un extract uscat de ramuri aplatizate (cladode) de opuntie (*Opuntia ficus indica*), standardizat în polizaharide specifice – acizi hidroxi-uronici, galactan linear, xiloarabinoxilani înalt ramificati (Di Lorenzo, et al. *Carbohydrate polymers*, 2017, 157, 128-136). In cadrul acestui exemplu a fost folosit extractul standardizat Opunxia™ (Bionap, Belpasso, Italia). Orice alt extract standardizat de cladode de opuntie poate fi folosit. Inulina este extrasă din cicoare, cu cel puțin 30 de resturi de fructoză (Orafti™, Beneo, Tienen, Belgia).

Exemplul 2

Solutia de mucoadezivi s-a obtinut conform exemplului 1 folosind numai nanoceluloza bacteriana de concentratie 0,3%...0,5%, 10.. 15 g poloxamer P407 si 0,5..1 g de pulbere de cactus (*Opuntia ficus indica*). Dupa agitarea continua timp de 1...3 ore a acestui amestec de compusi mucoadezivi, s-a obtinut o solutie vascoasa, omogena, peste care s-au adaugat 2...4 g de inulina.

Intr-un alt vas de sticla de 100ml, s-a preparat amestecul de uleiuri esentiale si extracte vegetale bogate in polifenoli prin inglobarea a 0,2...0,4 g solutie ulei esential de merisor in 1..2 g de extract hidroglicerinic de arbore de ceai, cu concentratia de 50%, sub agitare, la temperatura camerei.

Amestecul de mai sus, obtinut la temperatura camerei, s-a adaugat sub agitare peste solutia de mucoadezivi, preparata mai sus. S-a obtinut o solutie vascoasa cu pH 7...7,8, peste care s-au adaugat compusii postbioticii (acid lactic si acid citric), in concentratiile si conditiile conform exemplului 1.

Ingredientele folosite sunt cele menționate în Exemplul 1.

Exemplul 3

S-a preparat solutia de compusi mucoadezivi prin amestecarea nanocelulozei bacteriene cu poloxamer P407 si chitosan in conditiile si concentratiile prezentate in exemplul 1. In acest amestec de compusi mucoadezivi, s-au adaugat 1..2 g de fructo-oligozaharide, sub agitare continua.

Amestecul de uleiuri esentiale si extracte vegetale bogate in polifenoli din ulei esential de merisor inglobat in extract hidroglicerinic de arbore de ceai, s-a obtinut in conditiile de lucru si concentratii similare exemplului 1. Acest amestec s-a adaugat peste solutia de compusi mucoadezivi, iar la final s-au adaugat compusii postbioticii (acid lactic si acid citric), in concentratiile prezentate la exemplul 1.

Ingredientele folosite sunt cele din Exemplul 1. In locul inulinei s-au folosit fructo-oligozaharide, obtinute prin hidroliza enzimatică a blândă a inulinei din cicoare (Orafti® Oligofructose, Beneo, Tienen, Belgia)

Compozitiile mucoadezive obtinute, conform exemplilor de mai sus, au fost testate din punct de vedere al efectului lor citotoxic asupra celule epiteliale (linie celulara stabilizata Hep2), folosind modele experimentale *in vitro*. In acest context, s-au investigat viabilitatea (coloratie Hoechst), proliferarea (testul MTT), aderarea si morfologia (coloratie Giemsa) celulelor epiteliale in prezenta compozitiei mucoadezive conform inventiei. Rezultatele obtinute au demonstrat ca toate compozitiile mucoadezive realizate conform exemplilor de mai sus sunt necitotoxice, favorizand viabilitatea, proliferarea si aderarea celulelor. De asemenea, morfologia celulelor se pastreaza normala caracteristica fenotipului celulelor Hep2.

In plus, s-a investigat efectul compozitiilor mucoadezive obtinute, conform exemplilor de mai sus, asupra culturilor de bacterii din grupul *Lactobacillus* si s-a determinat viabilitatea Lactobacililor, dupa 2h de incubare, in prezenta acestor geluri compozite. Datele obtinute prin microscopie de fluorescenta (Coloratie Hoechst) au aratat ca Lactobacilii testati au fost viabili, conditie necesara mentinerii echilibrului florei vaginale.

Revendicare

Compozitie mucoadeziva, conform inventiei, caracterizată prin aceea că se realizează ca un gel adeziv obținut din amestecarea a 50 - 80 parti in greutate solutie apoasa de compusi mucoadezivi, alesi dintre 20 - 60% poloxamer P407, 1-5% nanoceluloză bacteriană, 5-10% chitosan cu greutatea moleculara 190-375 kDa și grad de deacetilare de 80% sau 0,1-5% pulbere de cactus, *Opuntia ficus indica*; 2...6 parti in greutate uleiuri esentiale, alese dintre uleiul esential de cimbru si arbore de ceai; 5-10 parti in greutate oligozaharide prebiotice, alese intre inulina și fructo-oligozaharide; 4-10 parti in greutate extracte hidroglicerolcoolice de concentratie 50%, cu un continut bogat in polifenoli prebiotici, alese intre merisor, pelin, seminte de struguri si 5-20 parti in greutate compusi post-biotici, alesi intre acid lactic si acid citric.