(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional

(43) Data de Publicação Internacional
11 de Fevereiro de 2016 (11.02.2016)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicação Internacional
WO 2016/020861 A2

(51) Classificação Internacional de Patentes :
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 31/415* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61K 31/4174* (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01) *A61K 31/7056* (2006.01)
A61K 47/32 (2006.01) *A61K 31/722* (2006.01)
A61K 47/38 (2006.01) *A61K 31/733* (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01) *A61K 35/747* (2015.01)
A61K 9/12 (2006.01) *A61L 26/00* (2006.01)
A61K 9/70 (2006.01) *A61K 36/00* (2006.01)
A61K 31/375 (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/IB2015/055948

(22) Data do Depósito Internacional :
5 de Agosto de 2015 (05.08.2015)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
107834 5 de Agosto de 2014 (05.08.2014) PT

(72) Inventores; e
(71) Requerentes : **PALMEIRA DE OLIVEIRA, Ana Cristina** [PT/PT]; Quinta Do Brejo Painel 90 Caixa 118, P-6200-590 Peraboa (PT). **PALMEIRA DE OLIVEIRA, Rita Manuela** [PT/PT]; Rua Nossa Senhora Do Refúgio - 1ª Transversal, Lote 1, 3º Dto, Refúgio, P-6200 Covilhã (PT).

(74) Mandatário : **TEIXEIRA DE CARVALHO, Anabela**; Edifício Net, Rua de Salazares 842, P-4149-002 Porto (PT).

(81) Estados Designados *(sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados *(sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— *sem relatório de pesquisa internacional; será republicado após receção do mesmo (Regra 48.2(g))*

WO 2016/020861 A2

(54) **Title** : VAGINAL COMPOSITION FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF UROGENITAL INFECTIONS, METHOD FOR PRODUCING THE SAME AND USES THEREOF

(54) **Título** : COMPOSIÇÃO VAGINAL PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE INFEÇÕES UROGENITAIS, PROCESSOS DE OBTENÇÃO E SUAS APLICAÇÕES

(57) **Abstract** : The present solution relates to film or sponge compositions, and to a method for producing the same for the prevention and treatment of urogenital infections, in particular vaginal infections. A water-based composition for producing a film or sponge for use in the treatment of urogenital infections comprises: 0.4-25% (m/m) plasticiser, 0.4-20% (m/m) of at least one mucoadhesive polymer, at least one probiotic and/or prebiotic, at least one active compound in pharmacologically effective amounts. The compositions, films and sponges described in the present invention can be used in the medical field and in the pharmaceutical industry, in particular for the local treatment of urogenital diseases, in particular vaginal infections.

(57) **Resumo** : A presente solução diz respeito a composições para filmes ou esponjas, e método de preparação das mesmas, para prevenção e tratamento de infeções urogenitais, em particular infeções vaginais. Descreve-se uma composição de base aquosa para um filme/esponja para o uso no tratamento de infeções urogenitais que compreende: 0,4-25 % (m/m) de um plastificante, 0,4-20 % (m/m) de pelo menos um polímero muco adesivo, pelo menos um probiótico e/ou prebiótico, pelo menos um composto ativo em quantidades farmacologicamente eficazes. As composições/filmes/esponjas descritas na presente invenção podem ser usadas na área médica e na indústria farmacêutica, em particular no tratamento local de doenças urogenitais, em particular infeções vaginais.

DESCRIÇÃO

COMPOSIÇÃO VAGINAL PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE INFEÇÕES UROGENITAIS, PROCESSOS DE OBTENÇÃO E SUAS APLICAÇÕES

Domínio técnico

[0001] A presente solução diz respeito a composições para filmes ou esponjas, e método de preparação das mesmas, para prevenção e tratamento de infeções urogenitais, em particular infeções vaginais.

[0002] O uso das composições/filmes/esponjas descritas na presente invenção na área médica e indústria farmacêutica, em particular no tratamento local de doenças urogenitais, em particular infeções vaginais.

Estado da técnica

[0003] As infeções urogenitais (bacteriose vaginal, infeção do trato urinário e vaginite) atingem, em todo o mundo, mais de um bilião de mulheres por ano, constituindo o principal motivo de procura de consulta médica pelas mulheres. As três principais causas de patologias ao nível vaginal são a tricomoníase, a candidose vulvovaginal e a bacteriose vaginal.

[0004] A bacteriose vaginal (BV) atinge 10-15 % das mulheres em idade reprodutiva e estima-se que 50 % das mulheres sejam assintomáticas. A BV constitui uma condição complexa, que ocorre em função de uma mudança da flora normal dominante de *Lactobacillus* spp. para uma comunidade polimicrobiana de outros aeróbios e anaeróbios, nomeadamente *Prevotella* spp., *Mobilluncus* spp., *Gardenerella vaginalis* e *Mycoplasma hominis*. A diminuição do número

de *Lactobacillus* spp., microorganismos responsáveis pela produção de ácido láctico que confere pH ácido (3,5 - 4,5) ao meio vaginal, explica que, nesta afeção, normalmente o pH se encontre elevado. Uma situação de BV é, sintomatologicamente, caracterizada pelo excesso de fluido vaginal produzido, o aumento de pH e o odor desagradável estando, por isso, associada a elevado desconforto. A BV está normalmente associada à higiene vaginal e aos comportamentos sexuais, embora não seja considerada uma infeção de transmissão sexual. É muito comum que ocorra durante a gravidez e pode desencadear situações adversas tais como rotura prematura das membranas e baixo peso à nascença. Estima-se que mais de 30 % das mulheres tenham uma recorrência em 3 meses após o tratamento. O facto de esta infeção cursar com alteração da flora vaginal comensal tem sustentado o interesse da utilização de microorganismos protetores (probióticos) para recolonização vaginal no tratamento e prevenção da recorrência.

[0005] A utilização de probióticos vaginais (especialmente os pertencentes ao género *Lactobacillus*) tem sido estudada, também, noutras situações clínicas e fisiológicas como a recorrência da infeção do trato urinário e menopausa em que o desequilíbrio da flora comensal vaginal tem sido demonstrado. Esta abordagem terapêutica e profilática está fortemente associada ao efeito protetor local por exploração dos múltiplos mecanismos de ação associados aos microorganismos probióticos.

[0006] Destacam-se a competição direta em relação aos nutrientes e aos epítopos de adesão às células epiteliais, a produção de substâncias como peróxido de hidrogénio e bacteriocinas, altamente lesivas para os microorganismos patogénicos e ainda de ácidos orgânicos (láctico e fórmico) que mantêm o pH agreste ao desenvolvimento de bactérias patogénicas. Estas bactérias protetoras exibem, ainda, a capacidade de modular o sistema imunitário local. A combinação destes mecanismos de ação atribui aos probióticos um amplo espectro de atividade, quando comparados com as terapêuticas convencionais.

[0007] Segundo a Farmacopeia Portuguesa (FP 9.0) e a Farmacopeia Europeia 8.0, as preparações vaginais incluem as preparações líquidas, semi-sólidas ou sólidas destinadas a serem administradas por via vaginal, geralmente para uma ação local. Contêm uma ou mais substâncias ativas num excipiente apropriado. Distinguem-se várias categorias de preparações vaginais: óvulos; comprimidos vaginais; cápsulas vaginais; soluções, emulsões e suspensões

vaginais; comprimidos para soluções ou suspensões vaginais; preparações vaginais semi-sólidas; esponjas vaginais e tampões vaginais medicamentosos.

[0008] Na prática, as formas farmacêuticas mais frequentemente administradas por via vaginal são óvulos, comprimidos e pomadas. Empregam-se por esta via fármacos adstringentes, anti-infeciosos (antibacterianos, antiprotozoários, antifúngicos, antivirais), queratoplásticos, cicatrizantes, espermicidas, prostaglandinas e esteróides. Contudo, as preparações comerciais tradicionais, como os cremes, espumas, geles, irrigações e comprimidos, têm sido associadas a um reduzido tempo de retenção, devido ao mecanismo de autodepuração vaginal, o que se associa a desconforto e sensação de escorrência; são desconfortáveis de aplicar; muitas vezes requerem múltiplas administrações diárias para que se obtenha o efeito terapêutico desejado e não propiciam uma distribuição uniforme do fármaco. Estas características, regra geral implicam uma diminuição na aceitabilidade da mulher face a estas formas farmacêuticas que, por sua vez, conduz a uma menor eficácia do tratamento que também é condicionada pela dificuldade de aplicação do fármaco de forma uniforme na vagina. Num estudo recente promovido pelos autores desta patente, envolvendo 2500 mulheres, com o objetivo de avaliar as suas experiências prévias, preferências e perspetivas relativamente à utilização de produtos de aplicação vaginal, foi demonstrado que, embora a via vaginal seja considerada pelas mulheres como mais eficaz do que a via oral, a sua utilização pode ser limitada por questões essencialmente associadas ao conforto.

[0009] Com a evolução tecnológica e a necessidade de responder às exigências da terapêutica e de aumentar a aceitabilidade por parte das utilizadoras têm vindo a ser desenvolvidos outro tipo de dispositivos e formas farmacêuticas como é o caso dos anéis e dos filmes vaginais. Por outro lado, têm também sido desenvolvidos sistemas caracterizados por aumento de tempo de retenção no local de aplicação de modo a garantir a concentração terapêutica de fármaco após uma única administração. Estes sistemas baseiam-se na utilização de polímeros com capacidade bioadesiva.

[0010] A retenção, escorrimento, cinética da absorção e bioatividade das formulações vaginais dependem da sua interação com os fluidos vaginais residentes.

[0011] A forma farmacêutica filme vaginal consiste numa fina e pequena película, de substâncias poliméricas solúveis em água, que se dissolve ou dispersa em contacto com os fluidos vaginais para libertar a substância ativa que é veiculada. Os filmes vaginais são formas farmacêuticas convenientes, discretas, não necessitam de um aplicador para serem administrados e, como dispersam nos fluidos vaginais, têm baixo potencial para aumentar o seu volume e escorrer, o que favorece o conforto e eficácia da sua administração. Outras vantagens incluem a portabilidade e baixo custo por unidade. Por constituírem formas farmacêuticas sólidas, os filmes podem incorporar fármacos suscetíveis de degradação hidrolítica, garantindo-lhes uma maior estabilidade. Podem ainda ser formulados para libertação imediata ou controlada de fármacos.

[0012] Embora pouco explorados do ponto de vista comercial os filmes já são usados como formas farmacêuticas vaginais. Um exemplo atualmente comercializado nos Estados Unidos da América, é o Vaginal Contraceptive Film (VCF) que contém o agente espermicida Nonoxinol-9. O desenvolvimento e estudo de filmes vaginais tem sido essencialmente centrado no seu potencial para reduzir o risco de infeções sexualmente transmissíveis veiculando fármacos internacionalmente conhecidos como *microbicides* e, em menor escala, na veiculação de fármacos antifúngicos e antibacterianos, no contexto das infeções vaginais mais frequentes.

[0013] De uma forma geral, os filmes são obtidos por evaporação de solvente, em secagem de estufa o que permite a obtenção de estruturas extremamente finas.

[0014] Os aspetos mencionados anteriormente ilustram o problema técnico que é abordado pela presente solução.

Descrição Geral

[0015] As infeções urogenitais femininas caracterizam-se por elevada prevalência na população feminina e as formas farmacêuticas de aplicação vaginal atualmente disponíveis revelam várias desvantagens, nomeadamente:

- inconvenientes sob o ponto de vista das utilizadoras o que condiciona a adesão à terapêutica e
- limitações de eficácia em algumas situações clínicas.

[0016] A presente divulgação diz respeito a composições vaginais de base aquosa, sob a forma final de um filme ou esponja/espuma sólida - de espessura variável dependendo da composição e método de preparação, em particular um filme/esponja vaginal, e método de produção das mesmas, para tratamento e prevenção de infeções urogenitais, em particular infeções vaginais.

[0017] Genericamente a presente divulgação, como um todo, descreve composições para filmes ou esponjas para o tratamento de doenças urogenitais, com probióticos viáveis que favorecem não só a prevenção de infeções/tratamento de sintomas e o desenvolvimento de flora adequada. Esta solução permite assim o alívio de sintomas e a prevenção de visitas de rutina ao ginecologista, diminuindo ainda a irritabilidade da pele delicada um efeito secundário recorrente em composições semelhantes.

[0018] As composições que contêm probióticos para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação, podem incluir polímeros com capacidade bioadesiva (quitosano, hidroxiproprilmetilcelulose, hidroximetilcelulsoe, hidroexietilcelulose, carboximetilcelulose sódica) e macromoléculas (gelatina) selecionados pela sua elevada biocompatibilidade. Estas composições permitem que, nos casos em que ocorre dispersão por contacto com fluidos vaginais (filmes) sejam obtidos *in loco* geles com elevada capacidade de retenção no local de aplicação estando, deste modo, associados a maior eficácia terapêutica e maior aceitabilidade por parte das utilizadoras.

[0019] Até à data, não se conhece o desenvolvimento de uma formulação probiótica na forma de filme ou esponja vaginal. Esta forma farmacêutica é única pois, na prática, combina duas tecnologias apenas numa única formulação: forma sólida e gel (em que se converte após aplicação). Após hidratação, o gel recobre a superfície da mucosa vaginal. Por outro lado, esta forma farmacêutica apresenta elevada comodidade na aplicação, reduzido aumento de fluidos vaginais com baixo potencial de escorrência e, ainda permite veicular entidades químicas ou biológicas que se degradam facilmente em contacto com a água.

[0020] No presente documento um filme vaginal é entendido como uma forma farmacêutica de reduzida espessura que permite a dispersão ou dissolução em contacto com os fluidos vaginais para libertarem as substâncias veiculadas ou, simplesmente, se transformarem em gel e exercerem uma ação terapêutica ou preventiva.

[0021] No presente documento entende-se por probióticos microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro" (FAO/WHO, 2001).

[0022] No presente documento entende-se por pré-bióticos como ingredientes nutricionais não digeríveis que afetam beneficamente o hospedeiro estimulando seletivamente o crescimento e atividade de uma ou mais bactérias benéficas, melhorando a saúde do seu hospedeiro".

[0023] No presente documento entende-se por farmabiótico uma formulação de produto que contém, para além dos microorganismos protetores vivos, células mortas, metabolitos celulares ou outras moléculas como hormonas, que contribuem para a melhoria da saúde do hospedeiro.

[0024] No presente documento entende-se por composto ativo a substância que deverá exercer efeito farmacológico, isto é um agente terapêutico ou fármaco.

[0025] As composições de filmes vaginais incluídas na presente divulgação diferem das anteriormente publicadas e comercializadas pela sua composição e atividade e incluem a veiculação de microorganismos vivos com efeito probiótico ou de componentes que estimulam a proliferação da flora protetora promovendo a recolonização da flora vaginal. Esta aplicação assume inovação adicional visto não estarem descritos, até à data, filmes/esponjas probióticas para aplicação vaginal. Desta forma, as composições agora divulgadas destacam-se das já existentes pela sua composição e características tecnológicas. A presente divulgação diferencia-se pelas:

- dimensões preconizadas (destinadas a recobrir a superfície da vagina)
- tecnologia utilizada na sua preparação;

- combinação de excipientes (com propriedades protetoras da formulação e bioatividade);
- aplicabilidade a várias patologias vaginais e comportamento em contacto com os fluidos vaginais, isto é inloco.

[0026] Numa realização, a utilização de probióticos como estratégia de prevenção da recorrência de infeções e recolonização da flora vaginal em situações particulares tem sido perspetivada apenas pela administração de formas farmacêuticas clássicas, em particular cápsulas, comprimidos ou óvulos vaginais. Neste contexto, a presente solução representa o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas ou formulações de aplicação vaginal, para tratar ou prevenir infeções de forma eficaz desenhadas para ir de encontro às preferências das utilizadoras. Esta apresentação tem elevado potencial de eficácia, por recobrir adequadamente a superfície da vagina após dispersão, e de adesão terapêutica por não promover o aumento dos fluidos vaginais (associados a escorrência) e ter potencial bioadesivo.

[0027] Numa realização, o quitosano tem sido um excipiente largamente estudado pelo seu potencial antibacteriano e antifúngico e o seu interesse como excipiente no tratamento de infeções vaginais foi estudado pelos autores desta patente. A sua inclusão nas composições de filmes da presente divulgação, aquando da dispersão promovida pelos fluidos vaginais presentes, potencia a sua ação antimicrobiana promover o tratamento da infeção com alto nível e conforto. A utilização adicional de ácido láctico (ácido fisiológico vaginal) integrado, ou não, numa solução tampão compatível com o ambiente fisiológico normal tem por objetivo corrigir e ajudar a manter o pH vaginal normal, para melhorar a eficácia do tratamento e prevenir a recorrência das infeções por promover a recolonização da vagina pela flora protetora.

[0028] A presente divulgação destaca-se das folhas vaginais, descritas no estado da arte, por compreender uma espessura variável consoante o método de secagem empregue (variando de 0.1 mm a 1-2 mm, consoante é seca em estufa ou liofilizada) e por dispersar rapidamente em contacto com fluidos vaginais, libertando as substâncias veiculadas, enquanto na folha vaginal o objetivo é que fique retida na cavidade vaginal exercendo a sua ação de absorção e podendo ser removida ou naturalmente expelida.

[0029] Adicionalmente a presente divulgação destaca-se dos produtos atualmente conhecidos pela sua composição e atividade *in vitro* demonstrada, incluindo a veiculação de probióticos que, até à data, não havia sido publicada.

[0030] Um aspeto da presente invenção refere-se a uma composição de base aquosa para um filme ou esponja para o uso no tratamento de infeções urogenitais que compreende:

0,4-25 % (m/m) de um plastificante,
0,4-20 % (m/m) de pelo menos um polímero muco adesivo,
pelo menos um probiótico e/ou prebiótico,
pelo menos um composto ativo em quantidades farmacologicamente eficazes.

[0031] O aspeto final das composições depende maioritariamente do método de secagem: a evaporação de solvente por secagem pelo calor origina composições muito finas e maleáveis de aspeto semelhante a um filme enquanto que a liofilização das mesmas composições origina composições de aspeto opaco cuja estrutura polimérica se mantém inalterada (a espessura da formulação é a mesma da composição de base aquosa que lhe serviu de base). Em ambos os casos as composições são sólidas, suaves e maleáveis, fáceis de aplicar sem a utilização de um aplicador e com capacidade de dispersar em contacto com os fluidos vaginais.

[0032] Numa realização, as composições que contêm probióticos para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação pode compreender:

0,5-10% (m/m) de um plastificante,
0,5-5% (m/m) de, pelo menos um polímero muco adesivo;
0,25 – 10% (m/m) pelo menos um probiótico, de preferência 1-2,5% (m/m)
0,25-15 % (m/m) de um composto ativo, de preferência 0,5-3 % (m/m).

[0033] Numa realização, as composições que contêm probióticos para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação podem compreender 10^5 - 10^{12} UFC/ml de uma cultura de probióticos.

[0034] Numa realização, os probióticos das composições para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação podem ser, entre outros, são bactérias produtoras

de ácido láctico, em particular Lactobacillus spp. De preferência a espécie de Lactobacillus pode ser selecionada de uma lista constituída por: Lactobacillus iners, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus delbruekii, Lactobacillus jensenii ou suas misturas, entre outros.

[0035] Numa realização, o composto ativo, das composições que contêm probióticos para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação, pode ser selecionado de uma lista que consiste: metronidazol, clindamicina, clotrimazol, quitosano, oligoquitosanos ou suas combinações, entre outros.

[0036] Numa realização, as composições que contêm probióticos para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação, podem ainda compreender um agente pré-bióticos, surfactante, corante, vitamina, antioxidante, hormonas, e/ou um agente crioprotetor, entre outros aditivos.

[0037] Numa realização, o pré-bióticos, das composições que contêm probióticos para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação, pode ser selecionado de uma lista constituída por: inulina, lactose, ácido ascórbico, leite em pó, fruto-oligossacáridos, glucose, ácido láctico, lactato de sódio, ou suas combinações, entre outros.

[0038] Numa realização, o agente crioprotetor, das composições que contêm probióticos para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação, pode ser selecionado de uma lista constituída por: trealose, glicerol, lactose, glucose ou suas combinações, entre outros.

[0039] Numa realização, o polímero muco adesivo, das composições que contêm probióticos para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação, pode ser selecionado de uma lista constituída por: gelatina, álcool polivinílico, carbómeros, quitosano, policarbófilos, derivados da celulose ou suas combinações, entre outros. Nestas composições o quitosano pode ser evitado de forme a prevenir a morte prematura dos microorganismos.

[0040] Numa realização, os derivados de celulose, das composições que contêm probióticos para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação, pode ser selecionado hidroxipropilmetilcelulose, hidroxietilcelulose, carboximetilcelulose sódica,

hidroximetilcelulose, etilcelulose, extractos de tomilho, extractos de Helichrysum spp., extractos de Echinacea spp., extractos de Satureja spp., extratos de cravinho ou suas combinações.

[0041] Numa realização, o quitosano utilizado pode ter pesos moleculares entre 10-350 kDa; de preferência 10-150 kDa ou 310-350 kDa.

[0042] Numa realização, as composições que contêm probióticos para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação podem compreender: 0,4-5% (m/m) de derivados de celulose e, 0.1-2% (m/m) de ácido láctico, ou lactato de sódio, ou suas misturas.

[0043] Numa realização, os derivados de celulose, das composições que contêm probióticos para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação pode ser um poliol, de preferência selecionado de uma lista constituída por: propano-1,2 diol, propano-1,2,3 triol, glicerol, polietilenoglicol, ou suas combinações.

[0044] Outro aspeto da presente invenção é o uso composições que contêm probióticos para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação na prevenção e/ou tratamento infeções vaginais, em particular causadas por Gardnerella vaginalis, Prevotella spp., Mobilluncus spp., Mycoplasma hominis, Candida spp., ou Trichomonas vaginalis.

[0045] Outro aspeto da presente invenção diz respeito a um filme obtenível pela desidrataçao da composição que contêm probióticos e /ou prebióticos para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação através da evaporação de solvente em particular, pelo calor (exemplo: 45ºC em estufa durante 18h-24h) obtendo-se uma preparação muito fina com aspeto transparentes ou apenas ligeiramente opaca, típico de filme, muito suave e maleável.

[0046] Numa realização o filme para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação pode apresentar uma espessura entre 0,09 - 3 mm, de preferência 0,25 - 2 mm.

[0047] Numa realização o filme para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação pode apresentar uma forma substancialmente retangular com um comprimento entre 5-10 cm e de 2-4 cm de lado.

[0048] Outro aspeto da presente invenção diz respeito a uma preparação polimérica, opaca e branca como uma espuma sólida e com semelhanças organoléticas a uma esponja mas com aspeto compacto e capacidade de dispersão obtenível pela liofilização da que contêm probióticos para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação. Nestes casos a preparação é congelada (a -20ºC ou -80ºC), a composição de base aquosa é colocada em moldes adequados e a remoção da água é efetuada com recurso a um liofilizador (condições exemplificativas: temperatura mínima alcançada: -110ºC, pressão 0.019hPa; tempo 24h). A preparação obtida retém a espessura inicial e adquire um aspeto branco, opaco, apresentando capacidade de dispersão superior à dos filmes, quando em contacto com fluidos vaginais.

[0049] Numa realização a esponja para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação pode apresentar uma espessura de 2 mm (1-3mm), obtida pela utilização proporcional de 2.72g de composição de base aquosa para moldes circulares de 3.5 cm de diâmetro.

[0050] Numa forma de realização, as composições de filmes vaginais agora divulgados podem incluir quitosano que apresentam atividade antibacteriana e antifúngica podendo ser utilizadas para tratar infeções.

[0051] Numa forma de realização, as composições obtidas correspondem a filmes vaginais, em particular filmes transparentes/ligeiramente opacos e muito finos (espessura aproximada 0.1 mm) ou opacos e de espessura aproximada de 1-3 mm. permitem a veiculação de probióticos, preferencialmente *Lactobacillus* spp., destinados a recolonizar a vagina, numa estratégia de reequilíbrio da flora vaginal que contribuiu para a prevenção de infeções. Nestas composições o quitosano pode ser evitado de forme a prevenir a morte prematura dos microorganismos.

Breve descrição das figuras

[0052] Para uma mais fácil compreensão da solução juntam-se em anexo as figuras, as quais, representam realizações preferenciais do invento que, contudo, não pretendem limitar o objeto do presente pedido.

[0053] **Figura 1:** Representação gráfica da medição da resiliência, em que (1) indica a área 1 e (2) indica a área 2. O valor de resiliência foi calculado pela razão entre a área 2 e a área 1, em percentagem.

[0054] **Figura 2:** Representação gráfica da viabilidade de *L. acidophillus* numa formulação (exemplificativa) de filme (F6) imediatamente após secagem por *freeze-drying* (tempo 0) e após pelo menos 3 meses de armazenamento no frio (2-8 °C) (tempo 1). O tempo -1 corresponde à contagem inicial de microorganismos incorporado na formulação (contagem por filme).

[0055] **Figura 3:** Representação gráfica da citotoxicidade de formulações exemplificativas de filmes contendo *L. acidophillus* (F6) e contendo quitosano (F11 = QHM 1.1) destinados à prevenção e tratamento de infeções vaginais, respetivamente. Os resultados foram obtidos pelo teste do MTT utilizando PBS (Phosphate Buffer Saline) como controlo negativo (viabilidade 100 %) e o SDS (Sodium dissulfate 5 %) como controlo positivo. O tecido utilizado corresponde a um modelo comercial de irritação vaginal aguda (Reconstructed human vaginal epithelium HVE – Skin Ethic®) com incubação de 12h das formulações (17 mg de filme adicionados de 17 µL de PBS para promover a dispersão).

[0056] **Figura 4:** Representação gráfica representativa da libertação rápida de microorganismos probióticos, a partir da formulação liofilizada quando dispersa em pequeno volume (5mL) de solução salina.

[0057] **Figura 5:** Representação gráfica e representativa da manutenção da capacidade de produção de L-lactate por *L.acidophilus* após formulação e armazenamento dos filmes, em condições de refrigeração (suspensão celular= controlo (cellular suspension), após formulação = t0, após armazenamento dos filmes (2-8ºC) por 3 meses (3m) e 6 meses (6m). Os resultados são expressos em mg/mL de L-Lactato produzidos por 10^7 CFU, após 20h de incubação das dispersões obtidas a partir dos filmes.

Descrição Detalhada

[0058] A presente divulgação diz respeito a composições com probióticos e/ou prebióticos para o uso no tratamento e prevenção de infeções vaginais, em forma de filme ou /esponjas. A tecnologia associada à preparação das composições aqui escritas permite a obtenção de formulações de filmes/esponjas vaginais com composições para o tratamento ou prevenção destas infeções, incluindo a veiculação de microorganismos vivos com atividade probiótica. A incorporação de microorganismos probióticos em filmes vaginais de base polimérica e natural permite a manutenção da sua viabilidade e propriedades probióticas e a rápida dispersão após aplicação sem gerar fluidos adicionais que estão associados a escorrência e desconforto das utilizadoras.

[0059] A presente divulgação diz respeito a composições vaginais de base aquosa, sob a forma final de um filme ou esponja/espuma sólida - de espessura variável dependendo da composição e método de preparação, em particular um filme vaginal, e método de produção das mesmas, para tratamento e prevenção de infeções urogenitais, em particular infeções vaginais.

[0060] Um aspeto da presente invenção refere-se a uma composição de base aquosa para um filme ou esponja/espuma sólida para o uso no tratamento de infeções urogenitais que compreende:

0,4-25 % (m/m) de um plastificante,
0,4-20 % (m/m) de pelo menos um polímero muco adesivo,
pelo menos um probiótico e/ou prebiótico,
pelo menos um composto ativo em quantidades farmacologicamente eficazes.

[0061] O uso das composições/filmes/esponjas descritas na presente invenção na área médica e indústria farmacêutica, em particular no tratamento de doenças urogenitais in loco, em particular infeções vaginais.

[0062] Numa realização, os filmes vaginais desenvolvidos são finos, muito maleáveis, facilmente colocados no topo de um dedo e introduzidos na vagina. Dependendo do seu método de obtenção estes filmes podem ser transparentes, com espessura inferior a 1mm (se secos em estufa) ou formulações brancas opacas (com aspeto próximo de uma esponja/esferovite) de consistência macia e maleáveis, dobrando-se facilmente para serem aplicados como descrito e dispersando rapidamente quando em contacto com os fluidos vaginais.

[0063] Numa realização, a forma, tamanho e modo de aplicação dos filmes vaginais conduzem a uma ajustada cobertura da cavidade vaginal visto que, por utilização de moldes adequados ou por ajuste da dimensão (corte) após secagem é possível obter produtos adaptados à cavidade vaginal, por exemplo, retângulos com dimensão 7x2,4 cm (comprimento por lado).

[0064] Numa realização, os filmes que contêm probióticos descritas na presente divulgação permitem uma rápida dispersão nos fluidos vaginais originando um gel que, dada a sua composição em polímeros bioadesivos, aumenta o tempo de permanência da formulação no local de aplicação e evita o desconforto associado à escorrência do produto. Numa realização, as composições desenvolvidas sem quitosano permitem a melhor veiculação de microorganismos vivos como os *Lactobacillus* spp. na forma final liofilizada. As formulações/composições contendo quitosano apresentam atividade antimicrobiana inerente podendo, adicionalmente, veicular fármacos químicos para o tratamento ou prevenção de diferentes afeções vaginais. Os fármacos/compostos que podem ser veiculados pelo filme vaginal são por exemplo o metronidazol, clindamicina, extractos de plantas como tomilho, *Helichrysum spp.*, *Echinacea spp.*, *Satureja* spp., entre outros ou suas combinações.

[0065] Numa realização, as composições/filmes que contêm probióticos para o tratamento de doenças urogenitais descritas na presente divulgação podem compreender a misturas dos seguintes excipientes, em particular:

polímeros e macromoléculas com potencial mucoadesivo, como por exemplo a gelatina, cuja utilização na vagina é considerada segura;
quitosanos de peso moleculares entre 10-350 KDa, assim como oligoquitosanos cujo peso molecular é inferior a 10 KDa;

álcool polivinílico;

poliois (plastificantes/humectantes) preferencialmente a glicerina, por ter demonstrado superior segurança na utilização vaginal sendo, também possível, a utilização de propilenoglicol e/ou polietilenoglicois

microorganismos probióticos como Lactobacillus spp.

prebióticos e/ou crioprotetores como ácido ascórbico, leite em pó, trealose, lactose, glucose, frutooligossacáridos (FOS), inulina, amido.ácido láctico;

lactato de sódio; bacteriocinas;

água.

[0066] Numa realização, as composições que contêm probióticos descritas na presente divulgação podem ser obtidas de acordo com os seguintes passos:

1. Pesar os constituintes a incorporar em cada formulação;
2. Ligar o banho termostatizado ou agitador orbital a 45-50 °C;
3. Dispersar os polímeros (quitosano, derivados da celulose) na base aquosa (que pode ou não conter ácido láctico e lactato de sódio ou outro ácido como o ácido acético) por agitação mecânica (agitador em hélice);
4. Adicionar a gelatina e dissolver em agitador orbital com agitação;
5. Adicionar o plastificante e agitar;
6. Verter o gel formado para caixas de Petri de plástico ou moldes (previamente padronizadas no que respeita à quantidade de gel a veicular: por exemplo, 18 g para os filmes em placas de Petri de 90 mm de diâmetro ou 2.72 g para placas de petri de menor dimensão – 3,5 cm de diâmetro); Para as formulações contendo probióticos a mistura com os microorganismos é realizada à temperatura ambiente;
8. Congelar a -80 °C *over night* (para obtenção de filmes de maior espessura -esponjas);
9. Liofilizar através da técnica de freeze-drying durante 24 h, a temperatura atingida é de -118 °C

ou

10. Secar em estufa a 45 °C, durante 18-24 h (filmes).

[0067] Numa realização, das composições que contêm probióticos descritas na presente divulgação não contêm gelatina não necessita de aquecimento. A dissolução é realizada por um agitador em hélice.

[0068] Numa realização, das composições que contêm probióticos descritas na presente divulgação podem ser preparadas em moldes ou placas de Petri de 90 mm de diâmetro podem posteriormente ser cortadas em dimensão adequada à aplicação vaginal (a dimensão proposta é de 7 × 2,4 cm para recobrir toda a cavidade vaginal). Alternativamente podem ser usados moldes com a dimensão final dos filmes a usar.

[0069] Numa realização, o acondicionamento das composições/filmes/esponjas que contêm probióticos descritas na presente divulgação, deve garantir o contacto com baixos teores de humidade durante o armazenamento.

[0070] Numa realização, a preparação das composições que contêm probióticos descritas na presente divulgação, em particular *Lactobacillus* spp. exige a preparação prévia dos microorganismos em suspensão celular e mistura com excipientes prébióticos e crioprotetores, de modo a serem incluídos no gel de base polimérica antes das etapas de congelação e secagem. Os excipientes prébióticos podem ser selecionados da seguinte lista: lactose, leite em pó, ácido ascórbico, ácido láctico, lactato de sódio, inulina, frutooligossacáridos, glucose, trealose, entre outros e suas combinações.

[0071] Numa realização, a caracterização organolética das formulações pode realizar-se de acordo com os seguintes parâmetros: o aspeto, cor, opacidade e homogeneidade; odor; suavidade ao toque e maleabilidade. A maleabilidade engloba a facilidade de enrolamento e posterior capacidade do filme em voltar à sua forma inicial (o que pode ser importante para garantir que recobre as paredes da cavidade vaginal) ou a facilidade de dobrar o filme vaginal/esponja para a sua aplicação.

[0072] Numa realização, os filmes vaginais obtidos por desidratação/secagem das composições descritas na presente divulgação são macios ao toque e facilmente manipuláveis, são transparentes se forem secos em estufa ou brancos e opacos, com aspeto polimérico, se forem liofilizados por *freeze-drying*.

[0073] Numa realização, as formulações dos filmes vaginais descritas na presente divulgação podem ser, avaliadas no que respeita aos seguintes parâmetros tecnológicos: parâmetros texturométricos, espessura, pH da dispersão da formulação em soro fisiológico e em simulante do fluido vaginal. Os parâmetros texturométricos avaliam a dureza e a resiliência dos filmes vaginais, conforme se pode verificar pelas figura 1 . A dureza dos filmes vaginais foi determinada pela força máxima (Fmáx) que a sonda do texturómetro (Ta XT Plus) (2 mm de diâmetro e fundo em agulha) exerceu sobre uma amostra nas condições preconizadas. Ou seja, quanto maior a dureza das formulações, maior a Fmáx. A resiliência de todas as formulações foi determinada utilizando uma sonda de 2 mm e fundo plano que empurra a amostra através de uma plataforma com abertura central (velocidade pré-teste: 1 mm/seg; velocidade teste: 0,5 mm/seg). Após o contacto inicial a sonda desloca-se 2 mm e volta depois à sua posição inicial (velocidade pós-teste 0.5 mm/seg). O filme recupera da deformação à medida que a sonda se eleva, sendo que a retração do filme exerce uma força ascendente sobre a sonda causando uma diminuição da força da sonda. A resiliência das formulações foi determinada, por cálculo, como a razão entre as áreas gráficas obtidas no período ascendente e descendente da sonda.

[0074] Numa realização, para os filmes vaginais verifica-se que as formulações mais duras (identificadas mesmo na análise organolética) correspondiam às de menor resiliência e sofreram, em alguns casos rutura durante o teste. Pretende-se que estas formulações apresentem maleabilidade suficiente para serem introduzidas na vagina sem quebrar após manipulação.

[0075] Numa realização, a espessura das formulações de filmes vaginais foi medida com recurso a réguas de medição e a um micrómetro digital (para os filmes de espessura inferior a 1 mm obtidos por secagem em estufa). As formulações obtidas por *freeze-drying* apresentam espessura entre 1 e 2 mm, muito maleáveis com estrutura pouco compacta. As formulações de filmes vaginais secas em estufa apresentam espessura variável entre 90 µm (para a amostra F7 cuja composição de base é Gelatina 2.5%, glicerina 0.8% e água/tampão lactato 96.7% e 200-250 µm para F6 (HPMC 1%, gelatina 2.5%, glicerina 2.5%, água/tampão lactato 94%) e QHM 1.1 (HPMC 2.5%, quitosano 1%, glicerina 2.5% ou glicerina 0.8 e água/tampão lactato q.b.p 100)

[0076] Numa realização, o pH da dispersão da formulação foi estudado em soro fisiológico e num simulante do fluido vaginal (pH 4,2 ajustado com HCl 1M) com a seguinte composição:

1,76 g NaCl; 0,70 g KOH;0,111 g $Ca(OH)_2$; 0,009 g albumina sérica bovina; 1,00 g ácido láctico; 0,50 g ácido acético; 0,08 g glicerol; 0,2 g ureia; 5,0 g glucose; Água q.b.p. 500 mL.

[0077] Numa realização, a avaliação do pH e capacidade tampão das formulações vaginais assume particular importância visto que infeções vaginais bacterianas são caracterizadas por causar alterações no pH vaginal. Deste modo é importante conhecer o pH final das formulações e sua capacidade para o manter (capacidade tampão) com o intuito de o ajustar, desfavorecendo o crescimento microbiano patológico e favorecendo o crescimento da flora vaginal normal.

[0078] Numa realização, a avaliação da capacidade tampão baseou-se no descrito para geles de aplicação vaginal e foi realizada do seguinte modo:

- Dissolveu-se a formulação, a 37 °C, numa proporção peso do filme: dissolvente de 1:20;
- Realizou-se a dissolução em NaCl 0,9 %, SFV pH=4 e SFV pH=5;
- Mediu-se o pH inicial da dissolução;
- Adicionaram-se 20 µL de NaOH 1N à solução, medindo o pH obtido;
- Repetiu-se o procedimento anterior mais 2 vezes ou até o pH ser igual ou superior a 7;
- Realizaram-se os respetivos ensaios controlo para NaCl 0,9 %, SFV pH=4 e SFV pH=5, sem adição de formulações.

[0079] Numa realização, para os filmes, uma vez que dispersam completamente em contacto com os fluidos vaginais, o pH foi também medido após dispersão de uma formulação em 3 ml de NaCl 0,9 % e de SFV pH=4,2.

[0080] Tabela I - exemplificativa as composições de filme vaginais para prevenção por inclusão de probióticos (sem quitosano como agente ativo) e sua comparação tecnológica com a formulação basepH da sua dispersão em soro fisiológico (SF) e simulante do fluido vaginal (SFV)

	Composição em g (+ água q.b.p. 100g)	Tamanho (cm)	Massa (g)	Dureza (Fmáx)	Resiliência (%)	Contacto SFV (%) pH=4	Contacto SFV (%) pH=5	pH (em NaCl)
QHM 1.1 (filme)	2,5% HPMC; 1% Quitosano; 2,5% Glic.; ácido lactico 2%	7x2,4	0,420					4,23
F6	1% HPMC; 2,5% gel.; 2,5% glic.	7x2,4 ou área de placa de petri pequena	0,298					5.1
F7	2,5% gel.; 2,5% glic.		0,140					5.1

[0081] Tabela II - representa o pH inicial das folhas e filmes vaginais nos ensaios a NaCl 0,9 %, SFV pH=4 e SFV pH=5

	Controlo	QHM 1.1	F6	F7
NaCl 0,9%	8,40	4,23	5.1	5.1
SFV pH=4	4,02	3,97	3.8	4.1
SFV pH=5	5,38	---	--	--

[0082] A tabela mostra a composição F6/G6 liofilizada e as suas características tecnológicas. A dispersão deste filme em simulante do fluido vaginal tem pH 4.5 +/- 1 mostrando que a preparação não altera o pH normal dos fluidos vaginais. Em soro fisiológico adquire pH de 5.1 +/1.

[0083] A formulação QHM 1.1 (G11) permite corrigir o pH e mante-lo em valores fisiológicos por ter elevada capacidade tampão.

[0084] Tabela III - representa a atividade anti-*Gardnerella* spp. de filmes contendo quitosano (QHM 1.1: 2,5 % HPMC; 1 % Quitosano peso molecular médio; 2,5 % glicerina; ácido láctico 2 % (v/v) q.b.p. 100; e QHM 0.8: 2,5 % HPMC; 1 % Quitosano peso molecular médio; 0,8 % glicerina; ácido láctico 2 % (v/v) q.b.p. 100. Os filmes (cortados à dimensão de 7×2,4 cm) foram dispersos em 3 mL de água ou simulante do fluido vaginal (SFV) e testados pelo micrométodo, em estirpes clínicas, em duas concentrações sequenciais

	G. vaginalis G71		*G. vaginalis* G19	
	1:2	1:4	1:2	1:4
QHM 1.1 em 3 mL H2O	-	-	-	-
QHM 0.8 em 3 mL H2O	-	-	-	-
QHM 1.1 em 3 mL SFV pH 6	-	-	-	-
QHM 0.8 em 3 mL SFV pH 6	-	-	-	-
SFV pH 6	+	+	+	+
Ácido láctico	-	-	-	-

[0085] Observou-se em alguns casos que filmes contendo quitosano inibem o crescimento de todas as estirpes testadas devido à sua atividade intrínseca e ao efeito adicional do ácido láctico. Não ocorre, por isso crescimento dos microorganismos testados nos poços onde é adicionado filme previamente disperso em água ou em SFV (mesmo que este simulante tenha pH alterado).

[0086] Tabela IV – representa as características gerais de um filme vaginal de *L. acidophilus*, comparados com uma solução sem prebióticos e/ou probióticos (Blank)

	N. de filmes testados	G6LB3	G6 Blank	VCF®
Peso (g)	9	0.224±0.01	0.194±0.006	0.232
Perda de peso (%)	6	93.22±0.15	93.50±0.20	N.D.
Espessura (mm)	6	1.636±0.6	1.917±0.3	0.275±0.01
Osmolaridade (mOsm/Kg)	3	306±0.6	296±5.8	N.D.
Resistência à rutura - Burst strength (g/mm)	3	327±51	162±25	8173±589
Distância de rutura – Distance at burst (mm)	3	3.58±0.28	3.35±0.15	6.78±0.75
Resiliência (%)	3	24.6±1.56	22.13±1.45	39.9±1.67
Força à distância alvo - Force at target distance (N)	3	1.76±0.18	1.39±0.21	4.41±0.42

G6LB – filme vaginal de *L. acidophilus,* G6 Blank – filme vaginal de contendo apenas o gel sem prebióticos e/ou probióticos N.D. – não determinado. Os resultados representam o valor médio ± desvio padrão (SD) das determinações a partir de diferentes filmes testados (n representa o número de filmes testados e não o número total de determinações).

[0087] A tabela acima mostra que as características tecnológicas gerais da formulação de base são mantidas pela adição de probióticos e prebióticos embora ocorra um ligeiro aumento de massa.

[0088] Numa realização, o pH das formulações dispersas em SFV a pH=4 e pH=5 é acidificado em comparação com NaCl 0,9 % demonstrando que as dispersões adquirem pHs próximos dos fluidos em que se dispersam (Tabela II).

[0089] Numa realização, os filmes vaginais de quitosano que contêm ácido láctico na sua composição apresentam pHs mais baixos após dispersão em SF e SFV. A utilização de um tampão lactato ou de ácido láctico de pH ajustado redefine o pH da dispersão para valores dentro da gama fisiológica.

[0090] Numa realização, a viabilidade de *L. acidophilus* em formulações de filme de base de gelatina (F6) foi avaliada após preparação por *freeze-drying* e ao longo do tempo. Os microorganismos foram cultivados em MRS e utilizados na fase estacionária. A cultura foi

centrifugada e uma suspensão celular foi preparada em PBS em concentração próxima de $5x10^7$ UFC/ml (contagem em placa de MRS). Para cada filme 1 mL de suspensão foi centrifugado e ressuspenso em 1 mL de mistura prebiótica otimizada (contendo leite em pó, lactose e trealose) e misturada com 2,72 g de gel de formulação F6 e F7. Após congelação a -80 °C procedeu-se a liofilização, em particular por *freeze-drying,* durante 24h.Os filmes obtidos foram dispersos em 5 mL de PBS e realizada a contagem de microorganismos em placa imediatamente após liofilização e até 6 meses após armazenamento no frigorífico (2-8 °C). A perda de viabilidade no processo de secagem foi de cerca de 0,9 log para a formulação F6 e de 3,2 para a formulação F7. A formulação F6 revelou reduzida perda de viabilidade dos microorganismos após armazenamento de 6 meses no frigorífico. A Figura 2 mostra a reduzida perda de viabilidade observada ao longo de 6 meses de armazenamento, em condições de refrigeração, para 3 lotes independentes de formulação F6 (tempo 0 representa a secagem por *freeze-drying* e -1 representa a contagem da suspensão inicial). Adicionalmente, demonstrou-se que os microorganismos formulados nestas composições mantêm, mesmo após armazenamento, as características bioquímicas que lhes conferem propriedades probióticas, nomeadamente a produção de ácido láctico (Figura 5). Esta questão é especialmente relevante visto que a eficácia do tratamento depende da manutenção destas propriedades. Estudos prévios têm demonstrado que a formulação de microorganismos pode condicionar a manutenção destas características.

[0091] A figura 3 mostra a baixa citotoxcidade das formulações contendo probióticos quando comparada com o controlo de PBS. Para a formulação de quitosano a toxicidade é maior como expectável.

[0092] Numa realização, a atividade antibacteriana de filmes de quitosano foi testada em duas estirpes clínicas de *Gardnerella vaginalis*, o agente bacteriano mais frequentemente associado à bacteriose vaginal. A título de exemplo apresentam-se resultados de filmes de QHM 1.1 e QHM 0.8 dispersos em 3 mL de água ou 3 mL de SFV acertado a pH 6 (pH associado a bacteriose vaginal) e a dispersão foi diluída a metade, em meio de cultura, em duas diluições sucessivas. A atividade antibacteriana foi testada pelo micrométodo de acordo com a norma CSLI M45. Foram realizados controlos de SFV e ácido láctico utilizado na preparação das formulações, bem como controlos de crescimento das estirpes e de esterilidade do meio utilizado. Todos os testes foram realizados em duplicado. As placas foram lidas para presença

ou ausência de crescimento bacteriano após 48 h de crescimento a 37 °C. A Tabela 3 representa os resultados obtidos indicando a elevada atividade do filme visto que não ocorre crescimento de bactérias na diluição de 1:4 (2ª diluição sucessiva) da dispersão do filme em 3 mL de água e de SFV.A citotoxicidade de formulações de filme com *L. acidophilus* (F6) e com quitosano (QHM 1.1) foi avaliada num modelo comercial de irritação vaginal aguda (Reconstructed human vaginal epithelium HVE – Skin Ethic®) correspondendo a tecido epitelial pluri-estratificado com histologia semelhante ao epitélio vaginal humano normal). O teste foi realizado após incubação dos poços contendo o tecido com meio de manutenção (comercial), a 37 °C em atmosfera de 5 % CO_2 de acordo com as recomendações da marca. Findo o período de incubação 17 mg de filme foram colocados sobre o tecido em cada poço e adicionados de 17 μL de PBS para permitir a dispersão. A incubação decorreu durante 12 h findas as quais se determinou a viabilidade celular pelo teste do MTT (n=2 poços) e se procedeu a análise histológica. Os resultados de viabilidade celular apresentados na Figura 3 mostram que, para a formulação de lactobacilos a viabilidade é da ordem dos 82 % indicando a sua baixa toxicidade e compatibilidade com o tecido que é exigida para uma formulação destinada a ser utilizada em recolonização da vagina numa estratégia preventiva. Para a formulação QHM 1.1, pelo contrário, verificou-se que, na concentração utilizada, o filme apresenta elevada citotoxicidade (9,2 % quando comparada com o controlo negativo). Uma vez que esta formulação se destina a tratar uma infeção, sendo tóxico para as bactérias, não seria expectável que se revelasse totalmente inócuo para o tecido humano. O quitosano tem sido descrito como biocompatível com o tecido humano e o ácido láctico utilizado nesta formulação foi selecionado por ser o ácido fisiológico da vagina. Por outro lado, o facto de esta formulação se destinar a um tratamento curto, num ambiente vaginal alterado pela presença de bactérias pode influenciar o efeito final da formulação no tecido do hospedeiro. Por estes motivos, o real impacto destes resultados na toxicidade vaginal só poderá ser avaliado pela realização de mais testes de toxicidade e comparação, nas mesmas condições, com outros tratamentos habitualmente utilizados.

[0093] Detalhe das composições para filmes vaginais:

1 – Composições contendo gelatina (20-40 % p/p), propilenoglicol ou glicerina (10-25 %) e água, com proporções preferenciais de gelatina e humectante de 4:3 ou 4:5, secas por freeze-drying.

2 – Composições semelhantes às descritas em 1 contendo um pó ou mistura de pós até 15 % p/p.

3 – Composições contendo gelatina de 5-20 % p/p e de propilenoglicol ou glicerina de 3 a 20 %.

4 - Composições contendo gelatina em concentrações de 0-5 %, glicerina ou propilenoglicol de 0,4-5 %, derivados da celulose como a hidroxipropilmetilcelulose, hidroxietilcelulose, carboximetilcelulose sódica em concentrações de 0-5 %, ácido láctico 0-2 %, lactato de sódio 0-2 % e água (q.b.p. 100 g) secos em estufa, a 45 °C até 24h para obter formulações de baixa espessura designados por filmes vaginais.

5 – Composições semelhantes às descritas em 4, congeladas a -80 °C e liofilizadas por freeze-drying para obter formulações com a mesma composição mas com aspeto de esponja.

6 – Composições semelhantes às descritas em 4 e 5 contendo um pó ou mistura de pós até concentração de 10 %.

7 - Composições semelhantes às descritas em 4 e 5 que integram microorganismos vivos (probióticos como os do género Lactobacillus) misturados com compostos prébióticos como a inulina, lactose, ácido ascórbico, leite em pó, fructooligossacáridos, ácido láctico, lactato de sódio, trealose e a glucose e secos em estufa a 45 °C, até 24h para obter formulações com aspeto de filmes ou esponjas, respetivamente.

8 - Composições contendo gelatina em concentrações de 0-5 %, glicerina ou propilenoglicol de 0,4-5 %, quitosano de peso molecular compreendido entre 310-150 kDa (comummente conhecido como quitosanos de médio peso molecular) com concentrações entre 0-5 %, derivados da celulose como a hidroxipropilmetilcelulose, hidroxietilcelulose, carboximetilcelulose sódica em concentrações de 0-5 %, ácido láctico 1-2 %, lactato de sódio 0-2% e ácido acético 0-2% (q.b.p. 100 g) secos em estufa, a 45 °C até 24h para obter formulações de baixa espessura designados por filmes vaginais.

9 – Composições semelhantes às descritas em 8 contendo quitosanos peso molecular entre 10-150 kDa, comummente identificado como quitosano de baixo peso molecular, ou quitosanos de peso molecular entre 310-350 kDa, comummente identificados como quitosanos de alto peso molecular.

10 – Composições semelhantes às descritas em 8 e 9 contendo um pó ou mistura de pós até concentração de 10 %.

11 – Composições semelhantes às descritas em 8, 9 e 10 secas pela técnica de freeze-drying para obtenção de formulações com aspeto opaco e espessura superior.

[0094] Os filmes vaginais agora divulgados apresentam diversas aplicações no âmbito da prevenção e tratamento de infeções vaginais. Tal como apresentado, a utilização de formulações sem quitosano permite a incorporação de microorganismos vivos com propriedades probióticas que favorecem o reequilíbrio da flora vaginal decorrentes de situações de infeção ou desequilíbrio fisiológico. Estas formulações são compatíveis com os microorganismos probióticos e apresentam baixa citotoxicidade.

[0095] Formulações com quitosano apresentam elevado potencial para tratar infeções bacterianas, nomeadamente a bacteriose vaginal, absorvendo os fluidos em excesso na vagina no momento do tratamento e dispersando rapidamente o que pode promover a sua dispersão homogénea na vagina e potenciar a eficácia. Pelo seu perfil de composição estas formulações poderão também encontrar aplicabilidade em infeções fúngicas visto que o quitosano apresenta atividade antifúngica.

[0096] Ao longo da descrição e reivindicações a palavra "compreende" e variações da palavra, não têm intenções de excluir outras características técnicas, aditivos, componentes, ou passos. Objetos adicionais, vantagens e características da invenção irão tornar-se evidentes para os peritos na técnica após o exame da descrição ou podem ser aprendidos pela prática da invenção. Os seguintes exemplos e figuras são fornecidos como forma de ilustração, e não têm a intenção de serem limitativos da presente invenção. Além disso, a presente invenção abrange todas as possíveis combinações de formas de realização particulares ou preferenciais aqui descritas.

[0097] Ainda que na presente solução se tenham somente representado e descrito realizações particulares da solução, o perito na matéria saberá introduzir modificações e substituir umas características técnicas por outras equivalentes, dependendo dos requisitos de cada situação, sem sair do âmbito de proteção definido pelas reivindicações anexas.

[0098] As realizações apresentadas são combináveis entre si. As seguintes reivindicações definem adicionalmente realizações preferenciais.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de base aquosa para um filme/esponja para o uso no tratamento de infeções urogenitais que compreende:
   0,4-25 % (m/m) de um plastificante,
   0,4-20 % (m/m) de pelo menos um polímero muco adesivo,
   pelo menos um probiótico e/ou prebiótico,
   pelo menos um composto ativo em quantidades farmacologicamente eficazes.

2. Composição de acordo com a reivindicação anterior que compreende:
   0,5-10% (m/m) de um plastificante,
   0,5-5% (m/m) de, pelo menos um polímero muco adesivo;
   0,25 – 10% (m/m) pelo menos um probiótico e/ou prebiótico, de preferência 1-2,5% (m/m)
   0,25-15 % (m/m) de um composto ativo, de preferência 0,5-3 % (m/m).

3. Composição de acordo com as reivindicações anteriores que compreende 10^5 - 10^{12} UFC/ml de uma cultura de probióticos.

4. Composição de acordo com as reivindicações anteriores em que os probióticos são bactérias produtoras de ácido láctico, em particular Lactobacillus spp.

5. Composição de acordo com a reivindicação anterior em que a espécie de Lactobacillus é selecionada de uma lista constituída por: Lactobacillus iners, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus delbruekii, Lactobacillus jensenii ou suas misturas.

6. Composição de acordo com as reivindicações anteriores em que o composto ativo é selecionado de uma lista que consiste: metronidazol, clindamicina, clotrimazol, quitosano, oligoquitosanos ou suas combinações.

7. Composição de acordo com as reivindicações anteriores em que compreende ainda um surfactante, corante, vitamina, antioxidante, hormonas, e/ou um agente crioprotetor.

8. Composição de acordo com a reivindicação anterior em que o pré-bióticos é selecionado de uma lista constituída por: inulina, lactose, ácido ascórbico, leite em pó, fruto-oligossacáridos, glucose, ácido láctico, lactato de sódio, ou suas combinações.

9. Composição de acordo com as reivindicações7-8 em que o agente crioprotetor é selecionado de uma lista constituída por: trealose, glicerol, lactose, glucose ou suas combinações.

10. Composição de acordo com a reivindicação anterior em que o polímero muco adesivo é selecionado de uma lista constituída por: gelatina, álcool polivinílico, carbómeros, quitosano, policarbófilos, derivados da celulose ou suas combinações.

11. Composição de acordo com as reivindicações anteriores em que os derivados de celulose são selecionados da seguinte lista: hidroxipropilmetilcelulose, hidroxietilcelulose, carboximetilcelulose sódica, hidroximetilcelulose, etilcelulose, extractos de tomilho, extractos de Helichrysum spp., extractos de Echinacea spp., extractos de Satureja spp., extratos de cravinho ou suas combinações.

12. Composição de acordo com as reivindicações anteriores em que o quitosanos tem pesos moleculares entre 10-350 kDa; de preferência 10-150 kDa ou 310-350 kDa.

13. Composição de acordo com as reivindicações anteriores que compreende:

    0,4-5% (m/m) de derivados de celulose e,

    0.1-2% (m/m) de ácido láctico, ou lactato de sódio, ou suas misturas.

14. Composição de acordo com as reivindicações anteriores em que o plastificante é um poliol, de preferência selecionado de uma lista constituída por: propano-1,2 diol, propano-1,2,3 triol, glicerol, polietilenoglicol, ou suas combinações.

15. Composição de acordo com as reivindicações anteriores para o uso na prevenção e/ou tratamento infeções vaginais, em particular causadas por Gardnerella vaginalis, Prevotella spp., Mobilluncus spp., Mycoplasma hominis, Candida spp., ou Trichomonas vaginalis.

16. Filme obtenível pela desidratação da composição descrita de acordo com qualquer das reivindicações anteriores.

17. Filme de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, com uma forma substancialmente retangular com um comprimento entre 5-10 cm e de 2-4 cm de lado.

18. Filme de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores com uma espessura entre 0,09 - 3 mm, de preferência 0,25 - 2 mm.

19. Esponja obtenível pela liofilização da composição descrita de acordo com qualquer das reivindicações anteriores.

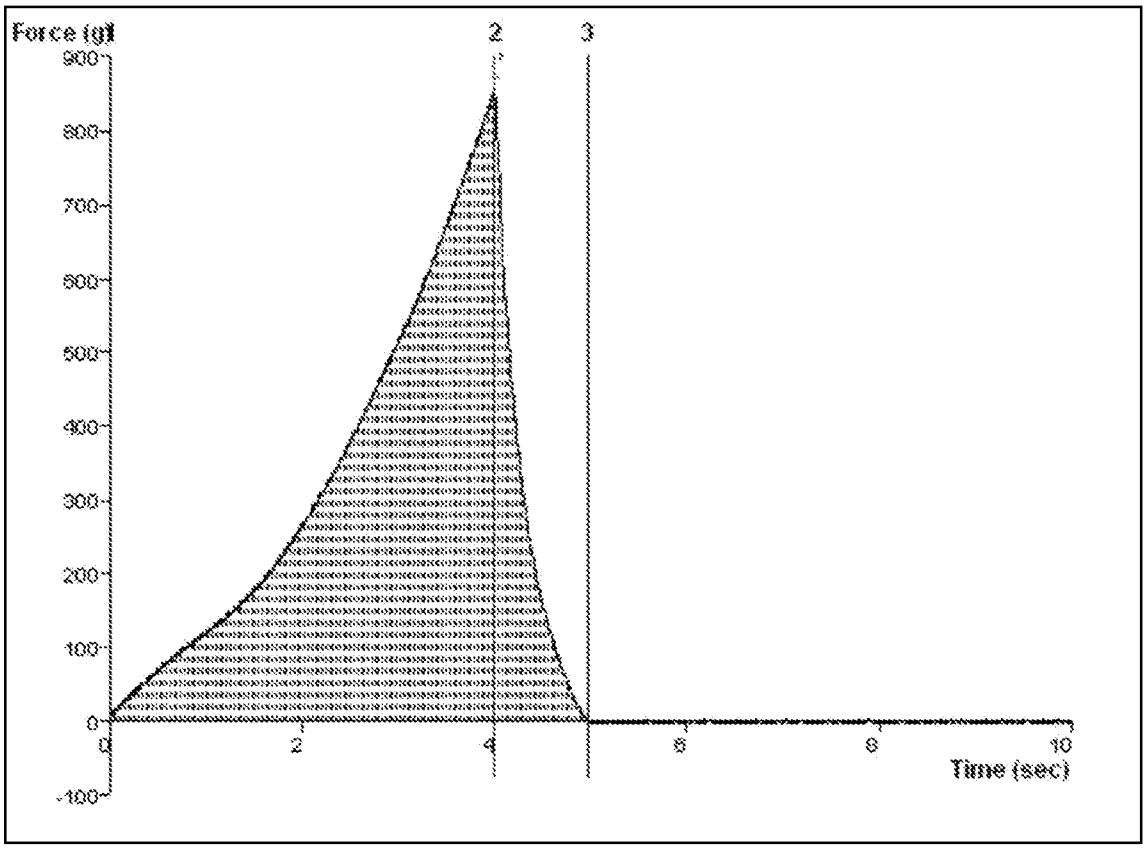
Force (gf)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
0
2
4
6
8
10
Time (sec)
2
3

Fig.1

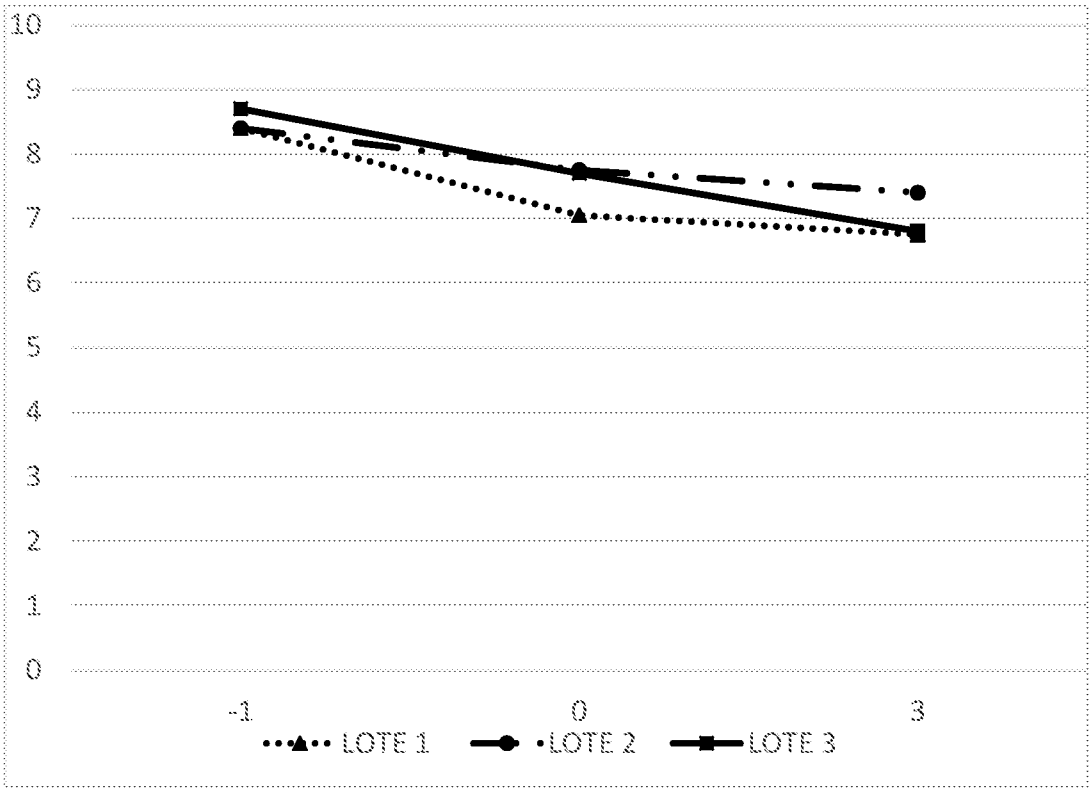
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
0
3
LOTE 1
LOTE 2
LOTE 3

Fig.2

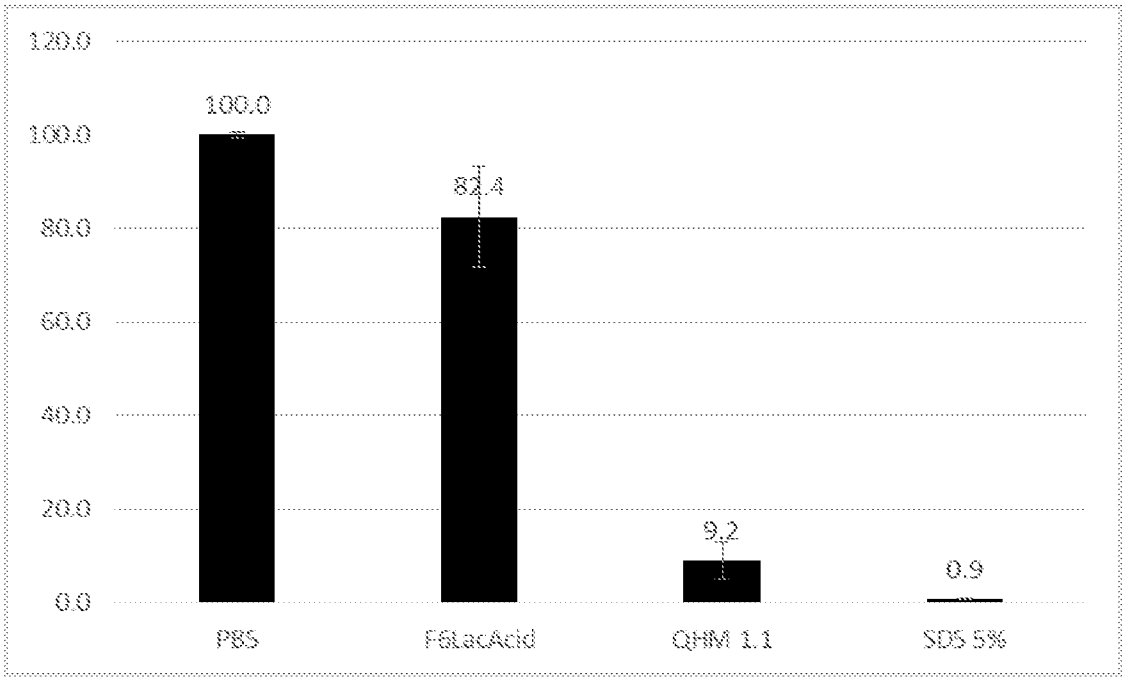
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
100.0
82.4
9.2
0.9
PBS
F8LacAcid
QHM 1.1
SDS 5%

Fig.3

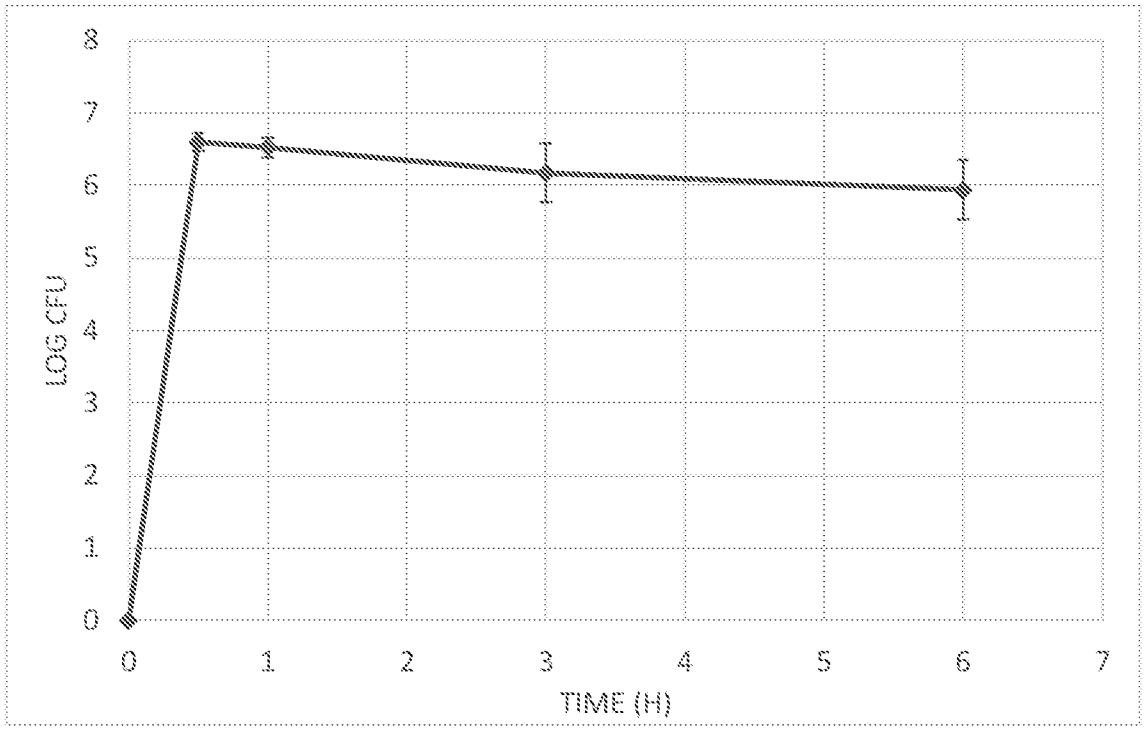
LOG CFU
0
1
2
3
4
5
6
7
8
TIME (H)
0
1
2
3
4
5
6
7

Fig.4

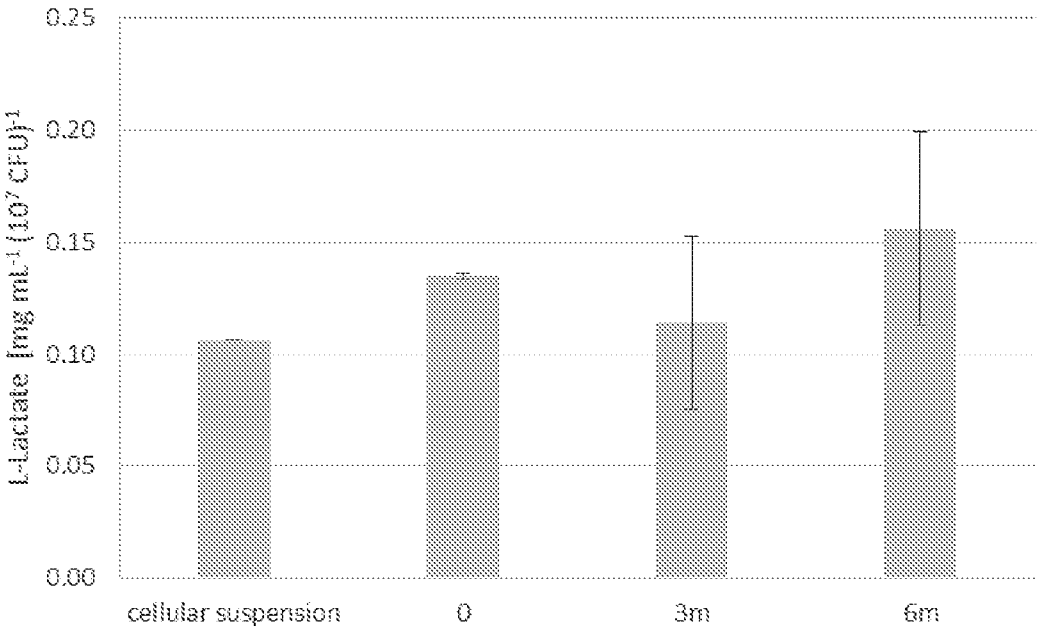
L-Lactate [mg ml-1 (10^7 CFU)-1
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
cellular suspension
0
3m
6m

Fig.5