MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	**102012902048879**
Data Deposito	**09/05/2012**
Data Pubblicazione	**09/11/2013**

Classifiche IPC

Titolo

COMPOSIZIONI OFTALMICHE TOPICHE A BASE DI PROBIOTICI STABILIZZATI.

COMPOSIZIONI OFTALMICHE TOPICHE A BASE DI PROBIOTICI STABILIZZATI

DESCRIZIONE

Campo dell'invenzione

La presente invenzione riguarda composizioni oftalmiche topiche a base di probiotici stabilizzati. Più in particolare, l'invenzione concerne preparati oftalmici per applicazione topica sulla superficie oculare contenenti probiotici vivi, i quali sono stabilizzati per effetto della specifica composizione del veicolo in cui sono dispersi, e restano vitali per almeno tre mesi dal momento della preparazione per l'uso, senza perdite rilevanti di stabilità o di vitalità cellulare dei microrganismi presenti.

Antefatto dell'invenzione

Nella definizione più ampiamente accettata, i "probiotici" sono un supplemento dietetico a base di microbi vivi che, quando assunto in quantità adeguata, ha un effetto benefico sull'organismo ospite, rafforzando l'ecosistema intestinale o degli altri distretti (ad es. oculare, epidermico) interessati dalla somministrazione. In accordo con le definizioni ufficiali, in particolare le linee guida della FAO (Food and Agriculture Organization delle Nazioni Unite) e dell'OMS/WHO (Organizzazione Mondiale della Sanità), il termine probiotico è riservato a quei microrganismi che si dimostrano in grado, quando vengono ingeriti o somministrati topicamente, di esercitare effettivamente tali funzioni benefiche, raggiungendo il sito di azione in condizioni di vitalità.

Pertanto, ad esempio, sono considerati alimenti probiotici quegli alimenti, generalmente fermentati, che contengono microrganismi probiotici vivi ed attivi in numero sufficientemente elevato, potenzialmente efficaci nell'esercitare un'azione di equilibrio sulla microflora intestinale median-

te colonizzazione diretta. Questi promuovono e migliorano le funzioni di equilibrio fisiologico dell'organismo attraverso un insieme di effetti aggiuntivi alle normali attività nutrizionali. I batteri lattici, per la maggior parte rappresentati dai **lactobacilli**, e i **bifidobatteri** sono le più comuni tipologie di microrganismi probiotici presenti in tali alimenti, ma anche alcuni **lieviti** e altri **bacilli** possono rientrare nella definizione di "probiotici".

I fermenti lattici vengono consumati fin dai tempi più remoti dell'umanità insieme agli alimenti fermentati che li contengono, in particolare prodotti lattiero-caseari come yogurt, latte fermentato, kefir. In tempi più recenti si sono anche diffusi commercialmente prodotti simili appositamente addizionati di colture batteriche vive e attive, anche se l'effetto benefico specifico dell'assunzione di simili prodotti non è dimostrabile, dato che molti dei microrganismi aggiunti muoiono appena entrano in contatto con i succhi gastrici, non sopportandone l'acidità.

I probiotici sono stati ritenuti potenzialmente utili nella prevenzione del cancro, dell'ipercolesterolemia e delle patologie allergiche, e di conseguenza negli anni recenti si è assistito ad un crescente interesse nell'uso dei batteri e dei lieviti probiotici finalizzato al ripristino e al mantenimento della flora batterica nell'organismo. L'uso di tali prodotti incontra una crescente diffusione anche nella forma di integratori dietetici, come polveri, capsule o compresse a base di probiotici. In effetti, varie proprietà nutrizionali ed effetti terapeutici sono stati attribuiti a tali agenti, tra cui la capacità di modulare la risposta immunitaria, di ridurre il tenore di colesterolo nel sangue, di mitigare i sintomi dell'intolleranza al lattosio, di ridurre il rilascio di citochine e di cooperare nella prevenzione del cancro al colon.

Nonostante tale notevole elenco di proprietà profilattiche e terapeutiche ad essi attribuite, i probiotici sono rimasti un enigma per la comunità medica e scientifica fino a tempi relativamente recenti.

Inoltre, si deve tener presente che il contenuto di microrganismi vitali e la qualità generale di molti prodotti contenenti probiotici sono consi-

derati problematici e sono stati messi in discussione nella letteratura scientifica. Ad esempio, in uno studio sul contenuto di *L. casei* in yogurt commerciali (Shah N.P., *Journal of Dairy Science*, **2000**, 83(4), 894-907), l'autore non ha trovato trace di microrganismi vivi in 3 dei 6 prodotti esaminati e solo basse concentrazioni in altri due. Analoghe discrepanze sono state riportate per prodotti probiotici commerciali distribuiti in forme di dosaggio solide come polveri, capsule e compresse.

Hughes e coll. (Hughes V., *Obstetrics Gynecology*, **1990**, 75, 244-248) hanno analizzato 11 prodotti che si sosteneva contenessero *L. acidophilus* per determinare il numero e i tipi di batteri presenti, e hanno riscontrato che solo due prodotti contenevano *L. acidophilus*, mentre gli altri contenevano tutti *L. casei*.

Simili problemi nel mantenere la vitalità di *L. acidophilus* in prodotti nutraceutici sono deducibili, ad esempio, dal brevetto statunitense **US 6008027** (Langner), che descrive capsule di gelatina riempite per il 90% con una coltura di *L. acidophilus* liofilizzato e con il 10% di diossido di silicio, provviste di rivestimento gastroresistente di acetato di polivinilftalato (PVAP) e poi essiccate sotto vuoto per 72 ore per rimuovere l'umidità e l'ossigeno. Dopo solo un anno di conservazione a temperatura ambiente, le conte di colonie batteriche erano ridotte da una iniziale concentrazione di 1 miliardo di colonie per grammo a soli 33 milioni di colonie per grammo.

Comunque, gli studi sulla conservazione di batteri vivi si sono orientati per la maggior parte su preparazioni liofilizzate, concentrandosi su metodi migliorati di produzione e su soluzioni tecniche per semplificarne l'applicazione, come ad esempio nel caso dei brevetti statunitensi **US 5139792** e **US 5401501**.

Un numero limitato di documenti brevettuali si sono occupati di metodi per la conservazione di sospensioni batteriche in forma liquida pronta per l'uso, tra cui il brevetto statunitense **US 4999301**, che descrive un me-

todo per la conservazione di *Lactobacillus plantarum* o *Bacillus subtilis* in un mezzo concentrato contenente il 10-30% di nutrienti solidi per un periodo di tempo di due mesi.

Nella letteratura scientifica, i probiotici vengono proposti in primo luogo come coadiuvanti nel trattamento di disordini del tratto gastrointestinale, per combattere gli effetti collaterali degli antibiotici e fornire un generale sostegno immunitario. Essi possono anche avere un ruolo interessante in oftalmologia, in particolare per coadiuvare il trattamento della congiuntivite allergica e dell'infiammazione da rosacea oculare, sindrome dell'occhio secco, infiammazione o infezioni oculari batteriche o virali.

In uno studio di Iovieno e coll. (Iovieno A. et al., *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2008**, 246, 435-441) è stato sperimentato l'uso di un collirio a base di probiotici con *L. acidophilus* per un mese, per trattare sette pazienti con segni e sintomi di congiuntivite allergica primaverile. *L. acidophilus* è stato diluito in soluzione fisiologica per realizzare la sospensione di collirio e questa è stata tenuta congelata (-70° C) per conservare la vitalità del probiotico. La sospensione di probiotico veniva preparata una volta ogni 4 settimane di trattamento in condizioni sterili nella farmacia ospedaliera, distribuita in flaconi sterilizzati a pH 7-7,4. and conservata a -70°C. Un flacone di prodotto da 7 ml veniva dato al paziente ogni settimana, per un mese.

L'applicazione oftalmica di probiotici è stata anche descritta nella domanda di brevetto internazionale pubbl. No. **WO 03/022255** (De Simone), nella domanda di brevetto **US 2005/0214271** (Hsu Ching-Hsiang et al.) e nella domanda di brevetto internazionale pubbl. No. **WO 2007/125566** (Bonini et al.), ma in nessuno di questi documenti si considera il problema della stabilità dei probiotici, e in effetti le formulazioni descritte non possono essere conservate per i tempi richiesti ad un prodotto farmaceutico o ad un integratore alimentare senza una drastica riduzione di vitalità dei probiotici contenuti.

Nonostante il crescente interesse per l'uso dei microrganismi probiotici in campo medico, e in particolare nel campo oftalmico, in cui il prodotto avrebbe il vantaggio di non dover attraversare l'ambiente gastrico per raggiungere il sito d'azione, il problema di fornire un preparato dotato di sufficiente stabilità e vitalità cellulare per una conservazione a lungo termine in forme di dosaggio liquide per applicazione topica non ha trovato ancora una soluzione valida.

Sommario dell'invenzione

Alla luce di quanto sopra, la presente invenzione si propone lo scopo di fornire un preparato per uso farmaceutico a base di microrganismi probiotici per applicazione topica oftalmica, che mantenga la propria vitalità cellulare e la propria stabilità per i periodi di tempo previsti per un uso commerciale del preparato, pur richiedendo semplici modalità di produzione, di conservazione e di applicazione nell'uso.

Secondo la presente invenzione, è stato trovato che è possibile realizzare preparati topici oftalmici per il trattamento di patologie oculari a base infettiva o infiammatoria contenenti microrganismi probiotici, che si mantengono vitali per almeno tre mesi con normale conservazione in frigorifero (vale a dire ad una temperatura di 2-8°C), aggiungendo alle sospensioni acquose dei microrganismi in questione, appartenenti al genere *Lactobacillus* e/o al genere *Saccharomyces*, degli opportuni agenti disperdenti, cioè prodotti con proprietà tensioattive.

Gli agenti disperdenti (tensioattivi) utilizzati nei preparati probiotici secondo l'invenzione appartengono macroscopicamente a due grandi famiglie:

- tensioattivi peghilati, nei quali una parte idrofobica della struttura è legata ad una parte idrofila formata da catene più o meno lunghe di polietilenglicole;
- tensioattivi copolimerici a blocchi (polipropilenossidi e polietilenos-

sidi), nei quali una parte idrofobica formata da unità di poliossipropilene è unita a una parte idrofila formata da unità di poliossietilene.

Della prima famiglia citata fanno parte, in particolare, i seguenti tensioattivi peghilati utilizzati nelle formulazioni preferite dell'invenzione: PEG, olio di ricino idrogenato polietossilato 40 (Polyoxyl 40 Hydrogenated Castor oil), polisorbati, vitamina E TPGS, mentre della seconda famiglia citata fa parte il tensioattivo copolimerico a blocchi denominato polossamero 188 (Poloxamer 188), anch'esso utilizzato nelle formulazioni preferite. Tali tensioattivi sono ampiamente noti e già utilizzati in oftalmologia, e ne esistono centinaia di analoghi strutturali, denominati in maniera diversa a seconda dell'azienda che li produce.

Secondo gli studi condotti nell'ambito della presente invenzione, si può ipotizzare che il motivo per cui la presenza degli agenti disperdenti in questione nella sospensione di probiotici apporta un miglioramento della stabilità/vitalità dei probiotici sia legato al fatto che l'agente disperdente utilizzato riesce a creare delle micelle, che "ospitano" il probiotico e ne proteggono la parete cellulare dal contatto con l'ossigeno disciolto nell'acqua, limitandone la degradazione.

Tale effetto inaspettato di miglioramento della stabilità della sospensione di probiotico si verifica in maniera particolarmente evidente con i lattobacilli della specie **Lactobacillus rhamnosus** e con i lieviti della specie **Saccharomyces boulardii**. In questi casi, come già notato, si è trovato che è possibile stabilizzare il probiotico, in termini di vitalità cellulare, per almeno tre mesi dopo la dispersione dei microrganismi nella composizione oftalmica.

Le formulazioni oftalmiche secondo l'invenzione, pertanto, comprendono micelle disperse ciascuna delle quali formata da un nucleo di batteri o lieviti probiotici, circondati da uno più agenti disperdenti in soluzione acquosa, eventualmente assieme ad altri ingredienti utili per la formulazione di preparati topici oftalmici, come agenti polimerici mucoadesivi,

agenti osmoprotettivi per mantenere l'osmolarità del prodotto ai livelli fisiologici, regolatori di pH o tamponi, sali ionici.

La fase acquosa così ottenuta, contenente le micelle con probiotico e disperdente, può costituire il vero e proprio preparato oftalmico, oppure può essere a sua volta dispersa in una opportuna fase oleosa a formare un'emulsione acqua-in-olio, del tipo di quelle usate nelle pomate e negli unguenti oftalmici.

Considerando come metodo di misura della vitalità cellulare dei probiotici in questione la conta delle unità formanti colonia (CFU), che, diversamente dalla conta microscopica diretta delle cellule, consente di distinguere le cellule vitali da quelle non vitali, e consente di ridurre al massimo gli errori nella conta, le composizioni secondo la presente invenzione mostrano una perdita di cellule vitali, a tre mesi dalla preparazione e dopo conservazione a 2-8°C, che è sorprendentemente inferiore alla perdita di cellule vitali che si ha sospendendo gli stessi microrganismi in una comune soluzione fisiologica.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione un preparato oftalmico topico contenente, al momento dell'uso, una o più specie di microrganismi probiotici scelti dal gruppo consistente in Lactobacilli e Saccaromiceti, in sospensione in una fase acquosa assieme ad uno o più agenti disperdenti scelti dal gruppo consistente in: olio di ricino idrogenato polietossilato, polisorbati, polietilenglicol, polossameri, vitamina E TPGS, e ad un veicolo oftalmologicamente accettabile.

Secondo una prima forma di realizzazione del preparato dell'invenzione, i microrganismi probiotici possono essere sono contenuti, al confezionamento, all'interno di un tappo-serbatoio, mentre detti uno o più agenti disperdenti sono contenuti nella fase acquosa presente nel relativo flacone, assieme al veicolo oftalmologicamente accettabile. Al momento

dell'uso la polvere di batteri e/o lieviti probiotici viene espulsa dal tappo-serbatoio e lasciata cadere nella miscela acquosa presente nel flacone, e si ottiene il preparato a base di probiotici pronto per l'uso, cioè per la somministrazione in gocce sulla superficie oculare.

Secondo un'ulteriore forma di realizzazione del preparato oftalmico dell'invenzione, i microrganismi probiotici possono essere contenuti, al confezionamento, all'interno di una fase acquosa a sua volta dispersa in una fase oleosa di una emulsione acqua-in-olio. In questo caso il preparato oftalmico topico ha la forma di un unguento o una pomata oftalmica, con una base per la maggior parte oleosa, in cui sono disperse goccioline acquose contenenti i probiotici assieme agli uno o più agenti disperdenti proposti secondo l'invenzione.

Come già notato, la specie di probiotici preferiti nel genere dei Lactobacilli è rappresentata da *Lactobacillus rhamnosus* e quella preferita nel genere dei Saccaromiceti è rappresentata da *Saccharomyces boulardii*. Formulazioni di probiotici preferite secondo l'invenzione sono rappresentate, in particolare, da miscele di *L. rhamnosus* e di *S. boulardii*. Non è esclusi che altri microrganismi probiotici possano essere aggiunti al preparato mantenendo ancora buone caratteristiche di stabilità e vitalità cellulare per tempi di conservazione accettabili, in particolare probiotici appartenenti ai generi Bifidobatteri, Streptococchi, Enterococchi e Propionibatteri.

Nei preparati di probiotici proposti secondo l'invenzione i microrganismi sono contenuti in concentrazioni comprese tra 1 milione e 10 miliardi per grammo.

Preferibilmente, il preparato oftalmico topico secondo invenzione contiene, nel citato veicolo oftalmologicamente accettabile, uno o più agenti osmoprotettivi scelti tra: glicerolo, trealosio, mannitolo, betaina, glicina, sali 3-dimetilsolfonio propionato, peptone, triptone, cisteina, prolina, carnitina, N-acetilcarnosina, frutto-oligosaccaridi, fruttosio.

Secondo alcune sue forme di realizzazione preferite, detto prepara-

to contiene anche, nel citato veicolo oftalmologicamente accettabile, uno o più polimeri mucoadesivi scelti tra: acido ialuronico, carbossimetilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, carbomeri, carbopol, gomma HP-guar, gomma xantana, alcool polivinilico.

Secondo delle ulteriori forme di realizzazione preferite dell'invenzione, il preparato oftalmico topico proposto può contenere come eccipiente uno o più sali ionici scelti tra: sali di magnesio, potassio, calcio, sodio, citrati, cloruri, fosfati o solfati.

Nelle forme di somministrazione in unguento o in pomata oculare, li preparato oftalmico dell'invenzione può anche comprendere, in detta fase oleosa, uno o più componenti oleosi scelti tra: olio minerale, olio di mandorle, olio di ricino, olio di semi di cotone, olio di semi di soia, olio di oliva, trigliceridi a catena media, acidi grassi, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolammina, fosfatidilinositolo, acido fosfatidico, lanolina, paraffina, cera d'api.

I preparati di probiotici stabilizzati proposti secondo l'invenzione, come sarà ulteriormente illustrato dalla sperimentazione riportata nel seguito, mostrano una perdita di vitalità cellulare a tre mesi di conservazione a 2-8°C, in unità formanti colonie per millilitro (CFU/ml), compresa tra 0,35 log e 2 log, e preferibilmente inferiore a 1 log.

Come già esposto, i preparati oftalmici topici a base di probiotici stabilizzati secondo l'invenzione possono essere realizzati in forma di sospensione acquosa o di gel (idrogel) per quanto riguarda le forme a base acquosa, oppure in forma di unguento o di pomata per le forme in emulsione acqua-in-olio, oppure infine in forma di sistema "reservoir" da disporre nel sacco congiuntivale.

Le caratteristiche specifiche dell'invenzione, così come i vantaggi della stessa rispetto alle soluzioni della tecnica nota, risulteranno più evidenti con riferimento alla descrizione dettagliata di alcuni esempi di realizzazione della stessa, riportati nel seguito a scopo meramente illustrativo assieme ad alcune formulazioni di confronto, e ai risultati della relativa

sperimentazione.

ESEMPIO DI CONFRONTO 1

Dispersione liquida

La seguente composizione è un esempio di dispersione liquida di *Lactobacillus rhamnosus* posto in una soluzione contenente una concentrazione isotonica di sodio cloruro.

Ingrediente	**Peso (%)**
Tappo serbatoio	
Lactobacillus rhamnosus	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
Soluzione	
NaCl	0,9
Acqua	98,99

La vitalità cellulare della composizione dell'esempio è stata valutata al tempo 0, cioè al momento della preparazione, e quindi la composizione è stata conservata a 2-8°C. La vitalità cellulare è stata successivamente valutata dopo un mese e dopo due mesi dalla preparazione, dopo di che la prova è stata interrotta a causa dell'eccessiva riduzione delle colonie vitali.

Tempo (mesi)	**Log CFU/ml**	**Log perdita**
0	9,50	-
1	4,37	5,13
2	1,15	3,22

ESEMPIO DI CONFRONTO 2

Dispersione liquida

La seguente composizione è un esempio di dispersione liquida di

Saccharomyces boulardii posto in una soluzione contenente cloruro di sodio e cloruro di potassio come agenti isotonici.

Ingrediente	Peso (%)
Tappo serbatoio	
Saccharomyces boulardii	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
Soluzione	
NaCl	0,7
KCl	0,2
Acqua	98,99

La vitalità cellulare della composizione in studio, sia al momento della preparazione che dopo periodi prefissati di conservazione a 2-8°C, è riportata nella tabella seguente.

Tempo (mesi)	Log CFU/ml	Log perdita
0	9,64	-
1	6,56	3,08
2	2,44	4,18
3	0,95	1,69

La perdita di vitalità cellulare risulta troppo elevata e quindi la formulazione non è adatta per l'uso in un preparato probiotico per uso farmaceutico.

ESEMPIO DI CONFRONTO 3

Dispersione polimerica liquida

La seguente composizione è un esempio di formulazione in cui i microrganismi, *Lactobacillus rhamnosus* e *Saccharomyces boulardii*, sono

contenuti nel tappo-serbatoio con l'obiettivo di preservarne la stabilità, in soluzione isotonica di cloruro di magnesio. Al momento dell'uso vengono mescolati con gli altri ingredienti presenti nel flacone in una soluzione contenente un polimero cellulosico come mucoadesivo.

Ingrediente	**Peso (%)**
Tappo serbatoio	
Lactobacillus rhamnosus	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
Saccharomyces boulardii	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
Magnesio cloruro	0.6
Soluzione	
Carbossimetilcellulosa (CMC)	0,15
NaCl	0,7
KCl	0,2
Disodio fosfato	0,25
Acqua	97,9

La vitalità cellulare della composizione in studio, sia al momento della preparazione che dopo periodi prefissati di conservazione a 2-8°C, è riportata nella tabella seguente.

Tempo (mesi)	**Log CFU/ml**	**Log perdita**
0	9,54	-
1	9,00	0,54
2	7,58	1,42
3	6,22	1,36

Come risulta dalla tabella, il test di vitalità cellulare per questa composizione dopo tre mesi di conservazione a 2-8°C mostra una perdita logaritmica complessiva di unità formanti colonia per ml pari a **3,32**, inaccet-

tabile per un uso farmaceutico del preparato.

ESEMPIO DI CONFRONTO 4

Dispersione polimerica liquida osmoprotetta

La seguente composizione è un esempio di formulazione in cui i microrganismi, *Lactobacillus rhamnosus* e *Saccharomyces boulardii*, sono contenuti nel tappo-serbatoio in soluzione isotonica di cloruro di magnesio, e al momento dell'uso vengono mescolati con gli altri ingredienti presenti nel flacone, in una soluzione osmoprotetta contenente un polimero cellulosico come mucoadesivo.

Ingrediente	**Peso (%)**
Tappo serbatoio	
Lactobacillus rhamnosus	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
Saccharomyces boulardii	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
Magnesio cloruro	0,6
Soluzione	
Carbossimetilcellulosa (CMC)	0,15
Trealosio	1
NaCl	0,7
KCl	0,2
Disodio fosfato	0,25
Acqua	96,9

La vitalità cellulare della composizione in studio, sia al momento della preparazione che dopo periodi prefissati di conservazione a 2-8°C, è riportata nella tabella seguente.

(segue tabella)

Tempo (mesi)	Log CFU/ml	Log perdita
0	9,33	-
1	9,00	0,33
2	8,22	0,78
3	7,98	0,24

Il test di vitalità cellulare per questa composizione dopo tre mesi di conservazione a 2-8°C mostra una perdita logaritmica complessiva di unità formanti colonia per ml pari a **1,35**, che è ancora un valore inaccettabile per un uso farmaceutico del preparato.

ESEMPIO 1

Dispersione polimerica liquida con tensioattivo

La seguente composizione è un esempio di formulazione di idrogel in cui i microrganismi, *Lactobacillus rhamnosus* e *Saccharomyces boulardii*, sono contenuti nel tappo-serbatoio in soluzione isotonica di cloruro di magnesio, e prima dell'uso vengono mescolati con gli altri ingredienti presenti nel flacone, in una soluzione contenente un polimero cellulosico come mucoadesivo e un agente disperdente (tensioattivo).

Ingrediente	Peso (%)
Tappo serbatoio	
Lactobacillus rhamnosus	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
Saccharomyces boulardii	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
Magnesio cloruro	0,6
Soluzione	
Carbossimetilcellulosa (CMC)	0,4
Glicerolo	1,5
Vitamina E TPGS	0,2

NaCl	0,7
Disodio fosfato	0,25
Acqua	96

La vitalità cellulare della composizione in studio, sia al momento della preparazione che dopo periodi prefissati di conservazione a 2-8°C, è riportata nella tabella seguente.

Tempo (mesi)	Log CFU/ml	Log perdita
0	9,53	-
1	9,32	0,19
2	9,10	0,22
3	8,95	0,15

Il test di vitalità cellulare per questa composizione dopo tre mesi di conservazione a 2-8°C mostra una perdita logaritmica complessiva di unità formanti colonia per ml pari a **0,58**.

ESEMPIO 2

Dispersione polimerica liquida con tensioattivo

La seguente composizione è un altro esempio di formulazione di idrogel in cui i microrganismi, *Lactobacillus rhamnosus* e *Saccharomyces boulardii*, sono contenuti nel tappo-serbatoio in soluzione isotonica di cloruro di magnesio, e prima dell'uso vengono mescolati con gli altri ingredienti presenti nel flacone, in una soluzione contenente un polimero cellulosico come mucoadesivo e un agente disperdente.

(segue tabella)

Ingrediente	Peso (%)
Tappo serbatoio	
Lactobacillus rhamnosus	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
Saccharomyces boulardii	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
Magnesio cloruro	0,6
Soluzione	
Carbossimetilcellulosa (CMC)	0,4
Glicerolo	1,5
Polossamero 188	0,2
NaCl	0,7
Disodio fosfato	0,25
Acqua	96

La vitalità cellulare della composizione in studio, sia al momento della preparazione che dopo periodi prefissati di conservazione a 2-8°C, è riportata nella tabella seguente.

Tempo (mesi)	Log CFU/ml	Log perdita
0	9,53	-
1	9,22	0,29
2	9,10	0,12
3	8,90	0,15

Il test di vitalità cellulare per questa composizione dopo tre mesi di conservazione a 2-8°C mostra pertanto una perdita logaritmica complessiva di unità formanti colonia per ml pari a **0,53**.

ESEMPIO 3

Dispersione polimerica liquida con tensioattivo

La seguente composizione è un esempio di formulazione di idrogel

in cui i microrganismi, *Lactobacillus rhamnosus* e *Saccharomyces boulardii*, sono contenuti nel tappo-serbatoio in soluzione isotonica di cloruro di magnesio, e prima dell'uso vengono mescolati con gli altri ingredienti presenti nel flacone, in una soluzione contenente un polisaccaride come mucoadesivo e un agente disperdente.

Ingrediente	**Peso (%)**
Tappo serbatoio	
Lactobacillus rhamnosus	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
Saccharomyces boulardii	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
Magnesio cloruro	0,6
Soluzione	
Acido ialuronico	0,4
Glicerolo	1,5
Polossamero 188	0,2
NaCl	0,7
Disodio fosfato	0,25
Acqua	96

La vitalità cellulare della composizione in studio, sia al momento della preparazione che dopo periodi prefissati di conservazione a 2-8°C, è riportata nella tabella seguente.

Tempo (mesi)	**Log CFU/ml**	**Log perdita**
0	9,63	-
1	9,22	0,29
2	9,10	0,12
3	8,86	0,15

Il test di vitalità cellulare per questa composizione dopo tre mesi di

conservazione a 2-8°C mostra pertanto una perdita logaritmica complessiva di unità formanti colonia per ml pari a **0,77**.

ESEMPIO 4

Dispersione polimerica liquida con tensioattivo

La seguente composizione è un ulteriore esempio di formulazione di idrogel in cui i microrganismi, *Lactobacillus rhamnosus* e *Saccharomyces boulardii*, sono contenuti nel tappo-serbatoio in soluzione isotonica di cloruro di magnesio, e prima dell'uso vengono mescolati con gli altri ingredienti presenti nel flacone, in una soluzione contenente un polisaccaride come mucoadesivo e un agente disperdente.

Ingrediente	**Peso (%)**
Tappo serbatoio	
Lactobacillus rhamnosus	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
Saccharomyces boulardii	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
Magnesio cloruro	0,6
Soluzione	
Acido ialuronico	0,4
Prolina	1,5
Olio di ricino idrogenato polietossilato 40	0,15
NaCl	0,7
Disodio fosfato	0,25
Acqua	96

La vitalità cellulare della composizione in studio, sia al momento della preparazione che dopo periodi prefissati di conservazione a 2-8°C, è riportata nella tabella seguente.

Tempo (mesi)	Log CFU/ml	Log perdita
0	9,40	-
1	9,22	0,29
2	9,10	0,12
3	8,90	0,15

Il test di vitalità cellulare per questa composizione dopo tre mesi di conservazione a 2-8°C mostra una perdita logaritmica complessiva di unità formanti colonia per ml pari a **0,50**.

ESEMPIO 5

Dispersione polimerica liquida con tensioattivo

La seguente composizione è ancora un altro esempio di formulazione di idrogel in cui i microrganismi, *Lactobacillus rhamnosus* e *Saccharomyces boulardii*, sono contenuti nel tappo-serbatoio in soluzione isotonica di cloruro di magnesio, e prima dell'uso vengono mescolati con gli altri ingredienti presenti nel flacone, in una soluzione contenente un polimero cellulosico come mucoadesivo e un agente disperdente

Ingrediente	Peso (%)
Tappo serbatoio	
Lactobacillus rhamnosus	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
Saccharomyces boulardii	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
Magnesio cloruro	0,6
Soluzione	
Idrossipropilmetilcellulosa (HPMC)	0,25
Prolina	0,5
Carnosina	0,3
Olio di ricino idrogenato polietossilato 40	0,15
NaCl	0,7

Tris(idrossimetil)aminometano	0,2
Acqua	96

La vitalità cellulare della composizione in studio, sia al momento della preparazione che dopo periodi prefissati di conservazione a 2-8°C, è riportata nella tabella seguente.

Tempo (mesi)	Log CFU/ml	Log perdita
0	9,22	-
1	9,00	0,22
2	8,75	0,25
3	8,48	0,27

Il test di vitalità cellulare per questa composizione dopo tre mesi di conservazione a 2-8°C mostra una perdita logaritmica complessiva di unità formanti colonia per ml pari a **0,74**.

ESEMPIO 6

Unguento con probiotici in emulsione

La seguente composizione è un esempio di emulsione acqua-in-olio in cui la fase acquosa contiene i microrganismi, *Lactobacillus rhamnosus* e *Saccharomyces boulardii*, assieme ad un agente disperdente, e quest'ultima viene poi "emulsionata" in una fase oleosa ad ottenere un unguento oftalmico.

Ingrediente	Peso (%)
Lactobacillus rhamnosus	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
Saccharomyces boulardii	0,2 (200.10^7 CFU/ml)
PEG 8000	1

Acqua	0,1
Acidi grassi	3,8
Olio minerale	28
Fosfolipidi	2
Cera d'api	65

La vitalità cellulare della composizione in studio, sia al momento della preparazione che dopo periodi prefissati di conservazione a 2-8°C, è riportata nella tabella seguente.

Tempo (mesi)	**Log CFU/ml**	**Log perdita**
0	9,33	-
1	9,24	0,09
2	9,07	0,17
3	8,98	0,09

Il test di vitalità cellulare per questa composizione dopo tre mesi di conservazione a 2-8°C mostra una perdita logaritmica complessiva di unità formanti colonia per ml pari a **0,35**.

Come risulta evidente dagli esempi di realizzazione che precedono, la formulazione di probiotici secondo la presente invenzione mostra diversi vantaggi, tra cui in primo luogo la stabilità, dato che consente di contenere la perdita di vitalità dei microrganismi della formulazione, in CFU/ml, a meno di 1 unità logaritmica (1 log) dopo 3 mesi di conservazione a temperatura compresa tra 2 e 8 °C. I batteri e i lieviti della formulazione proposta sono quindi altamente vitali, e ciò consente, dal punto di vista clinico, un'applicazione topica oculare di un prodotto probiotico, e una conservazione dello stesso prodotto particolarmente semplici da attuare per il paziente.

La presente invenzione è stata descritta con riferimento ad alcune

sue forme di realizzazione specifiche, ma è da intendersi che variazioni o modifiche potranno essere ad essa apportate dagli esperti nel ramo senza per questo uscire dal relativo ambito di protezione.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

RIVENDICAZIONI

1. Preparato oftalmico topico contenente, al momento dell'uso, una o più specie di microrganismi probiotici scelti dal gruppo consistente in Lactobacilli e Saccaromiceti, in sospensione in una fase acquosa assieme ad uno o più agenti disperdenti scelti dal gruppo consistente in: olio di ricino idrogenato polietossilato, polisorbati, polietilenglicol, polossameri e vitamina E TPGS, e ad un veicolo oftalmologicamente accettabile.

2. Preparato oftalmico topico secondo la rivendicazione 1, in cui detti microrganismi probiotici sono contenuti, al confezionamento, all'interno di un tappo-serbatoio, e detti uno o più agenti disperdenti sono contenuti nella fase acquosa presente nel relativo flacone, assieme a detto veicolo oftalmologicamente accettabile.

3. Preparato oftalmico topico secondo la rivendicazione 1, in cui detti microrganismi probiotici sono contenuti, al confezionamento, all'interno di una fase acquosa a sua volta dispersa in una fase oleosa di una emulsione acqua-in-olio.

4. Preparato oftalmico topico secondo ognuna delle rivendicazioni 1-3, in cui dette specie di microrganismi probiotici sono *Lactobacillus rhamnosus* e *Saccharomyces boulardii*.

5. Preparato oftalmico topico secondo la rivendicazione 4, in cui detto veicolo oftalmologicamente accettabile contiene uno o più agenti osmoprotettivi scelti tra: glicerolo, trealosio, mannitolo, betaina, glicina, sali 3-dimetilsolfonio propionato, peptone, triptone, cisteina, prolina, carnitina, N-acetilcarnosina, frutto-oligosaccaridi, fruttosio.

6. Preparato oftalmico topico secondo la rivendicazione 4, in cui detto veicolo oftalmologicamente accettabile contiene uno o più polimeri mucoadesivi scelti tra: acido ialuronico, carbossimetilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, carbomeri, carbopol, gomma HP-guar, gomma xantana, alcool polivinilico.

7. Preparato oftalmico topico secondo la rivendicazione 4, in cui detto veicolo oftalmologicamente accettabile contiene uno o più sali ionici scelti tra: sali di magnesio, potassio, calcio, sodio, citrati, cloruri, fosfati o solfati.

8. Preparato oftalmico topico secondo le rivendicazioni 3 o 4, in cui detta fase oleosa comprende uno o più componenti oleosi scelti tra: olio minerale, olio di mandorle, olio di ricino, olio di semi di cotone, olio di semi di soia, olio di oliva, trigliceridi a catena media, acidi grassi, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolammina, fosfatidilinositolo, acido fosfatidico, lanolina, paraffina, cera d'api.

9. Preparato oftalmico topico secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti, in cui detti microrganismi probiotici hanno una perdita di vitalità cellulare a tre mesi di conservazione at 2-8°C a 2-8°C, in unità formanti colonie per millilitro (CFU/ml), compresa tra 0,35 log e 2 log.

10. Preparato oftalmico topico secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti, in forma di sospensione acquosa, di gel, di unguento, di emulsione, oppure in forma di sistema "reservoir" da disporre nel sacco congiuntivale.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.