

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102011901968347A1

Publication Date

20130129

Applicant

ALFA WASSERMANN S.P.A.

Title

COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE COMPRENDENTI RIFAXIMINA,
PROCESSI PER LA LORO PREPARAZIONE E LORO USO NEL
TRATTAMENTO DI INFEZIONI VAGINALI.

Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

**“ COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE COMPRENDENTI RIFAXIMINA,
PROCESSI PER LA LORO PREPARAZIONE E LORO USO NEL
TRATTAMENTO DI INFEZIONI VAGINALI ”**

a nome: ALFA WASSERMANN S.p.A.

con sede in: Alanno (PE)

* * *

Oggetto dell’Invenzione

L’oggetto dell’invenzione è costituito da composizioni a rilascio controllato, comprendenti granuli di rifaximina insieme con eccipienti farmaceuticamente accettabili, caratterizzate da rilasciare rifaximina in modo controllato nella vagina. Sono descritti anche processi per la loro preparazione e loro uso nel trattamento di infezioni vaginali, in particolare, vaginosi batteriche. Sono inoltre descritti i dosaggi di rifaximina utili ed efficaci per il raggiungimento della guarigione dalla malattia e prevenzione di recidive.

Ambito dell’Invenzione

La presente invenzione si riferisce a rifaximina, alle composizioni farmaceutiche in particolare in forma compresse e in ovuli vaginali, ai processi per loro ottenimento e al loro uso nel trattamento di infezioni vaginali, in particolare, vaginosi batteriche.

La rifaximina (INN, si veda The Merck Index, XIII ed., 8304, CAS No.80621-81-4), nomenclatura IUPAC 2S, 16Z, 18E, 20S, 21S, 22R, 23R, 24R, 25S, 26S, 27S, 28E) - 5, 6, 21, 23, 25 pentahydroxy-27-methoxy-2,4,11,16,20,22,24,26-octamethyl-2,7-(epoxypentadeca(1,11,13) trienimino) benzofuro (4,5-e)pyrido(1,2,-a

benzimidazole-1,15(2H)dione, 25-acetate) è un antibiotico semisintetico appartenente alla classe delle rifampicine, precisamente è una piridoimidazo rifamicina descritta in IT 1154655, mentre EP 0161534 descrive un processo per la produzione a partire dalla rifamicina O (The Merck Index XIII ed., 8301).

US 7,045,620, US 2008/0262220, US 7,612,199, US 2009/0130201 e Cryst. Eng Comm., 2008,10 1074-1081(2008) descrivono forme cristalline di rifaximina.

Rifaximina è un antibiotico attivo contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi, caratterizzata da un basso assorbimento sistemico, trascurabile quando somministrata per via orale, come descritto da Descombe J. J. et al. in Int. J. Clin. Pharmacol. Res., 14 (2), 51-56, (1994); è nota per la sua attività antibatterica esercitata, per esempio, contro batteri localizzati nel tratto gastrointestinale che causano infezioni intestinali, diarrea, sindrome dell'intestino irritabile, nota come "Irritable Bowel Syndrome" (IBS), crescita batterica nel piccolo intestino, nota anche come "Small Intestinal Bacterial Overgrowth" (SIBO), morbo di Crohn, noto come "Crohn's disease" (CD), insufficienza pancreatica, enteriti, fibromialgia.

Per la sua attività antibiotica locale, rifaximina ricopre un ruolo importante nella terapia delle malattie infettive ed infiammatorie intestinali, sia in fase acuta che in fase cronica.

Rifaximina esiste sia in forma cristallina che amorfa e tali forme sono descritte per esempio nel brevetto US 7,045,620, nelle domande di brevetto pubblicate con i numeri US 2008/0262024 e US 2009/0130201 e incluse nella presente invenzione. Le forme differenti di rifaximina sono associate a diversi livelli di assorbimento sistemico. Attualmente, rifaximina è autorizzata per il trattamento di patologie acute e croniche la cui eziologia è parzialmente o completamente riconducibile a batteri Gram-positivi e Gram-negativi intestinali, quali sindromi

diarroiche da alterato equilibrio della flora microbica intestinale come diarree estive, diarrea del viaggiatore, enterocoliti. È inoltre usata nella profilassi pre- e post-operatoria delle complicanze infettive negli interventi di chirurgia del tratto gastroenterico, come coadiuvante nella terapia delle iperammoniemie e nella riduzione del rischio di eventi acuti di encefalopatia epatica.

Rifaximina può essere utile anche nel trattamento della sindrome detta “delle gambe senza riposo”, più nota con il termine inglese di “Restless-legs syndrome”; nella prevenzione della peritonite batterica spontanea in pazienti affetti da insufficienza epatica e nelle infezioni indotte dall’uso cronico di farmaci inibitori della pompa protonica.

Per gli impieghi sopra descritti, la proprietà della rifaximina di essere scarsamente assorbita risulta inoltre essere un vantaggio in quanto non dà luogo a tossicità anche ad alti dosaggi, riduce l’incidenza di effetti indesiderati quali, per esempio, la selezione di ceppi batterici antibiotico-resistenti e il rischio di possibili interazioni farmacologiche.

Le caratteristiche di rifaximina rendono questo composto utile, in aggiunta al trattamento di infezioni intestinali e a patologia correlate con la flora intestinale dopo somministrazione per via orale, per trattamenti topici, quali ad esempio quelli necessari contro le infezioni vaginali, in particolare, vaginosi batterica.

La vaginosi batterica è una patologia estremamente frequente poiché rappresenta il 40-50% di tutte le infezioni vaginali. Quando sintomatica e non complicata, la vaginosi batterica è caratterizzata da perdite vaginali maleodoranti non associate ad un quadro clinico infiammatorio (vaginosi), ed è imputabile ad un’alterazione dell’ecosistema vaginale.

La normale flora vaginale di una donna sana, grazie alla prevalente presenza di Lattobacilli, in particolare il *Lactobacillus crispatus* e *gasseri*, produce perossido di idrogeno e mantiene il pH vaginale acido, esercitando un'azione inibitoria contro la crescita di gran parte dei microrganismi patogeni.

In presenza di vaginosi batterica, la flora lattobacillare viene sostituita da una crescita abnorme, anche di mille volte rispetto ai valori normali, della flora anaerobia ed aerobia facoltativa, rappresentata soprattutto da *Gardnerella vaginalis*, presente in quasi tutte le donne affette da vaginosi batterica, da *Mycoplasma hominis*, da batteri anaerobi Gram-negativi quali *Bacteroides* e *Prevotella*, da anaerobi quali *Peptostreptococcus*, da anaerobi Gram-positivi quali *Mobiluncus*, presente nel 50% dei casi, e da bacilli Gram-positivi quali *Atopobium vaginale*, presente nel 95% dei casi di vaginosi batterica.

I fattori predisponenti l'insorgere della malattia sono rappresentati da un basso livello socio-economico, l'appartenenza alla razza nera, l'utilizzo abituale di lavande vaginali, il fumo ed un'attività sessuale con partners molteplici. L'assunzione di estro-progestinici sembra invece avere un ruolo protettivo. Anche la componente ormonale risulta essere implicata nella sua eziopatogenesi in quanto tale patologia si riscontra prevalentemente nelle donne in età fertile

La vaginosi batterica può essere correlata a numerose e severe complicanze ginecologiche e ostetriche, quali ad esempio, la malattia infiammatoria pelvica, causa frequente di sterilità e gravidanza ectopica; l'infezione della ferita chirurgica dopo chirurgia ginecologica; la rottura precoce delle membrane nella donna gravida; il parto pretermine e l'aborto.

Inoltre, sebbene non sia ritenuta una malattia sessualmente trasmessa, la vaginosi batterica si associa ad un aumentato rischio di contrarre malattie pandemiche

sessualmente trasmesse, ivi compreso l'infezione del virus dell'HIV, sia nelle donne non gravide che gravide. In queste ultime determina anche un aumento del rischio di trasmissione del virus dell'HIV dalla madre al feto.

La diagnosi di vaginosi batterica può basarsi su criteri clinici e/o microbiologici.

La diagnosi clinica si effettua secondo i criteri di Amsel, come descritto da Amsel R et al. in Am J Med 1983; 74(1): 14-22. La diagnosi è positiva quando sono riscontrati almeno tre dei quattro segni di seguito riportati: 1) perdite vaginali omogenee e aderenti alle pareti della vagina; 2) positività dello "whiff test" (sviluppo di "odore di pesce" dopo aggiunta di idrossido di potassio al 10% alle secrezioni vaginali); 3) pH vaginale maggiore di 4,5 e 4) presenza, all'esame microscopico a fresco, di "clue cells" (cellule vaginali squamose alle cui pareti sono adesi i batteri che, nella vaginosi batterica, rappresentano almeno il 20% delle cellule della mucosa vaginale di sfaldamento).

La diagnosi microbiologica si basa sulla determinazione dell'indice di Nugent, che si ottiene dall'esame al microscopico del secreto vaginale mediante colorazione di Gram. Tale esame evidenzia la presenza e la numerosità di tre differenti specie batteriche vaginali. In particolare, risulta un basso punteggio se è alta la concentrazione di Lattobacilli, il punteggio aumenta se è rivelata la presenza di *Gardnerella* e *Bacteroidi* e il punteggio è ancor più alto se è accertata anche la presenza di *Mobiluncus*. Ne risulta che un punteggio da 0 a 3 è rappresentativo della flora vaginale di una donna sana, da 4 a 6 la presenza di una flora vaginale che inizia ad essere alterata, da 7 a 10 si pone diagnosi certa di vaginosi batterica, come descritto da Nugent RP et al. in J Clin Microbiol 1991, 29(2), 297-301.

Inoltre, negli ultimi anni si sono sviluppate ulteriori tecniche diagnostiche di tipo molecolare, quali la PCR-DGGE e la real-time PCR, che si basano sull'analisi sequenziale dell'RNA e che permettono l'identificazione della composizione microbica dell'ecosistema vaginale, come descritto da Zhou X et al. in *Microbiology* 2004, 150 (Pt8), 2565-2573 e in *Appl Environ Microbiol* 2004, 70(6), 3575-3581. Tali tecniche, pertanto, possono essere direttamente usate per determinare la presenza degli agenti patogeni causa della malattia e verificare anche l'effetto della terapia su di essi dal punto di vista quantitativo.

Sebbene l'eziologia della vaginosi batterica non sia stata ancora chiarita del tutto, la terapia ha l'obiettivo di indurre la guarigione sia clinica che microbiologica evitando, possibilmente, la comparsa di recidive. Pertanto una terapia ideale dovrebbe essere efficace nel debellare le specie patogene ma, al tempo stesso, favorire il ripristino e la proliferazione delle specie protettive lattobacillari con il fine di prevenire le recidive.

Le linee guida del Center of Disease Control (CDC), 2010, 59, NoRR-12 indicano che tutte le donne affette da vaginosi batterica, sintomatiche e non gravide, dovrebbero essere sottoposte ad una terapia antibiotica.

A tal proposito CDC suggerisce, come primo approccio terapeutico, trattamenti antibiotici quali ad esempio: metronidazolo compresse orali 500 mg x 2 volte/gg per 7 giorni; oppure metronidazolo gel vaginale 0,75%, un applicatore (5 g), una volta/gg per 5 giorni oppure clindamicina crema vaginale 2%, un applicatore (5 g) una volta/gg per 7 giorni.

Sia il metronidazolo che la clindamicina, somministrati sia per via sistemica (orale) che locale (vaginale), si sono dimostrati efficaci nel trattamento della vaginosi batterica, tuttavia, l'azione inibente di entrambi i principi attivi nei confronti della

flora protettiva lattobacillare, come descritto da Simoes JA et al in Infect Dis Obstet Gynecol 2001, 9(1), 41-45 ne limita l'efficacia nella prevenzione delle recidive.

Entrambi gli antibiotici, inoltre, possono determinare effetti collaterali sistemici, alcuni dei quali di particolare rilievo quali, ad esempio, le reazioni di tipo neurologico nel caso del metronidazolo o la colite pseudo-membranosa nel caso della clindamicina, anche quando somministrata per via vaginale.

Inoltre, sia il metronidazolo che la clindamicina, se somministrati ripetutamente possono indurre resistenze microbiologiche non solo a livello vaginale ma anche a livello sistemico, essendo assorbiti in modo sistemico anche dopo somministrazione vaginale.

EP 0547294 descrive composizioni contenenti quantità di rifaximina tra 50 e 500 mg utili nel trattamento di infezioni vaginali causate da microorganismi suscettibili alla rifaximina. In particolare, EP 0547294 descrive uno studio clinico effettuato con una preparazione di rifaximina schiuma e crema vaginale, contenenti 200mg di rifaximina, in cui è dimostrata la maggior efficacia della schiuma rispetto alla crema. In questo documento sono descritte anche altre composizioni per il trattamento della vaginosi batterica, contenenti rifaximina in capsule, ovuli e compresse; è descritta inoltre l'azione antibatterica della rifaximina nei confronti di batteri patogeni comunemente presenti nel secreto vaginale. In particolare è descritto in Tabella 1 di EP 0547294 che la rifaximina esercita una significativa attività antibatterica sia contro gli agenti patogeni quali *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides bivius-disiens*, *Mobiluncus* sia contro i Lattobacilli.

L'inibizione di questi ultimi batteri, la cui presenza è positiva per il mantenimento dell'ecosistema vaginale, è da considerarsi un evento negativo ai fini dell'efficacia terapeutica. Infatti, come già detto, l'ambiente acido generato dai

Lattobacilli è una condizione essenziale per la prevenzione della colonizzazione da parte dei batteri patogeni.

In Tabella 1 di EP 0547292 si osserva anche che l'attività inibitoria di rifaximina (MIC_{50} e MIC_{90}) verso i lattobacilli è uguale, se non maggiore, di quella verso i batteri patogeni quali, ad esempio, *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp, *Bacteroides bivius-disiens*. Questo dato indurrebbe a ritenere che rifaximina, somministrata per via topica vaginale, agisca in modo indiscriminato su tutta la flora vaginale, inclusi i lattobacilli.

C'era il bisogno di avere a disposizione nuove composizioni farmaceutiche a base di rifaximina, che fossero efficaci nel trattamento delle infezioni vaginali, che fornissero concentrazioni locali di rifaximina utili per il trattamento di infezioni vaginali, quali ad esempio la vaginosi batterica. Era inoltre importante che le concentrazioni di rifaximina fornite dalla composizione fossero efficaci, senza dover somministrare quantità elevate di rifaximina. Era anche importante che le composizioni non riducessero la concentrazione dei Lattobacilli, importanti per la prevenzione delle recidive della patologia vaginale, rispetto alle composizioni descritte in EP 0547294.

Considerato il colore intenso della rifaximina, era anche importante che le composizioni comprendenti rifaximina, fossero ben accettate dalle pazienti senza causare perdite colorate e che preferibilmente fossero in forma solida.

Era anche importante che la composizione farmaceutica fosse efficace nell'eradicazione della malattia e nella diminuzione del numero di recidive con ridotti tempi di trattamento e con ridotte quantità totali di rifaximina somministrata rispetto a quanto descritto in EP 0547294.

È stato inaspettatamente trovato, e sono oggetto della presente invenzione, composizioni farmaceutiche solide, in particolare in forma di compresse vaginali, comprendenti granuli di rifaximina, caratterizzati dal contenere eccipienti farmaceuticamente accettabili, scelti tra agente(i) diluente(i), legante(i) e lubrificante(i) insieme con eccipienti extragranulari, caratterizzati dal comprendere agenti legante(i), diluente(i), lubrificante(i) e disgregante(i).

Le composizioni farmaceutiche, oggetto della presente invenzione, sono caratterizzate dal liberare i granuli contenenti rifaximina in poco tempo anche in presenza di ridotte quantità di acqua quali quelle fisiologicamente presenti in vagina. I granuli, attraverso un processo di solubilizzazione nella vagina rendono la rifaximina disponibile per raggiungere le concentrazioni efficaci per il trattamento delle infezioni vaginali.

Le nuove composizioni possono essere preparate con i diversi polimorfi di rifaximina noti nell'arte e sono utili per il trattamento della vaginosi batterica e nella prevenzione delle recidive.

Inoltre, ed in particolare, le nuove composizioni hanno la proprietà di non diminuire la concentrazione dei Lattobacilli naturalmente presenti nella flora vaginale, ma anzi di favorire il loro l'aumento.

Le composizioni trovate permettono la cura delle infezioni vaginali, ed in particolare della vaginosi batterica, con tempi di trattamento e quantità totali di rifaximina somministrate, per l'ottenimento della guarigione, inferiori a quanto riportato nella letteratura a disposizione dell'esperto nell'arte e nella pratica clinica portando al raggiungimento della guarigione della malattia con quantità totali di rifaximina somministrata, circa dieci volte inferiori al brevetto EP 0547294.

Le composizioni farmaceutiche comprendenti rifaximina, oggetto della presente invenzione, sono efficaci nel trattamento delle infezioni vaginali ed in particolare della vaginosi batterica a concentrazioni inferiori a 200 mg/gg, con periodi di trattamento inferiori a una settimana, rispetto al placebo.

La presente invenzione seleziona oltre ad un dosaggio anche tempi di trattamento utili per ottenere la completa guarigione.

Le composizioni trovate risultano essere accettate, ben tollerate e prive di effetti collaterali.

Descrizione dell'invenzione

La presente invenzione descrive composizioni farmaceutiche comprendenti rifaximina in forma solida, in particolare in forma di compresse, caratterizzate da rilasciare rifaximina in modo controllato.

Le composizioni farmaceutiche oggetto della presente invenzione sono caratterizzate dal comprendere granuli e/o microgranuli di rifaximina, comprendenti eccipienti scelti tra uno o più agente(i) diluente(i), legante(i) e lubrificante(i) insieme con eccipienti extragranulari caratterizzati dal comprendere uno o più agente(i) legante(i), diluente(i), lubrificante(i) e disgregante(i).

Le composizioni farmaceutiche in forma solida, in particolare in forma di compresse permettono il rilascio dei granuli di rifaximina anche in presenza di ridotte quantità di liquido acquoso quale quello vaginale.

I granuli comprendenti rifaximina, compresi nelle composizioni in compresse, sono caratterizzati dal comprendere una quantità di rifaximina da 1 al 80%, uno o più leganti in una quantità da 0,5 al 20%, uno o più diluenti in una quantità da 30 al 90%, uno o più lubrificanti in una quantità da 0,1 a 5% rispetto al peso del granulo.

Secondo una realizzazione preferita dell'invenzione i granuli di rifaximina comprendono una quantità di rifaximina da 5 al 30%, uno o più leganti in una quantità da 1 al 10%, uno o più diluenti in una quantità da 50 al 90%, uno o più lubrificanti da 0,5 al 4%.

L'(Gli) agente(i) diluente adatto(i) alla preparazione dei granuli comprendenti rifaximina è (sono) scelto(i) dal gruppo comprendente: cellulosa, cellulosa microcristallina, idrossipropilmetilcellulosa, fosfato di calcio, amido, caolino, solfato di calcio di-idrato, carbonato di calcio, lattosio anidro o idrato, saccarosio, mannitolo, polisaccaridi, glucani, xiloglucano.

L'(Gli) agente(i) legante(i) adatto(i) alla preparazione dei granuli comprendenti rifaximina è (sono) scelto(i) dal gruppo comprendente scelto tra: amidi di mais, amido pregelatinizzato, gomma arabica, lattosio, malto destrine, polivinilpirrolidone (copovidone), saccarosio o loro miscele.

L'(Gli) agente(i) lubrificante(i) adatto(i) alla preparazione dei granuli comprendenti rifaximina è (sono) scelto(i) dal gruppo comprendente: glicerolo dibenato, stearati di calcio o magnesio, alluminio, sodio stearil fumarato, oli idrogenati, vegetali, acido palmitico, alcol, amido, oli minerali, polietilen glicoli, sodio lauril solfato, talco, gliceridi, sodio benzoato.

Secondo una realizzazione preferita dell'invenzione l'agente (o gli agenti) legante (i) viene (vengono) scelto (i) nel gruppo comprendente copovidone e amidi di mais. Più preferibilmente l'agente legante è il copovidone.

Secondo una realizzazione preferita dell'invenzione l'agente (o gli agenti) diluente viene (vengono) scelto (i) nel gruppo comprendente lattosio monoidrato o anidro, cellulosa e cellulosa macrocristallina, idrossipropilmetil cellulosa. Più preferibilmente l'agente diluente è il lattosio monoidrato o anidro.

Secondo una realizzazione preferita dell'invenzione l'agente (o gli agenti) lubrificante(i) viene (vengono) scelto (i) nel gruppo comprendente magnesio stearato e glicerolo dibenato. Più preferibilmente l'agente lubrificante è il magnesio stearato.

I granuli comprendenti rifaximina sono preparati con il processo di granulazione a secco in cui rifaximina è mescolata con gli eccipienti scelti, nelle quantità sopra riportate, e mescolati per ottenere una miscela omogenea. La miscela è poi posta in un compattatore per l'ottenimento di granuli.

I granuli comprendenti rifaximina sono poi compresi in una matrice extragranulare comprendente uno o più agenti legante(i), diluente(i), lubrificante(i) e disgregante(i) per l'ottenimento della composizione farmaceutica solida.

L'(Gli) agente(i) legante(i), l'(gli) agente(i) diluente(i) e l'(gli) agente(i) lubrificante sono scelti nel gruppo utili per la preparazione dei granuli di rifaximina.

Secondo una realizzazione preferita, l'(gli) agente(i) legante viene (vengono) scelti nel gruppo comprendente nel gruppo comprendente copovidone, amido pregelatinizzato, e amidi di mais; l'agente (o gli agenti) diluente(diluenti) viene (vengono) scelto(i) dal gruppo comprendente lattosio, cellulosa, cellulosa macrocristallina e idrossi propilmetil cellulosa; l'agente (o gli agenti) lubrificante(i) viene (vengono) scelto(i) nel gruppo comprendente magnesio stearato e glicerolo dibenato.

L'(Gli) agente(i) disgregante(i) adatto(i) alla preparazione della composizione dell'invenzione è (sono) scelto(i) dal gruppo comprendente: sodio amido glicolato, amido pregelatinizzato, crospovidone (copolimero di vinil pirrolidone), copovidone (copolimero di polivinil pirrolidone e vinilacetato), carbossimetilcellulosa sodica detta anche caramellosa, carbossimetil cellulosa reticolata detta anche croscaramellosa, silicati di metalli alcalino e alcalino terrosi.

Preferibilmente, l'agente (o gli agenti) disgregante(i) viene (vengono) scelto(i) dal gruppo comprendente, cros повідone, amido glicolato, amido pregelatinizzato, e silicati di metalli alcali.

Più preferibilmente l'agente (o gli agenti) disgregante(i) viene (vengono) scelto (i) dal gruppo comprendente, cros повідone e calcio silicato.

Secondo una realizzazione preferita dell'invenzione la composizione farmaceutica solida, preferibilmente in forma di compresse, può contenere una quantità in peso di granuli di rifaximina dal 10 al 85%, una quantità di disgregante(i) dal 2 al 20%, una quantità di diluente(i) dal 10 al 80%, una quantità di legante (i) dallo 0,5 al 5%, una quantità di lubrificante(i) dallo 0,1 al 10% rispetto al peso della composizione finita come riportato in Tabella 1.

Tabella 1

Componente	Percentuale (%) in peso
Granuli rifaximina	10-85%
Agente(i) lubrificante(i)	0,1-10%
Agente(i) legante	0,5-5%
Agente(i) diluente(i)	10-80%
Agente(i) disgregante(i)	2-20%

Secondo una realizzazione preferita dell'invenzione l'(gli) agente(i) diluente(i) extra granulare è (sono) scelto(i) nel gruppo comprendente lattosio anidro o monoidrato, amido di mais e cellulosa cristallina, l'(gli) agente(i) lubrificante extragranulare è scelto tra magnesio stearato, l'(gli) agente(i) legante è scelto tra amido pregelatinizzato e copovidone, idrossipropilmetil cellulosa; l'(gli) agente(i) disgregante extragranulare è (sono) scelto(i) tra cros повідone, amido pregelatinizzato e calcio silicato.

Secondo una realizzazione più preferita l'agente diluente è scelto nel gruppo comprendente lattosio anidro o monoidrato; l'agente legante è scelto nel gruppo comprendente copovidone e amido pregelatinizzato; l'agente lubrificante è stearato di magnesio; l'agente lubrificante è scelto nel gruppo comprendente crospovidone, calciosilicato, amido pregelatinizzato e amido glicolato.

Secondo una realizzazione più preferita la composizione in compresse è riportata in Tabella 2.

Tabella 2

Componente	Percentuale (%) in peso
Granuli rifaximina	20-60%
Magnesio stearato	0,1-10%
Copovidone	0,5-4%
Lattosio	10-80%
Crospovidone e calcio silicato	2-20%

La composizione in compresse può comprendere una ricopertura filmogena.

La composizione solida, in forma di compresse può contenere una quantità di rifaximina da 2,5 a 500 mg, preferibilmente tra 2,5 e 100 mg, più preferibilmente da 10 a 50 mg.

In aggiunta a questi agenti essenziali, la composizione, secondo l'invenzione, può facoltativamente contenere agenti bioadesivi, agenti preservanti, agenti tamponanti, agenti antisettici, agenti antibiotici e aromi naturali.

I granuli sono ottenuti con un processo di granulazione a secco, il quale permette di mantenere la forma cristallina o la forma amorfa di rifaximina di partenza senza il rischio di trasformazioni polimorfiche note in letteratura in presenza di acqua o solventi organici.

È importante che il processo per l'ottenimento della composizione mantenga la forma polimorfa scelta, in quanto è noto nell'arte che forme di polimorfi di rifaximina hanno solubilità diverse e danno assorbimenti plasmatici con differenze di almeno due ordini di grandezza.

Rifaximina compresa nelle composizioni farmaceutiche oggetto della presente invenzione è preferita essere in una forma poco solubile quando utilizzata nel trattamento della vaginosi batterica per agire localmente senza assorbimenti sistemici. Questo permette di evitare il potenziale rischio di selezione a livello sistemico di ceppi batterici resistenti agli antibiotici che può avvenire e anche a basse concentrazioni plasmatiche.

I granuli comprendenti rifaximina sono poi mescolati con la miscela comprendente gli eccipienti extragranulari, descritti in Tabella 1 e la miscela compressa in macchina comprimitrice a disposizione nell'arte, per l'ottenimento delle compresse che sono preferibilmente ricoperte con ricopertura filmogena.

I componenti extragranulari compresi nella composizione farmaceutica in forma di compresse, insieme con i granuli di rifaximina, nelle quantità descritte nella presente invenzione permettono il rilascio di rifaximina in modo controllato.

I granuli di rifaximina sono rilasciati dalle compresse anche in presenza di ridotte quantità di liquido acquoso, quali quelle fisiologicamente presenti in vagina. I granuli comprendenti rifaximina rilasciati dalla compressa nella cavità vaginale esercitano un'azione topica nella mucosa vaginale, prolungata nel tempo, essendo essa dipendente dalla dissoluzione dei granuli e non dalla disintegrazione degli stessi.

La presente invenzione descrive anche l'uso delle composizioni farmaceutiche comprendenti rifaximina per il trattamento di infezioni vaginali, in particolare vaginosi batterica.

La presente invenzione descrive anche un metodo di trattamento utile per ottenere la guarigione di vaginosi batterica e di prevenire recidive della malattia.

Le composizioni farmaceutiche, oggetto dell'invenzione non diminuiscono la concentrazione di Lattobacilli, necessari per il mantenimento dell'ecosistema vaginale e utili per la prevenzione di infezioni recidive, come riportato invece nelle composizioni note nell'arte.

Le composizioni farmaceutiche solide, in particolare in forma compresse vaginali, sono efficaci nel trattamento della vaginosi batterica a dosaggi di rifaximina giornalieri minori di 500 mg, ed in particolare minori di 200 mg e a dosaggi di rifaximina totali di trattamento, minori di 700 mg, in particolare minori di 500 mg per il raggiungimento della guarigione e per la prevenzione delle recidive, rispetto al trattamento con placebo.

In particolare, le composizioni in compresse, comprendenti rifaximina, sono efficaci nel trattamento della vaginosi batterica mediante somministrazione di quantità giornaliere minori di 500 mg, in particolare minori di 200 mg e più in particolare minori di 100 mg, per un tempo di trattamento inferiore a dieci giorni e in particolare minori di una settimana, rispetto al placebo.

Le composizioni in compresse possono essere somministrate una o più volte al giorno, preferibilmente una volta al giorno.

Le composizioni farmaceutiche descritte sono caratterizzate dall'esercitare un'azione antibatterica selettiva preferibilmente contro i batteri patogeni, piuttosto che contro i Lattobacilli.

Le composizioni in compresse comprendenti rifaximina, in quantità minori di 500 mg, in particolare minori di 200 mg e più in particolare minori di 100 mg portano alla riduzione dell'infezione vaginale secondo gli indici di Nugent e Amsel.

Un altro aspetto della presente invenzione è di fornire composizioni utili per il trattamento di infezioni vaginali e di ottenere la guarigione di pazienti affette da vaginosi batterica a fine terapia e di prevenire le recidive.

In particolare, la composizione descritta mantiene la guarigione della malattia per un periodo di tempo maggiore di 30 giorni dopo il termine della terapia avvenuta a dosaggi di somministrazione giornalieri minori di 200 mg per un periodo di somministrazione minore di una settimana.

Un altro aspetto particolare delle composizioni farmaceutiche trovate, comprendenti in particolare 100 e 25 mg rifaximina, è di essere utili nel trattamento di infezioni vaginali con tempi di trattamento minori di una settimana, e più in particolare le composizioni contenenti 25 mg di rifaximina con un periodo di trattamento di cinque giorni, sono utili per ottenere la guarigione di infezioni batteriche.

Le pazienti trattate con le composizioni comprendenti 25 mg di rifaximina, alle quali è stata somministrata una compressa una volta al giorno, per un periodo di cinque giorni, ottengono la guarigione, secondo i criteri di Amsel e Nugent in una percentuale maggiore rispetto alle pazienti trattate con placebo.

In particolare, le pazienti trattate con le composizioni comprendenti 25 mg di rifaximina per un periodo di cinque giorni, ottengono la guarigione in una percentuale maggiore di circa il 30%, rispetto a circa il 15% nelle pazienti trattate con 100 mg di rifaximina per 5 giorni, a circa il 4% nelle pazienti trattate per 2 giorni e a circa il 7% in quelle trattate con placebo.

Più in particolare, le pazienti trattate con le composizioni comprendenti 25 mg di rifaximina ottengono la guarigione, secondo il criterio di Nugent in una percentuale maggiore rispetto agli altri gruppi di trattamento; in particolare maggiore

di circa il 47%, rispetto a una percentuale di circa il 25% nelle pazienti trattate con 100 mg di rifaximina per 5 giorni, di circa il 36% nelle pazienti trattate per 2 giorni e di circa il 19% in quelle trattate con placebo.

Un altro aspetto della presente invenzione è dato dal fatto che le composizioni in compresse vaginali comprendenti rifaximina, portano ad una diminuzione degli indici di Nugent di tre punti in tutte le pazienti trattate rispetto a quelle trattate con placebo.

In particolare, la riduzione di tre punti dell'indice di Nugent è ottenuta da una percentuale maggiore del 65% nel gruppo di pazienti trattate con la composizione in compresse vaginali comprendenti 25 mg di rifaximina, per un periodo di cinque giorni; da una percentuale maggiore del 50% nel gruppo di pazienti trattate con la composizione comprendente 100 mg di rifaximina per un periodo di cinque giorni; da una percentuale maggiore del 30% nel gruppo di pazienti trattate con la composizione in compresse comprendenti 100 mg di rifaximina per due giorni, rispetto ad una percentuale di circa il 18% delle pazienti trattate con placebo.

Inoltre, ed in particolare, le composizioni in compresse vaginali, comprendenti 25 mg di rifaximina quando somministrate alle pazienti affette da vaginosi batterica, per un periodo di trattamento di cinque giorni, portano alla diminuzione di cinque punti di Nugent in circa il 48% delle pazienti trattate, di circa il 28% nelle pazienti trattate con rifaximina 100 mg per cinque giorni e di circa il 26% in quelle trattate con rifaximina 100 mg per due giorni, rispetto ad una percentuale di circa lo 0% in quelle trattate con placebo.

Inoltre, e più in particolare le composizioni in compresse vaginali, comprendenti 25 mg di rifaximina per un periodo di trattamento di cinque giorni

portano alla diminuzione di 8-10 punti di Nugent in una percentuale maggiore rispetto agli altri gruppi di trattamento.

Le composizioni farmaceutiche descritte grazie alla combinazione degli eccipienti granulari ed extragranulari scelti e al processo per la loro preparazione hanno proprietà di provvedere un rilascio controllato di rifaximina nella vagina. Sono utili ed efficaci nel trattamento di pazienti affette da infezioni vaginali, in particolare vaginosi batteriche, a dosaggi giornalieri minori di 200 mg, ed in particolare a dosaggi compresi tra 100 e 25 mg di rifaximina con periodi di trattamento inferiori a una settimana.

Un altro aspetto delle composizioni descritte, comprendenti 25 mg di rifaximina in compresse vaginali, è di essere utili per il trattamento di pazienti affette da infezioni vaginali, ed in particolare vaginosi batteriche severe, caratterizzate dal fatto di avere un alto indice di Nugent e Amsel.

Un altro aspetto dell'invenzione è che le composizioni comprendenti rifaximina a concentrazioni minori di 200 mg, ed in particolare di 100 mg e 25 mg, sono efficaci nella prevenzione della recidiva di vaginosi batterica.

Un altro aspetto dell'invenzione sono composizioni farmaceutiche comprendenti rifaximina caratterizzate da essere ben tollerate e sicure quando somministrate e, in particolare di dare un ridotto assorbimento sistemico evidenziato dalla misura di livelli trascurabili di rifaximina nel plasma.

Il termine "rifaximina" è inteso in senso largo e include non solo "rifaximina", ma anche i suoi sali accettabili farmaceuticamente, solvati, idrati, enantiomeri derivati, polimorfi e complessi farmaceuticamente accettabili, senza nessuna limitazione.

La composizione farmaceutica solida, in forma di compresse, rilascia i granuli contenenti rifaximina sulla mucosa vaginale anche in presenza di ridotte quantità di liquido vaginale e, sulla base dei risultati di uno studio clinico della presente invenzione, risulta che i detti granuli sono in grado di rilasciare quantità di rifaximina tali da essere efficace in pazienti affette da vaginosi batterica anche con trattamenti che prevedono bassi dosaggi di rifaximina e tempi brevi di trattamento, non superiori a dieci e in particolare minori di cinque giorni e di prevenire la ricorrenza delle infezioni recidive dopo quattro settimane dalla fine del trattamento.

Inoltre, e in particolar modo importante, la composizione in compresse comprendente quantità di rifaximina minori di 200 mg ed in particolare minore di 100 mg aumenta e mantiene la concentrazione dei Lattobacilli, alta anche dopo il termine della terapia, rispetto al placebo.

L'Esempio 1 descrive l'ottenimento dei granuli comprendenti rifaximina e la preparazione delle compresse comprendenti una quantità di rifaximina in granuli corrispondente a 25 mg insieme con eccipienti extragranulari. Le compresse ottenute hanno una durezza, determinata secondo le condizioni descritte in nella Farmacopea Europea Ed. 7.0, cap. 2.9.8, rif. 01/2008:20908, maggiore di 5Kp e sono caratterizzate per avere un tempo di disaggregazione, secondo le condizioni descritte nella Farmacopea Europea Ed. 7.0, cap. 2.9.2 rif. 01/2008:20902, di circa un minuto.

L'Esempio 2 descrive la preparazione di compresse comprendenti 100 mg di rifaximina in granuli ed eccipienti extragranulari, a dimostrazione della flessibilità del processo per la produzione di compresse, comprendenti quantità variabili di rifaximina, senza aumentare il peso della compressa finita.

L'Esempio 3 descrive la preparazione di compresse comprendenti rifaximina in cui i granuli, rispetto a quelli descritti in Esempio 1, sono preparati con leganti diversi e poi sono mescolati con eccipienti extragranulari.

In particolare, sono descritte composizioni in cui il disgregante è scelto tra calcio silicato, crospovidone, sodio amido glicolato, amido pregelatinizzato che è un legante/disgregante; il legante copovidone è omesso o sostituito con idrossipropilmetilcellulosa, il diluente il lattosio monoidrato è sostituito dal lattosio anidro.

Questo esempio dimostra che le compresse senza il legante presentano problemi di aggregazione dei componenti e disgreganti, o miscele di disgreganti diverse, portano a tempi di disaggregazione che vanno da circa un minuto a tempi di disaggregazione maggiori di cinque minuti e che gli eccipienti extragranulari e granulari e le loro quantità sono importanti per fornire le inaspettate caratteristiche alle compresse oggetto della presente invenzione.

L'Esempio 4 descrive l'analisi di disaggregazione delle compresse comprendenti rifaximina secondo le preparazioni Composizioni 1-8, descritte negli Esempi 1 e 2. Il tempo varia da circa 1 minuto a circa 10 minuti a seconda dei componenti compresi nelle composizioni.

L'Esempio 5 descrive preparazioni di ovuli lipofili comprendenti quantità di rifaximina da 50 a 200 mg in presenza di semigliceridi, tensioattivi e xyloglucano in diverse quantità. In tutte le composizioni la quantità di rifaximina rilasciata dopo circa due ore varia dal 15% al 25% rispetto alla quantità di rifaximina compresa.

L'Esempio 6 descrive la preparazione di ovuli idrofili comprendenti quantità di rifaximina da 25 a 100 mg in presenza di 2-(2-etossietossi)etanolo, Transcutol, glicerina, polietilenglicole, (PEG) e xiloglucano. Queste composizioni sono

caratterizzate da un rapido rilascio della rifaximina in cui una quantità maggiore del 70% di rifaximina è rilasciata dopo 20 minuti.

L'Esempio 7 descrive il rilascio di composizioni in compresse e ovuli vaginali preparati come negli esempi 1-5, in condizioni di volume a disposizione e di temperatura simili a quelle fisiologiche della vagina. Le diverse composizioni comprendenti da 25 a 100 mg di rifaximina sono poste a confronto per valutare il rilascio di rifaximina in un ambiente termostato a 37°C e la quantità di rifaximina rilasciata in 10 ml di soluzione acquosa, è poi determinata spettrofotometricamente. Risulta dall'esperimento descritto che le compresse comprendenti 100 mg di rifaximina, preparate come descritto in Esempio 1 e aventi la composizione descritta in Esempio 2, rilasciano dopo un'ora una quantità di rifaximina minore dei circa 0,5 mg, gli ovuli idrofili, comprendenti 100 mg di rifaximina, rilasciano dopo un ora circa 8,50 mg di rifaximina, gli ovuli idrofili comprendenti 25 mg di rifaximina, rilasciano circa 7 mg di rifaximina e gli ovuli lipofili, comprendenti 100 mg di rifaximina rilasciano in un ora circa 4 mg di rifaximina.

Con le composizioni farmaceutiche in compresse, descritte nella presente invenzione è stato effettuato uno studio di biodisponibilità in cui compresse e ovuli contenenti una quantità di rifaximina pari a 12,5 mg preparate con un processo identico a quello descritto negli Esempi 1 e 4 sono state somministrate a conigli New Zealand White Specific Pathogen free (SPF) femmine, nullipare, non-gravide. Durante il trattamento non sono stati osservati segni clinici locali, né reazione al trattamento, né variazione nel peso corporeo negli animali trattati in confronto al gruppo controllo.

La concentrazione di rifaximina nel plasma è stata determinata con un metodo validato LC-MS/MS avente una sensibilità di 0,5 ng/ml.

In Tabella 15 dell'Esempio 8, sono riportati i parametri farmacocinetici di biodisponibilità di rifaximina nel coniglio dopo somministrazione di compresse vaginali e di ovuli e solo in alcuni casi poco al di sopra del limite di quantificazione. Il valore medio della massima concentrazione plasmatica (C_{max}) per gli ovuli è circa quattro volte più alto del valore di C_{max} delle compresse, mentre il valore dell'area sottesa dalla curva della concentrazione plasmatica in funzione del tempo ($AUC_{0-t_{last}}$) degli ovuli è circa 12 volte più alto rispetto a quella delle compresse.

Questi risultati dimostrano che a parità di dosaggio somministrato, le compresse vaginali danno un minor assorbimento plasmatico rispetto agli ovuli. Questo risultato è in accordo con i profili di dissoluzione mostrati in Esempio 7.

L'Esempio 9 descrive la determinazione dell'efficacia di composizioni di rifaximina in ovuli e compresse in un modello animale in cui l'infezione vaginale è stata indotta mediante inoculazione di *Gardnerella vaginalis* isolata da donne affette da vaginosi batterica. Conigli New Zealand di peso tra 2 e 3 Kg sono stati infettati con una soluzione salina contenente una quantità di *Gardnerella vaginalis* maggiore di 10^5 e per ottenere un'infezione persistente, l'inoculo è stato ripetuto due o tre volte. Dopo sette giorni dall'ultima inoculazione gli animali sono stati trattati con le composizioni di rifaximina in compresse e ovuli contenenti quantità di rifaximina da 1,5 a 12,5 mg, la cui preparazione è avvenuta secondo l'Esempio 1 ed Esempio 4 in cui il rapporto degli eccipienti è stato ridotto proporzionalmente per l'ottenimento delle composizioni con le diverse quantità di rifaximina. I dosaggi di rifaximina da 1,5 mg a 12,5 mg corrispondono rispettivamente a circa alla dose di circa 12,5 mg e 100 mg nella donna, calcolata considerando l'area della superficie corporea.

Le composizioni non hanno fatto registrare alcun evento avverso negli animali e hanno dimostrato, come riportato in tabelle 16 e 17, che i dosaggi di

rifaximina sperimentati sia in compresse che in ovuli, portano ad una completa eradicazione dell'infezione dopo sette giorni dal termine del trattamento.

Entrambe le composizioni in ovuli e compresse sono risultate essere efficaci e ben tollerate nell'animale, tuttavia le compresse, poiché hanno livelli di assorbimento sistemico inferiori rispetto agli ovuli come descritto in Esempio 8, sono da considerarsi come una preparazione farmaceutica più idonea per l'uso in pazienti affette da vaginosi batterica.

Lo studio clinico descritto in Esempio 12 è stato effettuato con compresse comprendenti 25 e 100 mg di rifaximina, preparate come descritto negli Esempi 1 e 2.

Gli Esempi 10 e 11 descrivono l'assorbimento sistemico e la tollerabilità di rifaximina in compresse in uno studio clinico su volontarie sane. L'esempio dimostra che le concentrazioni plasmatiche di rifaximina dopo somministrazione per via intravaginale di una compressa contenente 100 mg di rifaximina, sono trascurabili essendo sempre sotto il limite di quantizzazione strumentale di 0,5 ng/ml.

L'efficacia della composizione in compresse nel trattamento della vaginosi batterica è stata determinata in uno studio clinico in 114 donne non gravide con un'età compresa tra 18 e i 50 anni e riportata in Esempio 12.

Gli obiettivi primari dello studio sono stati la valutazione della guarigione dalla vaginosi batterica secondo entrambi i criteri di Amsel e Nugent alla prima visita di controllo (V3) dopo 7-10 giorni dal termine della terapia. Gli obiettivi secondari dello studio sono stati la guarigione dalla malattia valutata con i criteri di Amsel e di Nugent, singolarmente, dopo 7-10 giorni dal termine della terapia, il mantenimento della guarigione alla seconda visita di controllo dopo circa un mese dalla fine della terapia (V4) e la valutazione della composizione del microbiota vaginale mediante le tecniche molecolari, real-time PCR- e PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). La real time PCR- è una tecnica quantitativa in cui ciascun campione di DNA viene amplificato con differenti primers genere e/o specie specifici che hanno come target il gene batterico 16S rRNA o la regione 16S-23S rRNA; in particolare sono state usate sonde specifiche per il genere *Lactobacillus*, per *Gardnerella vaginalis*, per *Atopobium*, per *Prevotella* e per *Veillonella*, in quanto rappresentano i principali gruppi batterici che subiscono delle modifiche nei casi di vaginosi batterica. La PCR-DGGE è invece una tecnica qualitativa per cui, nel presente studio, l'amplificazione è stata effettuata con primers universali per eubatteri.

In particolare, le pazienti affette da vaginosi batterica e non affette da infezioni concomitanti vaginali virali, protozoarie e fungine, sono state assegnate ad uno dei seguenti gruppi di trattamento, utilizzando una procedura di randomizzazione centralizzata ed un disegno sperimentale in doppio cieco:

Gruppo A: pazienti che hanno ricevuto una compressa di rifaximina vaginale contenente 100 mg di rifaximina, preparata secondo l'Esempio 2, una volta al giorno per 5 giorni, alla sera;

Gruppo B: pazienti che hanno ricevuto una compressa di rifaximina vaginale contenente 25 mg di rifaximina, preparata secondo l'Esempio 1, una volta al giorno per 5 giorni, alla sera;

Gruppo C: pazienti che hanno ricevuto una compressa di rifaximina vaginale contenente 100 mg di rifaximina, preparata secondo l'Esempio 2, una volta al giorno per due giorni, alla sera, più una compressa di placebo compresse vaginali, una volta al giorno per i rimanenti tre giorni, alla sera;

Gruppo D: pazienti che hanno ricevuto una compressa di placebo preparata come in Esempio 1 in cui la quantità di rifaximina è stata sostituita con lattosio idrato, una volta al giorno per 5 giorni, alla sera.

La diagnosi di vaginosi batterica si è basata sui criteri di Amsel (almeno 3 su 4 criteri positivi) e sull'indice di Nugent (indice uguale o maggiore di 4). Lo studio ha previsto una visita di screening (V1), seguita da una visita di randomizzazione dopo 7 giorni (V2), da una prima visita di controllo dopo 7-10 giorni dal termine della terapia (V3) e da una seconda ed ultima visita di controllo dopo 28-35 giorni dal termine della terapia (V4). Durante la visita V3 è stato valutato il raggiungimento dell'obiettivo primario, e alla visita V4 è stato valutato il raggiungimento degli obiettivi secondari.

In Tabella 18 sono riportati i valori percentuali delle pazienti che hanno avuto la guarigione dalla malattia dopo trattamento con la composizione preparata come in Esempio 1 ed Esempio 2, rispetto alla percentuale trattata con placebo. Si osserva che tutti i gruppi di pazienti trattate con le composizioni in compresse di rifaximina hanno ottenuto la guarigione in una percentuale maggiore rispetto a quelle trattate con placebo.

Le pazienti appartenenti al gruppo trattato con una compressa contenente 25 mg di rifaximina preparata come in Esempio 1, per un periodo di 5 giorni, hanno raggiunto la guarigione dalla malattia in una percentuale maggiore rispetto agli altri gruppi.

Più in particolare, le pazienti appartenenti al gruppo trattato con una compressa contenente 25 mg di rifaximina (Gruppo B) preparata come in Esempio 1, per un periodo di 5 giorni, hanno raggiunto la guarigione dalla malattia in una percentuale maggiore del 40%; quelle trattate con una compressa di rifaximina

comprendente 100 mg di rifaximina per 2 giorni (Gruppo C), hanno raggiunto la guarigione in una percentuale maggiore del 30%; quelle trattate con una compressa comprendente 100 mg di rifaximina per 5 giorni (Gruppo A) hanno raggiunto la guarigione in una percentuale maggiore del 20%. Il gruppo trattato con placebo (Gruppo D) ha raggiunto la guarigione solo in una percentuale di circa il 19%.

In Tabella 19 sono riportati i valori percentuali delle pazienti che hanno ottenuto la guarigione dalla malattia, calcolata solo secondo il criterio di Amsel alla visita dopo 7-10 giorni dal termine della terapia, in cui è confermato che il gruppo che ha ricevuto la composizione comprendente 25 mg di rifaximina per 5 giorni ha ottenuto la guarigione in una percentuale maggiore rispetto al placebo.

Secondo i criteri di Nugent la guarigione dalla malattia raggiunge una percentuale più alta nelle pazienti del gruppo trattato con la composizione comprendente 25 mg di rifaximina per 5 giorni rispetto agli altri gruppi e al placebo come riportato in Tabella 20.

In questo esempio che descrive lo studio clinico, le pazienti sono state inoltre stratificate in “paziente con recidiva di vaginosi batterica” e “paziente con primo episodio di vaginosi batterica”. Le percentuali di guarigione da malattia in tutti i gruppi trattati con rifaximina sono risultate essere più elevate nelle pazienti che presentavano una recidiva di vaginosi batterica. Inoltre, il gruppo trattato con rifaximina 25 mg per 5 giorni ha presentato una più elevata percentuale di guarigione anche nei soggetti al primo episodio di malattia.

Le percentuali di guarigione da malattia, valutata secondo i criteri di Amsel e di Nugent, in tutti i gruppi trattati con rifaximina sono risultate essere più elevate nelle pazienti che presentavano una recidiva di vaginosi batterica rispetto alle pazienti con primo episodio di vaginosi batterica. Inoltre, il gruppo trattato con rifaximina 25

mg per 5 giorni ha presentato una più elevata percentuale di guarigione anche nei soggetti al primo episodio di malattia, come riportato in Tabella 23.

Le pazienti trattate nello studio clinico con 25 e 100 mg di rifaximina, in compresse vaginali, non hanno segnalato eventi avversi particolari e non si sono manifestati casi di candidiasi vulvo-vaginale correlati a rifaximina durante il trattamento in nessuno dei gruppi trattati.

Lo studio clinico riportato ha dimostrato che il trattamento di pazienti affette da vaginosi batterica, con compresse vaginali a rilascio controllato preparate come in Esempio 1 e comprendenti 25 mg di rifaximina, per un periodo di 5 giorni, ha una efficacia maggiore nella guarigione dalla malattia.

Gli Esempi 13-16 descrivono l'ottenimento della guarigione secondo i criteri di Nugent nei quattro gruppi delle pazienti che sono state arruolate nello studio clinico. In Esempio 17 è riportato uno studio microbiologico effettuato sui lavaggi vaginali delle pazienti trattate con rifaximina 100 e 25 mg per 5 giorni (Gruppo A e B) e 100 mg per 2 giorni (Gruppo C), utilizzando tecniche molecolari, real-time PCR- e PCR-DGGE, per la determinazione della composizione del microbiota vaginale.

In Tabella 28 dell'Esempio 17, sono riportati i risultati ottenuti dalla real-time PCR espressi come ng DNA target/ μ g DNA genomico totale, per specie microbica, analizzate per gruppo di pazienti che hanno partecipato allo studio clinico, alla visita V3 e V4, in confronto ai dati ottenuti dalle analisi prima del trattamento.

I risultati dell'analisi real-time PCR evidenziano un aumento dei Lattobacilli in tutti i gruppi trattati con rifaximina, mentre le concentrazioni di batteri patogeni come la *Gardnerella vaginalis*, *Atopopium* e *Prevotella* risultano diminuite in tutti i gruppi trattati con rifaximina, rispetto al placebo, a dimostrazione dell'efficacia della composizione in compresse.

In particolare, le pazienti trattate con rifaximina in compresse preparate come in Esempio 1 e comprendenti 25 mg di rifaximina per un periodo di 5 giorni, alla visita V3, mostrano un aumento del numero dei Lattobacilli, rispetto agli altri gruppi di trattamento.

Inoltre il trattamento con compresse a rilascio controllato comprendenti 25 mg rifaximina per un tempo di trattamento di cinque giorni è risultato il più efficace sia per la sua attività contro i batteri anaerobi sia nel ripristino dei Lattobacilli, favorendo quindi il microambiente vaginale fisiologico.

L'analisi dei campioni vaginali alla visita V4 ha confermato i dati ottenuti alla visita a fine trattamento, V3 per le pazienti trattate con la composizione in compresse vaginali contenenti 25 mg di rifaximina preparate come in Esempio 1, per un tempo di trattamento di cinque giorni, in quanto si è mantenuto l'andamento di crescita dei Lattobacilli, mentre i batteri patogeni sono risultati ulteriormente diminuiti.

Anche il gruppo di pazienti trattate con la composizione in compresse comprendenti 100 mg rifaximina per 5 giorni alla visita V4 ha mantenuto l'andamento osservato alla terza visita dopo 7-10 giorni dal termine della terapia. I risultati ottenuti dalla metodica real-time PCR sono stati confermati dai dati della PCR-DGGE, e riportati in Esempio 18, in cui è dimostrata l'efficacia del trattamento con rifaximina nel modulare la composizione del microbiota vaginale. Anche con questa tecnica il dosaggio di rifaximina più efficace nel modulare il microbiota vaginale è quello ottenuto con il trattamento in compresse contenenti 25 mg di rifaximina per 5 giorni.

L'Esempio 18 descrive il sorprendente e inaspettato risultato dato dalla composizioni in compresse comprendenti rifaximina, descritte nella presente invenzione e i risultati delle concentrazioni del microbiota vaginale alla visita V4 sono riportate in Tabella 29. La nuova composizione in compresse vaginali, comprendente rifaximina, ai dosaggi di trattamento di 100 mg /5gg, 25 mg /5gg e 100 mg/2gg, sono efficaci nel mantenere basse le concentrazioni dei batteri patogeni e aumentano la concentrazione dei Lattobacilli rispetto al placebo.

In modo particolare il gruppo di trattamento A, che ha ricevuto una compressa comprendente rifaximina la dosaggio di 100 mg per cinque giorni mostra un aumento della concentrazione di Lattobacilli di circa venti volte; il gruppo B che ha ricevuto una compressa comprendente rifaximina la dosaggio di 25 mg per cinque giorni mostra un aumento della concentrazione di Lattobacilli di circa quaranta volte e il gruppo di trattamento C, che ha ricevuto una compressa comprendente rifaximina la dosaggio di 100 mg per due giorni mostra un aumento della concentrazione di Lattobacilli di circa otto volte.

La nuova composizione in compresse vaginali è utile per ottenere la guarigione dell'infezione vaginale, ed in particolare la composizione comprendente 25 mg di rifaximina somministrata per un periodo di cinque giorni mantiene dopo un periodo di circa un mese dal termine del trattamento, una bassa concentrazione dei batteri patogeni e porta ad aumento della concentrazione di Lattobacilli nella vagina.

L'Esempio 19 descrive la determinazione dei profili DGGE delle donne trattate con rifaximina, in cui risulta un minor numero di bande, indice della presenza di un minor numero di specie patogene, rispetto ai profili iniziali.

In Tabella 30 sono riportate le percentuali delle donne con profili che "clusterizzano" assieme, in cui è confermata una maggior intra-variabilità nelle donne

trattate con rifaximina rispetto a quelle trattate con placebo, ed in particolare si osserva che il trattamento con compresse comprendenti 25 mg di rifaximina, per un periodo di cinque giorni, esercita un impatto più significativo sul microbiota vaginale, portando ad un valore percentuale minore rispetto agli altri gruppi trattati.

Per valutare l'azione farmacologica delle preparazioni di rifaximina in esame sono stati confrontati i diversi gruppi di trattamento attraverso il cosiddetto "indice di similarità, anche noto in inglese con il termine "Similarity Indexes (SI)".

Nella Tabella 31 sono riportati i valori medi di SI (Similarity Index), che confermano come il trattamento con rifaximina ripristini un microambiente vaginale meno complesso e più fisiologico.

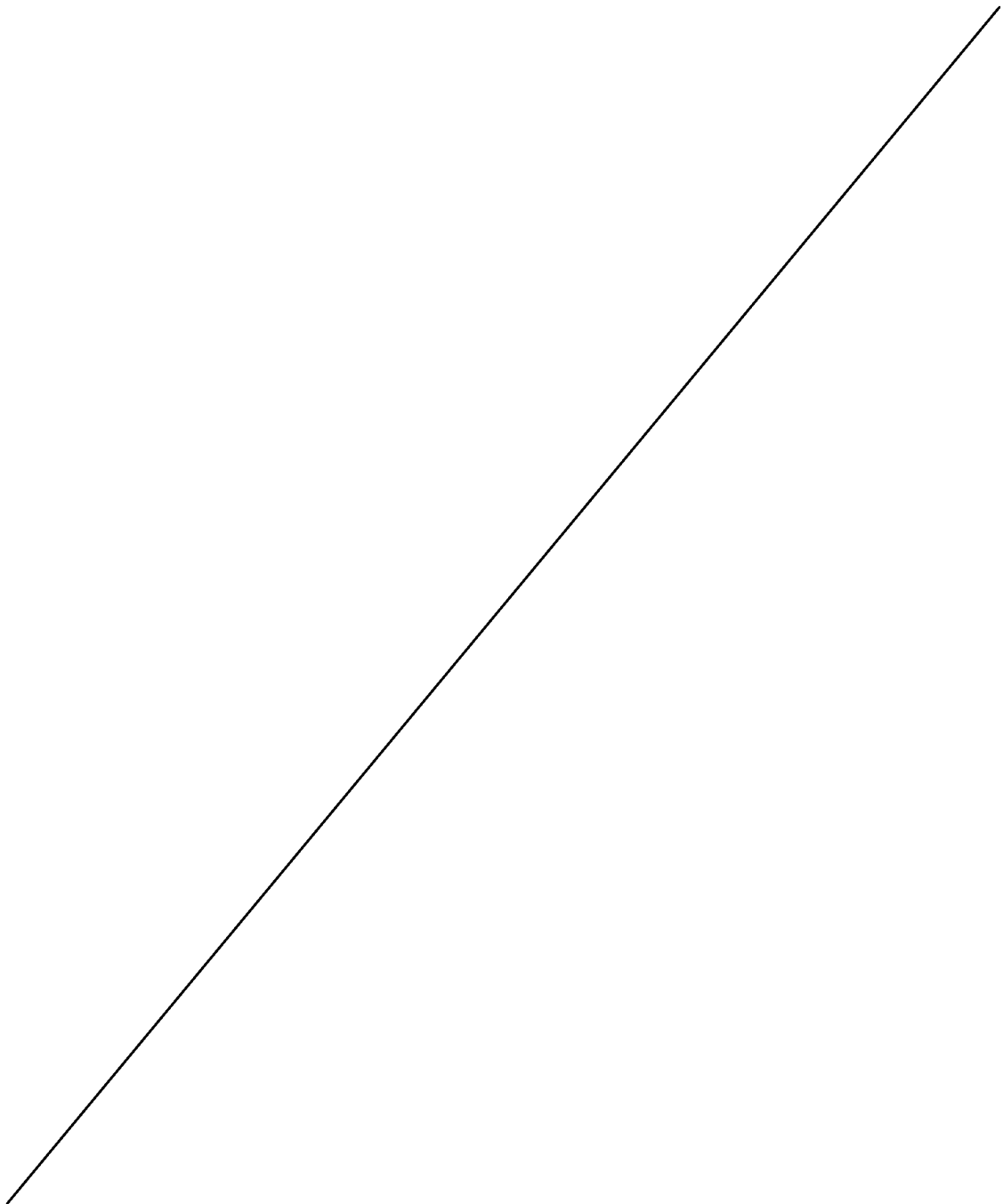
Un altro criterio adottato di valutazione dei campioni è il cosiddetto "indice di ricchezza", noto in inglese con il termine "Richness Index (RI)"; questo criterio, che si basa sulle bande di ciascun profilo DGGE, dà una misura della complessità della popolazione batterica, che è un segno di malattia per l'insorgenza di nuove specie patogene. In Tabella 32 sono riportati i valori medi di RI, misurati alle visite V1 e V3.

I risultati della Tabella 32 mostrano che i profili del microbiota vaginale diventano meno complessi nei gruppi trattati con le preparazioni di rifaximina quando sono confrontati con il gruppo trattato con placebo.

La presente invenzione mette a disposizione composizioni farmaceutiche in compresse a rilascio controllato, comprendenti rifaximina, utili per il trattamento di vaginosi batteriche, con bassi o trascurabili assorbimenti sistemici, in grado di rilasciare rifaximina anche in presenza di quantità trascurabili di acqua. In particolare la nuova composizione agisce selettivamente sui batteri patogeni, mantenendo e anzi favorendo l'aumento dei lattobacilli presenti nella flora vaginale.

Sono riportati alcuni esempi relativi alla preparazione delle compresse vaginali comprendenti differenti quantità di rifaximina ed eccipienti, i processi per la loro preparazione e gli studi in vivo sull'animale e su donne affette da infezioni vaginali.

Questi esempi non devono essere considerati limitanti dell'invenzione stessa.



ESEMPIO 1

Preparazione di compresse vaginali comprendenti rifaximina:

Composizione 1

Composizioni solide comprendenti 25 mg di rifaximina sono preparate con un processo che comprende i seguenti stadi:

- a) Formazione dei granuli comprendenti rifaximina e miscelazione dei granuli in una matrice comprendente un super disgregante;
- b) Compattazione dei granuli e ottenimento delle compresse;
- c) Ricopertura con filmogeno.

Una quantità di rifaximina corrispondente a 375 g è mescolata con gli eccipienti per la preparazione del granulato come riportato in Tabella 3.

Gli eccipienti, copovidone, lattosio idrato idrossipropil metilcellulosa e lattosio idrato sono previamente setacciati in setaccio con maglie di 1,0 mm. Alla miscela è poi aggiunto magnesio stearato, previamente setacciato con maglie da 0,5 mm, nelle quantità riportate in Tabella 3.

Tabella 3

Componente	Quantità componenti granulo (g)	% (p/p)
Rifaximina	375 g	11,1
Copovidone (Kollidon VA 64)	84,4 g	2,5
Lattosio idrato (Tablettose 80)	2881,8 g	85,4
Magnesio Stearato	33,8 g	1,0
Peso totale	3375 g	

I composti sono posti in un miscelatore e mescolati per 10 minuti alla velocità di 15 rpm.

La miscela è poi posta in un compattatore rotante, applicando una pressione di 75 bar per l'ottenimento del granulo.

Il granulato ottenuto è miscelato con calcio silicato (Rxcipient FM1000), crospovidone (Kollidon CL), lattosio idrato (Tablettose 80) e copovidone (Kollidon VA64) nelle quantità riportate in Tabella 4, previamente setacciati in setaccio con maglie da 1 mm utilizzando un apparato tipo BIN da 80 litri (Bin) per 20 minuti a 15 rpm. È poi aggiunto magnesio stearato, previamente setacciato su maglie da 0,5 mm, nella quantità riportata in Tabella 2 e la miscela finale è agitata per tre minuti a 10 rpm.

Tabella 4

Componenti	Quantità componenti (g)	% (p/p)
Granulato Rifaximina	3375 g granulato 1	18,75% (2,1% rifaximina)
Calcio silicato (Rxcipient FM1000)	2250 g	12,5%
Crospovidone (Kollidon CL)	540 g	3,0%
Lattosio idrato (Tablettose 80)	11390,5 g	63,3%
Copovidone (Kollidon VA64)	253,2 g	1,4%
Magnesio Stearato	191,2 g	1,1%
Peso totale	18000 g	

La miscela ottenuta dallo stadio a) è poi compressa in una macchina comprimitrice per l'ottenimento delle compresse di dimensioni 22,8 x 10,15 mm.

Le compresse sono ricoperte da un rivestimento filmogeno. Le compresse, preriscaldate a 45° C sono poste in un contenitore d'acciaio in cui è spruzzata una soluzione filmogena, costituita da 0,22 kg di Opadry II Pink disperso in 2,88 kg di

acqua. Opadry II Pink è una miscela di polveri costituita da titanio biossido, talco, ossido di ferro rosso, ossido di ferro giallo, alcool polivinilico e polietilenglicole.

La dispersione filmogena è spruzzata sulle compresse fino ad ottenere un peso medio delle compresse corrispondente a 1248 mg $\pm$ 5% (1185,6-1310,4 mg).

Durante la fase di spruzzatura vi è contemporaneamente una fase di essiccamento delle compresse. Dopo il raggiungimento del peso desiderato, la fase di spruzzatura viene bloccata e si continua con la fase di essiccamento, controllando il contenuto di acqua delle compresse fino ad ottenere un contenuto in acqua (Karl Fisher), minore o uguale al 5%.

Le compresse sono poi conservate in contenitori idonei a preservare dall'umidità, tipo fogli costituiti da 3 strati in PVC/PE/PVDC di colore bianco rivestiti da alluminio su cui è spalmato uno strato in PVDC. La composizione unitaria (Composizione 1) delle compresse ottenute è riportata in Tabella 5.

Tabella 5

Componente	Composizione 1	% (p/p)
Rifaximina	25 mg	2,0
Stearato di magnesio	15 mg	1,2
Copovidone (Kollidon VA 64)	22,5 mg	1,8
Crospovidone (Kollidon CL)	36 mg	2,9
Calcio silicato o (RxCipient FM 1000)	150 mg	12,0
Lattosio monoidrato (Tablettose 80)	951,5 mg	76,2
Ricopertura filmogena (Opadry II pink 85F34503)	48 mg	3,8
Peso Totale	1248 mg	

Le compresse ottenute hanno un peso medio tra 1185,6-1310,4 mg e una durezza di 14,75 Kp.

ESEMPIO 2

Preparazione compresse vaginali comprendenti 100 mg di rifaximina

Le compresse sono preparate come descritto in Esempio 1 e in Tabella 6 è riportata la composizione unitaria delle compresse comprendenti 100 mg di rifaximina.

Le compresse sono state ottenute a partire da un granulato che ha la stessa composizione del granulato riportato in Esempio 1, Tabella 3, a cui sono stati miscelati gli eccipienti prima della successiva compressione, per ottenerla composizione unitaria riportata in Tabella 6.

Tabella 6

Componente	Composizione 2	% p/p
Rifaximina	100 mg	8,0
Magnesio stearato	15 mg	1,2
Copovidone (Kollidon VA 64)	22,5 mg	1,8
Crospovidone (Kollidon CL)	36 mg	2,9
Calcio silicato (RxCipient FM 1000)	150 mg	12,0
Lattosio monoidrato (Tablettose 80)	876,5 mg	70,2
Ricopertura filmogena (Opadry II pink 85F34503)	48 mg	3,8
Peso Totale	1248 mg	

ESEMPIO 3

Preparazioni in compresse vaginali (Composizioni 3-8)

Le composizioni 3-8, comprendenti 25 mg, sono preparate con un processo come in Esempio 1.

La composizione dei granuli comprendenti rifaximina, agente legante, diluente e lubrificante è riportata in Tabella 7.

Tabella 7

Componente	Granulo A (mg)	Granulo B (mg)	Granulo C (mg)
Rifaximina	25,00	25,00	25,00
Magnesio Stearato	2,25	2,25	2,25
Copovidone (Kollidon VA 64)	5,63	-	-
Idrossipropilmetilcellulosa (Pharmacoat 606)		-	4,5
Lattosio monoidrato (Tablettose 80)	192,12	197,75	197,75

I granuli comprendenti rifaximina, aventi le composizioni descritte in Tabella 7, Composizioni A, B, C sono mescolati con gli eccipienti extragranulari come descritto in Esempio 1.

Le composizioni 3-8 sono riportate in Tabella 8.

Tabella 8

Componente	Comp. 3 (mg)	Comp. 4 (mg)	Comp. 5 (mg)	Comp. 6 (mg)	Comp. 7 (mg)	Comp. 8 (mg)
Granulato	Granulato A (225 mg)	Granulato A (225 mg)	Granulato A (225 mg)	Granulato A (225 mg)	Granulato B (225 mg)	Granulato C (225 mg)
Magnesio Stearato	12,75	12,75	12,75	12,75	12,75	12,75 mg
Copovidone (Kollidon VA)	16,88	16,88	16,88	16,88	-	-
Crospovidone (Kollidon CL)	60,00	-	36,00	36,00	36,00	36,00 mg
Calcio silicato	-	-	-	-	150,00	150,00
Sodio amido glicolato	-	96,00	24,00	-	-	-
Amido pregelatinizzato	-	-	-	150,00	-	-
Idrossipropil- metilcellulosa					-	16,88 mg
Lattosio Monoidrato	885,37	849,37	885,37	759,37	776,25	759,37 mg
Rivestimento filmogeno	30,8 -43,5	30,8 -43,5	30,8 -43,5	30,8 -43,5	30,8 -43,5	30,8 -43,5

Comp.= Composizione

ESEMPIO 4

Determinazione del tempo di disaggregazione delle compresse comprendenti rifaximina, Composizioni 1-8

Sono stati determinati i tempi di disaggregazione delle compresse aventi composizione 1-8 preparate secondo gli Esempi 1, 2 e 3, come descritto in Farmacopea Europea 7.0 2.9.2, rif 01/2008:20902.

Le compresse aventi Composizione 1-8 sono poste su una rete in un bagno d'acqua termostato a 37°C, permettendo alla parte inferiore della compressa venga a contatto con l'acqua.

La disaggregazione della compressa è valutata sia visivamente sia, se necessario, tramite una bacchetta di vetro per verificarne la perdita di consistenza. Le analisi sono ripetute su sei compresse e calcolato il tempo medio.

I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 9.

Tabella 9

	Comp. 1	Comp. 2	Comp. 3	Comp. 4	Comp. 5	Comp. 6	Comp. 7	Comp. 8
Tempo di disaggregazione	1'40"	1'35"	1'50"	5'00"	2'30"	5'30"	1'45"	5'30"

ESEMPIO 5

Preparazione di ovuli lipofili contenenti rifaximina

Sono preparati ovuli contenenti 50 mg e 200 mg di rifaximina in presenza di semigliceridi con tensioattivo (Suppocire BS2X) in presenza e non di xiloglucano. Le composizioni hanno le quantità riportate in Tabella 10.

Gli ovuli sono preparati fondendo i semigliceridi a 40°C e successivamente disperdendo gli altri componenti nella massa fusa del trigliceride. La massa fusa viene poi posta negli appositi stampi e lasciata raffreddare per l'ottenimento degli ovuli.

Tabella 10

Componente	OV-LIP. 1 (mg)	OV-LIP. 2 (mg)	OV-LIP. 3 (mg)	OV-LIP. 4 (mg)	OV-LIP. 5 (mg)
Rifaximina	200	200	50	50	100
Xiloglucano	-	30	-	30	-
Suppocire BS2X (semigliceridi)	2800	2770	2950	2720	2900

Un ovulo di ogni composizione OV-LIP. 1-5, riportate in Tabella 10 sono posti in un cilindro contenente 900 ml di acqua a 37°C in agitazione e la quantità di rifaximina rilasciata nel tempo è determinata con metodo spettrofotometrico è riportata in Tabella 11.

L'esperimento è ripetuto in sei diversi vessel e determinato la media dei valori ottenuti.

Tabella 11

Tempo (min)	Valori di dissoluzione (µg/ml)				
	OV-LIP. 1	OV-LIP. 2	OV-LIP. 3	OV-LIP. 4	OV-LIP. 5
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
5	0,8	0,6	0,8	1,8	n.d
10	1,6	2,1	1,2	1,4	0,20
20	3,4	1,9	2,8	2,0	n.d
30	4,1	3,0	3,6	3,3	0,28
40	4,3	3,4	3,7	2,7	0,35
50	4,8	3,8	4,3	2,8	n.d
60	5,8	4,8	4,8	3,7	0,37
70	7,2	5,0	5,9	5,2	n.d
80	8,4	6,9	6,5	6,5	n.d
90	9,4	7,9	7,0	7,2	n.d
100	10,2	11,8	7,7	8,0	n.d
110	18,6	13,6	9,5	10,0	n.d
120	21,1	16,5	16,4	19,0	n.d

ESEMPIO 6

Preparazione di ovuli idrofili contenenti rifaximina e loro rilascio

Sono preparati ovuli contenenti 100 mg di rifaximina con eccipienti e con differenti quantità di questi per valutare il loro effetto nel rilascio di rifaximina.

Le sei composizioni di ovuli idrofili (OV –IDR 1-6), e le rispettive composizioni sono riportate in Tabella 12.

Tabella 12

Componente	Composizione (mg)					
	OV-IDR. 1	OV-IDR. 2	OV-IDR. 3	OV-IDR. 4	OV-IDR. 5	OV-IDR. 6
Rifaximina	100	100	100	100	100	25
Transcutol	400	400	250	-	-	400
Glicerina	400	400	250	400	800	400
Xiloglucano	150	-	150	150	150	150
PEG 4000	1950	2100	1950	1950	1950	2025
Acqua	-		300	400	-	-

Un ovulo idrofilo con composizioni OV-IDR1-6 è posto in un cilindro contenente 900 ml di acqua e la quantità di rifaximina determinata mediante analisi spettrofotometrica. Il test è ripetuto su 6 ovuli.

Le quantità di rifaximina relative alle composizioni 5-9, rilasciate nel tempo, sono riportate in Tabella 13.

Tabella 13

Tempo (min)	Valori di dissoluzione (µg/ml)					
	OV-IDR. 1	OV-IDR. 2	OV-IDR. 3	OV-IDR. 4	OV-IDR. 5	OV-IDR. 6
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	22,30	29,41	3,16	1,35	25,72	n.d.
10	37,85	57,99	6,33	2,64	49,15	n.d.
20	56,92	105,81	12,07	3,38	91,60	0,38
30	66,39	124,15	15,23	3,62	112,72	0,64
40	72,30	127,45	16,63	3,72	115,00	n.d.
50	76,26	102,55	17,16	3,72	101,45	0,60
60	78,81	59,28	17,27	3,76	78,08	0,70
70	79,29	35,07	17,32	3,77	53,12	n.d.
80	77,23	24,69	17,29	3,76	35,28	n.d.
90	72,52	19,70	15,93	3,77	16,12	n.d.
100	65,62	16,98	15,86	3,77	12,42	n.d.
110	60,35	15,31	20,74	3,77	10,35	n.d.
120	54,76	14,09	23,73	4,87	0,00	n.d.

ESEMPIO 7

Comparazione del rilascio di compresse, ovuli idrofili e ovuli lipofili comprendenti rifaximina.

Un ovulo lipofilo contenente 100 mg di rifaximina, preparati secondo l'Esempio 5 e un ovulo idrofilo preparato secondo l'Esempio 6, contenenti rispettivamente 25 e 100 mg di rifaximina e una compressa preparata secondo l'Esempio 2 contenente 100 mg di rifaximina sono posti in un sacchetto contenente

10 ml di acqua in ambiente termostato a 37°C. Ad intervalli regolari è misurata la quantità di rifaximina presente nei 10 ml. L'esperimento è ripetuto tre volte per ogni composizione.

La quantità di rifaximina rilasciata dalle composizioni in esame è stata misurata nel tempo mediante spettrofotometria UV e le concentrazioni riportate in Tabella 14.

Tabella 14

Tempo (min)	Valori di dissoluzione (mg/ml)			
	OV-1 IDR.	OV-IDR. 6	OV-LIP. 5	Compresse Composizione 2
0	0,00	0,00	0,00	0,00
15	0,56	0,38	0,21	0,06
30	0,56	0,64	0,28	0,07
45	0,63	0,61	0,40	0,11
60	0,82	0,70	0,37	0,05

- OV-1 IDR: 1: preparati come in Esempio 6 e contenenti 100 mg di rifaximina;
- OV-IDR.6: preparati come in Esempio 6 e contenenti 25 mg di rifaximina;
- OV-LIP 5: preparati come in Esempio 5 e contenenti 100 mg di rifaximina;
- Compresse Composizione 2 : preparate come in Esempio 2 e contenenti 100 mg di rifaximina.

ESEMPIO 8

Studio di biodisponibilità per via intravaginale nel coniglio di compresse vaginali e ovuli contenenti rifaximina

Dodici conigli New Zealand White Specific Pathogen free (SPF) femmine, nullipare, non-gravide (6 per gruppo) sono state trattate con compresse vaginali e

ovuli contenenti 12,5 mg di rifaximina preparati come in Esempi 1 e 4, in dose singola. Durante il trattamento non sono stati osservati segni clinici locali, reazione al trattamento, variazioni nel peso corporeo negli animali trattati in confronto al gruppo controllo.

Il sangue eparinizzato è stato prelevato dalla vena marginale dell'orecchio pre-dose e circa 1, 2, 4, 6 e 24 ore dalla somministrazione. La concentrazione di rifaximina nel plasma è stata determinata con un metodo validato LC-MS/MS con una sensibilità di 0,5 ng/ml.

L'analisi farmacocinetica è stata condotta in accordo ad una analisi standard non-compartimentale e i seguenti parametri farmacocinetici sono stati calcolati:

C_{max}: massima concentrazione determinata nel plasma

t_{max}: tempo necessario per raggiungere la massima concentrazione plasmatica

AUC_(0-t last): area sottesa dalla curva della concentrazione plasmatica in funzione del tempo da t=0 (pre-dose) a t last (ultima concentrazione quantificabile)

AUC_(inf): area sottesa dalla curva della concentrazione plasmatica in funzione del tempo da t=0 a t= infinito

Nella Tabella 15 sono riportati i parametri farmacocinetici dopo somministrazione di ovuli e di compresse vaginali contenenti 12,5 mg di rifaximina.

Tabella 15

Preparazioni	Parametri Farmacocinetici			
	$t_{\max}$ (h, mediana)	$C_{\max}$ (ng/ml, media $\pm$ sd)	$AUC_{(0-t_{\text{last}})}$ (ng/ml·h, media $\pm$ sd)	$AUC_{(\text{inf})}$ (ng/ml·h, media $\pm$ sd)
Ovuli	2	6,06 $\pm$ 5,38	26,74 $\pm$ 28,31	20,57 (n=2)
Compresse	1	1,48 $\pm$ 0,8	2,12 $\pm$ 1,08	N/C

ESEMPIO 9

Determinazione dell'efficacia di composizioni di rifaximina in ovuli e compresse in un modello di infezione nell'animale

L'efficacia di formulazioni vaginali in compresse e ovuli contenenti rifaximina è stata valutata in un modello animale di infezione batterica persistente nel coniglio.

Il modello di infezione vaginale è stato indotto mediante inoculazione di *Gardnerella vaginalis* isolata da donne affette da vaginosi batterica. I ceppi batterici sono stati coltivati su agar di globuli rossi di bovino a 37°C aggiungendo supplemento DIFCO- C e tenuti in atmosfera controllata al 5% di CO₂ per 24-48 ore.

Per lo sviluppo del modello di infezione animale, sono stati utilizzati conigli New Zealand (*Oryctolagus cunicolis*), di peso tra 2 e 3 Kg.

Gli animali sono stati anestetizzati iniettando per via intramuscolare una miscela di chetamina (30 mg/Kg) e xilazina (2mg/Kg) sia al momento dell'inoculo che al momento della somministrazione di rifaximina in compresse o ovuli.

Prima dell'infezione gli animali sono stati trattati con 1 ml di soluzione al 10% di enrofloxacin per ridurre il numero di Lattobacilli endogeni e facilitare la crescita dell'agente patogeno. L'infezione è stata indotta inoculando nella vagina degli animali 1 ml di soluzione salina sterile contenente 10^{6-7} UFC (Unit Forming Colony) di *Gardnerella vaginalis* usando un catetere 22-24G in teflon. La presenza di *G. vaginalis* negli animali è stata verificata prima dell'inoculo e dopo 24 e 48 ore dall'inoculo.

Gli animali sono stati inoculati due e tre volte a intervalli di tempo di 3 giorni. Dopo 14 giorni dall'ultimo inoculo, tutti gli animali sono stati trattati con 1 ml di soluzione al 10% di enrofloxacin per verificare la sensibilità del modello all'antibiotico. Il trattamento ha eliminato l'infezione, confermando che il modello può essere utilizzato per valutare l'efficacia di antibiotici somministrati per via intravaginale.

La presenza di *G. vaginalis* è stata verificata mediante tampone vaginale dopo 1, 2, 4, 10 e 14 giorni dall'ultimo inoculo, ponendo i tamponi vaginali in piastre di agar di globuli rossi di ovino con supplemento DIFCO-C e posti in cultura a 37°C per 48 ore. La presenza di *G. vaginalis* è stata verificata attraverso identificazione morfologica al microscopio (1000x) e con colorazione di Gram.

Gli animali con infezione persistente, sono poi stati trattati con compresse e ovuli contenenti rifaximina nelle quantità 1,5; 3; 6 e 12,5 mg.

Le composizioni in compresse contenenti rifaximina sono state preparate secondo l'Esempio 1 in cui il rapporto degli eccipienti sono ridotti proporzionalmente per l'ottenimento delle composizioni con le diverse quantità di rifaximina.

Gli ovuli sono stati preparati secondo l'Esempio 5, composizione OV- 2, in cui gli eccipienti sono stati ridotti proporzionalmente per l'ottenimento delle composizioni con le diverse quantità di rifaximina.

Un ovulo o una compressa vaginale contenente rifaximina sono stati inseriti nella vagina e nel caso delle compresse vaginali 1 ml di soluzione fisiologica a 37°C è stato introdotto per facilitare la disintegrazione della compressa. Durante il trattamento non è stato osservato nessun evento avverso.

Dopo un periodo di tre e sette giorni dalla fine del trattamento con rifaximina è stata valutata la presenza di *Gardnerella vaginalis* mediante tamponi vaginali come precedentemente descritto.

I tamponi vaginali sono stati considerati positivi se si contavano 100 o più colonie e la presenza di perdita vaginale maleodorante era il segno clinico dell'avvenuta infezione.

L'efficacia di compresse vaginali, preparate secondo l'Esempio 1 a diversi dosaggi di rifaximina, espressa in percentuale di eradicazione dell'infezione, da *Gardnerella* spp. nel coniglio, è riportata in Tabella 12.

Tabella 16

Numero di animali	Rifaximina Dose (mg)	Eradicazione (%)	
		Dopo 3 giorni	Dopo 7 giorni
6	0	0	0
8	1,5	88	100
8	3	63	100
8	6	88	100
12	12,5	100	100

L'efficacia di ovuli vaginali, preparati secondo l'Esempio 4 a diversi dosaggi di rifaximina, nell'eradicazione dell'infezione persistente da *Gardnerella spp.* nel coniglio è riportata in Tabella 17.

Tabella 17

Numero di animali	Rifaximina Dose (mg)	Eradicazione (%)	
		Dopo 3 giorni	Dopo 7 giorni
6	0	0	0
8	1,5	100	100
8	3	88	100
8	6	88	100
12	12,5	100	100

I tamponi dei conigli trattati con rifaximina sono rimasti negativi fino a 7 giorni dalla fine del trattamento, mentre nei conigli non trattati (controllo) si manteneva l'infezione.

Dopo il trattamento anche tutti i segni clinici risultano scomparsi.

ESEMPIO 10

Determinazione dell'assorbimento sistemico e della tollerabilità locale e sistemica di rifaximina compresse vaginali mediante uno studio di farmacocinetica, studio clinico di Fase I

L'esempio descrive lo studio clinico di farmacocinetica di fase I su volontarie sane, effettuato per valutare l'eventuale assorbimento sistemico e la tollerabilità locale e sistemica di rifaximina compresse vaginali dopo somministrazione singola per via vaginale.

A 24 volontarie sane di età compresa tra i 18 ed i 50 anni è stata somministrata una dose singola di rifaximina compresse vaginali da 100 mg, preparate come in Esempio 8.

Ad ogni soggetto (S) sono stati prelevati campioni di sangue prima della somministrazione (tempo 0) e dopo la somministrazione, e cioè a 30 minuti, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16 e 24 ore dalla somministrazione della dose singola di rifaximina compresse vaginali da 100 mg. I campioni sono stati analizzati in cromatografia liquida con rivelatore di spettrometria di massa, con un limite inferiore di rilevazione (LLOQ) della concentrazione di rifaximina di 0,5 ng/ml.

Le concentrazioni plasmatiche di rifaximina ai vari tempi nei soggetti analizzati sono risultate essere tutte sotto il limite di rivelazione analitico.

ESEMPIO 11

Valutazione della tollerabilità dopo somministrazione delle compresse vaginali contenenti rifaximina

Nello studio di Fase I è stata valutata anche la tollerabilità locale e sistemica su 24 volontarie sane dopo una singola somministrazione di una compressa vaginale contenente 100 mg di rifaximina.

Nessun soggetto ha registrato prurito o dolore vaginale a differenti tempi dopo la somministrazione, confermando una buona tollerabilità locale. Solo una volontaria ha registrato un lieve bruciore vaginale, risolto spontaneamente dopo poche ore dall'insorgenza.

Per la valutazione della tollerabilità sistemica sono stati monitorati segni vitali quali ECG, parametri biochimici in sangue e urine, e avventi avversi riportati dalle volontarie. L'assenza di concentrazioni sistemiche rilevabili di rifaximina e di

sintomi sistemici denota una buona tollerabilità della compressa vaginale contenente 100 mg di rifaximina.

ESEMPIO 12

Trattamento della vaginosi batterica con compresse vaginali comprendenti rifaximina

L'esempio descrive lo studio clinico di Fase II effettuato su 114 pazienti affette da vaginosi batterica, non gravide, con un'età compresa tra i 18 ed i 50 anni.

La diagnosi di vaginosi batterica si è basata sui criteri di Amsel, in cui sono richiesti almeno 3 su 4 criteri positivi, e sull'indice di Nugent, in cui un indice maggiore di quattro è indice di presenza di batteri vaginali patogeni.

Gli obiettivi dello studio sono stati la valutazione della guarigione dalla vaginosi batterica sia con i criteri di Amsel (indice di Amsel < 3) che con i criteri di Nugent (indice di Nugent < 4) dopo 7-10 giorni dal termine della terapia.

Gli obiettivi secondari dello studio sono stati la guarigione, valutata separatamente con i criteri di Amsel e con i criteri di Nugent alla prima visita di controllo (V3), il mantenimento della guarigione alla seconda visita di controllo (V4) e la valutazione della composizione del microbiota vaginale mediante real-time PCR e PCR-DGGE.

In particolare, le pazienti affette da vaginosi batterica e non affette da infezioni vaginali virali, protozoarie e fungine concomitanti sono state assegnate ad uno dei seguenti gruppi di trattamento, utilizzando una procedura di randomizzazione centralizzata ed un disegno sperimentale in doppio cieco:

Gruppo A: 21 pazienti che hanno ricevuto una compressa di rifaximina vaginale contenente 100 mg di rifaximina, preparata secondo l'Esempio 2, una volta al giorno per 5 giorni, alla sera;

Gruppo B: 23 pazienti che hanno ricevuto una compressa di rifaximina vaginale contenente 25 mg di rifaximina, preparata secondo l'Esempio 1, una volta al giorno per 5 giorni, alla sera;

Gruppo C: 19 pazienti che hanno ricevuto una compressa di rifaximina vaginale contenente 100 mg di rifaximina, preparata secondo l'Esempio 2, una volta al giorno per due giorni, alla sera più una compressa di placebo compresse vaginali, una volta al giorno per i rimanenti tre giorni, alla sera;

Gruppo D: 22 pazienti che hanno ricevuto una compressa di placebo preparata come in Esempio 1 in cui la quantità di rifaximina è stata sostituita con lattosio monoidrato, una volta al giorno per 5 giorni, alla sera.

Lo studio ha previsto una visita di arruolamento (V1), seguita da una visita di randomizzazione dopo 7 giorni (V2), da una prima visita di controllo dopo 7-10 giorni dal termine della terapia (V3) e da una seconda ed ultima visita di controllo dopo 28-35 giorni dal termine della terapia (V4). Durante la visita V3 è stato valutato il raggiungimento dell'obiettivo primario e nella seconda ed ultima vista di controllo (V4) il raggiungimento degli obiettivi secondari. In Tabella 18 è riportata la percentuale di guarigione dalla malattia alla visita V3, per entrambi i criteri di valutazione, clinico (Amsel) microbiologico (Nugent).

Tabella 18

Guarigione della malattia alla visita V3 per entrambi i criteri di valutazione, clinico (Amsel) e microbiologico (Nugent)				
Gruppo	A	B	C	D
Dose somministrata	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 5 gg	Rifaximina, 1cpr 25 mg x 5 gg	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 2 gg	Placebo
Pazienti guarite (%)	25,9	48,0	36,0	19,2

La guarigione valutata secondo il criterio clinico di Amsel alla visita V3 è riportata in Tabella 19.

Tabella 19

Guarigione della malattia alla visita V3 per il criterio di valutazione clinico (Amsel)				
Gruppo	A	B	C	D
Dose somministrata	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 5 gg	Rifaximina, 1cpr 25 mg x 5 gg	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 2 gg	Placebo
Pazienti guarite (%)	66,7	80,0	72,0	42,3

La guarigione è valutata secondo i criteri di Nugent è effettuata mediante l'allestimento di un vetrino con colorazione Gram e la valutazione della proporzione tra lattobacilli e altri batteri quali cocco bacilli Gram variabili o Gram negativi, bacilli curvi Gram variabili.

In Tabella 20 sono riportati i valori ottenuti nei vari gruppi di pazienti trattate secondo il criterio di Nugent.

Tabella 20

Guarigione della malattia alla visita V3 per il criterio di valutazione microbiologica (Nugent)				
Gruppo	A	B	C	D
Dose somministrata	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 5 gg	Rifaximina, 1cpr 25 mg x 5 gg	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 2 gg	Placebo
Pazienti guarite (%)	25,9	48,0	36,0	19,2

Il mantenimento della guarigione è stato valutato alla quarta visita V4. In Tabella 21 è riportata la percentuale di guarigione dalla malattia alla visita V4.

Tabella 21

Guarigione della malattia alla visita V4 per entrambi i criteri di valutazione, clinico (Amsel) e microbiologico (Nugent)				
Gruppo	A	B	C	D
Dose somministrata	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 5 gg	Rifaximina, 1cpr 25 mg x 5 gg	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 2 gg	Placebo
Pazienti guarite (%)	14,8	28,0	4,0	7,7

Tabella 22

Guarigione della malattia alla visita V3 per entrambi i criteri di valutazione, clinico (Amsel) e microbiologico (Nugent) in pazienti con primo episodio oppure con recidiva di vaginosi batterica				
Gruppo	A	B	C	D
Dose somministrata	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 5gg	Rifaximina, 1cpr 25 mg x 5gg	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 2 gg	Placebo
Guarigione in pazienti con primo episodio di vaginosi batterica (%)	14,3	41,7	25,0	21,4
Guarigione in pazienti dopo recidiva di vaginosi batterica (%)	38,5	53,8	46,2	16,7

La determinazione degli avventi avversi è stata effettuata valutando effetti sia locali che sistemici nelle pazienti che hanno assunto le compresse di rifaximina.

Sono stati registrati gli avventi avversi riportate dalle pazienti e quello più frequente è stato il prurito vulvo-vaginale. In Tabella 23 sono riportate le percentuali delle pazienti appartenenti ai vari gruppi di trattamento che hanno riportato eventi avversi sistemici e locali, prurito vulvo-vaginale e bruciore vulvo-vaginale correlati a rifaximina.

Tabella 23

Frequenza di eventi avversi				
Gruppo	A	B	C	D
Dose somministrata	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 5gg	Rifaximina, 1cpr 25 mg x 5gg	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 2gg	Placebo
Pazienti con eventi avversi (%)	35,7	34,6	7,7	46,0
Pazienti con prurito vulvo-vaginale (%)	25,0	19,2	3,8	19,2
Pazienti con bruciore vulvo-vaginale (%)	3,6	19,2	3,8	30,8

Non si sono verificati casi di candidiasi vulvo-vaginali correlati a rifaximina durante il trattamento in nessuno dei gruppi trattati.

ESEMPIO 13

Valutazione dei pazienti che hanno registrato una diminuzione maggiore o uguale a 3 punti alla visita a fine trattamento (V3) rispetto alla visita prima della terapia.

Le pazienti arruolate nello studio clinico e appartenenti ai gruppi di trattamento A, B, C e D, come descritto in Esempio 12, presentavano alla visita prima della terapia, valori dell'indice di Nugent compresi tra 7 e 10.

In Tabella 24 sono riportati il numero e le percentuali delle pazienti che alla visita al termine della terapia hanno registrato una diminuzione dell'indice di Nugent maggiore o uguale a 3 punti.

Tabella 24

Riduzione di ≥ 3 punti dell'indice di Nugent alla visita V3				
Gruppo	A	B	C	D
Dose somministrata	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 5gg	Rifaximina, 1cpr 25 mg x 5 gg	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 2 gg	Placebo
Pazienti con indice di Nugent ridotto di ≥ 3 punti (%)	52,4	65,2	36,9	18,2

ESEMPIO 14

Valutazione dei pazienti che hanno registrato una diminuzione maggiore o uguale a 3 punti alla visita a fine trattamento (V3) rispetto alla visita prima della terapia (V1)

Le pazienti arruolate nello studio clinico e appartenenti ai gruppi di trattamento A, B, C e D, come descritto in Esempio 12, presentavano alla visita prima della terapia, dell'indice di Nugent compresi tra 7 e 10.

In Tabella 25 sono riportati il numero e le percentuali delle pazienti che alla visita al termine della terapia hanno registrato una diminuzione dell'indice di Nugent maggiore o uguale a 5 punti.

Tabella 25

Riduzione di ≥ 5 punti dell'indice di Nugent alla visita V3				
Gruppo	A	B	C	D
Dose somministrata	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 5gg	Rifaximina, 1cpr 25 mg x 5gg	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 2 gg	Placebo
Pazienti con indice di Nugent ridotto di ≥ 5 punti (%)	28,6	47,8	26,3	0,1

ESEMPIO 15

Valutazione dei pazienti che hanno registrato una diminuzione maggiore o uguale a 8 punti alla visita a fine trattamento (V3) rispetto alla visita prima della terapia (V1)

Le pazienti arruolate nello studio clinico e appartenenti ai gruppi di trattamento A, B, C e D, come descritto in Esempio 12, presentavano alla visita prima della terapia, valori dell'indice di Nugent compresi tra 7 e 10.

In Tabella 26 sono riportati il numero e le percentuali delle pazienti che alla visita al termine della terapia hanno registrato una diminuzione dell'indice di Nugent maggiore o uguale 8 punti.

Tabella 26

Riduzione di ≥ 8 punti dell'indice di Nugent alla visita V3				
Gruppo	A	B	C	D
Dose somministrata	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 5gg	Rifaximina, 1cpr 25 mg x 5 gg	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 2 gg	Placebo
Pazienti con indice di Nugent ridotto di ≥ 8 punti (%)	14,29%	17,39%	15,79%	0%

ESEMPIO 16

Pazienti che non hanno risposto alla terapia con la composizione in compresse comprendente rifaximina

Le pazienti arruolate nello studio clinico e appartenenti ai gruppi di trattamento A, B, C e D, come descritto in Esempio 12, presentavano alla visita prima della terapia, valori dell'indice di Nugent compresi tra 7 e 10.

In Tabella 27 sono riportati il numero e le percentuali delle pazienti che alla visita al termine che non hanno risposto alla terapia, registrando una diminuzione dell'indice Nugent di zero punti, o hanno presentato un peggioramento della malattia, registrando un aumento dell'indice di Nugent.

Tabella 27

Riduzione di 0 punti dell'indice di Nugent alla visita V3				
Gruppo	A	B	C	D
Dose somministrata	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 5gg	Rifaximina, 1cpr 25 mg x 5gg	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 2gg	Placebo
Pazienti con indice di Nugent ridotto di ≥ 0 punti (%)	9,52	17,39	36,84	68,18

ESEMPIO 17

Determinazione della composizione del microbiota vaginale con la tecnica real-time PCR quantitativa alle visite V1 e V3

Durante lo studio clinico sono stati prelevati campioni dei lavaggi vaginali e determinata composizione del microbiota vaginale con la tecnica real-time PCR quantitativa .

Con la tecnica real-time PCR i campioni di DNA sono amplificati con differenti primari genere e/o specie specifici che hanno come obiettivo il gene batterico 16S rRNA o la regione 16S-23 S rRNA.

In particolare, sono state usate sonde specifiche per il genere *Lactobacillus*, *Gardenella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella* e *Veillonella*, che rappresentano i principali gruppi batterici che subiscono delle modifiche nei casi di vaginosi batterica.

Nella Tabella 28 sono riportati i valori della real-time PCR relativi ai generi e specie batteriche target quantificate nei lavaggi vaginali delle donne appartenenti ai

diversi gruppi di trattamento, espressi come ng DNA target/ μ g DNA genomico totale, per specie microbica testata per gruppo alla visita V3 rispetto alla visita V1.

Tabella 28

Gruppo	Dose	Visita	DNA target/DNA genomico vaginale (ng/ μ g)(media $\pm$ SD)				
			Lactobacillus	Gardnerella vaginalis	Atopobium	Prevotella	Veillonella
A	Rifaximina 1cpr 100 mg x 5gg	V1 ⁽ⁱ⁾	1,683E+01	3,492E+01	9,307E+01	1,880E+01	4,128E-02
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
		V3 ⁽ⁱ⁾	1,695E+00	7,994E+00	7,086E+00	3,182E+00	1,341E-02
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
B	Rifaximina 1cpr 25 mg x 5gg	V1 ⁽ⁱⁱ⁾	2,009E+01	2,356E+01	6,146E+01	1,220E+01	7,807E-03
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
		V3 ⁽ⁱⁱ⁾	2,885E+00	3,386E+00	3,623E+00	1,324E+00	4,069E-03
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
C	Rifaximina 1cpr 100 mg x 2gg	V1 ⁽ⁱⁱⁱ⁾	1,006E+01	1,194E+02	1,082E+02	1,847E+01	3,492E-02
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
		V3 ⁽ⁱⁱⁱ⁾	6,863E-01	1,393E+01	1,388E+01	1,308E+00	1,118E-02
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
D	Placebo	V1 ^(iv)	3,378E+01	6,626E+01	4,880E+01	3,712E+00	1,761E-02
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
		V3 ^(iv)	4,434E+00	1,312E+01	1,444E+01	8,556E-01	8,451E-03
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
E	Rifaximina 1cpr 100 mg x 2gg	V1 ⁽ⁱⁱⁱ⁾	1,266E+01	6,674E+01	1,704E+02	1,791E+01	2,214E-01
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
		V3 ⁽ⁱⁱⁱ⁾	1,378E+00	9,774E+00	2,164E+01	2,802E+00	5,992E-02
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
F	Placebo	V1 ^(iv)	2,536E+01	2,944E+01	5,999E+01	7,248E+00	5,642E-03
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
		V3 ^(iv)	2,110E+00	6,199E+00	1,260E+01	2,176E+00	2,001E-03
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
G	Placebo	V1 ^(iv)	1,488E+01	1,272E+02	1,210E+02	1,729E+01	1,878E-02
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
		V3 ^(iv)	1,482E+00	1,406E+01	1,943E+01	3,359E+00	3,581E-03
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
H	Placebo	V1 ^(iv)	9,040E+00	6,674E+01	5,671E+01	1,292E+01	4,826E-02
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
		V3 ^(iv)	1,039E+00	8,032E+00	1,015E+01	2,537E+00	1,600E-02
			$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$

(i) 27 pazienti; (ii) 25 pazienti; (iii) 25 pazienti; (iv) 25 pazienti

I risultati mostrano che confrontando i valori alla visita V1 con quelli alla visita V4 tutte le specie patogene sono state ridotte in quantità, mentre nello stesso confronto i lattobacilli sono aumentati. In particolare per il Gruppo B tali differenze sono tutte statisticamente significative, eccetto che per la *Veillonella*.

ESEMPIO 18

Determinazione della composizione del microbiota vaginale con la tecnica real-time PCR quantitativa alle visite V1 e V4 a seguito del trattamento con le preparazioni di rifaximina.

È stata determinata la composizione del microbiota vaginale con la tecnica real-time PCR quantitativa delle pazienti che hanno conservato la guarigione alla visita V4 dopo un periodo di 30-40 giorni dal termine della terapia e valutato con la tecnica real-time PCR i campioni di DNA amplificati con primari specifici genere e/o specie.

In particolare, sono state usate sonde specifiche per il genere *Lactobacillus*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella* e *Veillonella*, che rappresentano i principali gruppi batterici che subiscono delle modifiche nei casi di vaginosi batterica.

Nella Tabella 29 sono riportati i valori della real-time PCR relativi ai generi e specie batteriche target quantificate nei lavaggi vaginali delle donne appartenenti ai diversi gruppi di trattamento, espressi come ng DNA target/μg DNA genomico totale, per specie microbica testata per gruppo alla visita V4 in confronto ai valori osservati al V1 di tutte le pazienti trattate.

Tabella 29

Gruppo	Dose	Visita	DNA target/DNA genomico vaginale (ng/μg)(media ± SD)				
			Lactobacillus	Gardnerella vaginalis	Atopobium	Prevotella	Veillonella
A	Rifaximina 1cpr 100 mg x 5gg	V1 ⁽ⁱ⁾	1,683E+01	3,492E+01	9,307E+01	1,880E+01	4,128E-02
			± 1,695E+00	± 7,994E+00	± 7,086E+00	± 3,182E+00	± 1,341E-02
		V4 ⁽ⁱⁱ⁾	2,130E+01	3,067E+00	5,348E+00	4,296E-02	0,000E+00
			± 2,152E+00	± 2,904E-01	± 5,819E-01	± 1,232E-02	± 0,000E+00
B	Rifaximina 1cpr 25 mg x 5gg	V1 ⁽ⁱⁱⁱ⁾	1,006E+01	1,194E+02	1,082E+02	1,847E+01	3,492E-02
			± 6,863E-01	± 1,393E+01	± 1,388E+01	± 1,308E+00	± 1,118E-02
		V4 ^(iv)	3,957E+01	1,757E+01	2,825E+01	2,345E+00	0,000E+00
			± 9,400E+00	± 2,908E+00	± 2,719E+00	± 2,348E-01	± 0,000E+00
C	Rifaximina 1cpr 100 mg x 2gg	V1 ^(v)	1,266E+01	6,674E+01	1,704E+02	1,791E+01	2,214E-01
			± 1,378E+00	± 9,774E+00	± 2,164E+01	± 2,802E+00	± 5,992E-02
		V4 ^(vi)	8,959E+00	7,509E+01	1,399E+02	5,400E+01	2,748E-01
			± 1,725E+00	± 1,295E+01	± 1,708E+01	± 1,003E+01	± 1,020E-01
D	Placebo	V1 ^(vii)	1,488E+01	1,272E+02	1,210E+02	1,729E+01	1,878E-02
			± 1,482E+00	± 1,406E+01	± 1,943E+01	± 3,359E+00	± 3,581E-03
		V4 ^(viii)	1,408E+01	6,095E+01	2,537E+01	1,444E-01	0,000E+00
			± 9,778E-01	± 4,117E+00	± 1,323E+00	± 3,709E-02	± 0,000E+00

(i), 27 pazienti; (ii) 6 pazienti; (iii) 25 pazienti; (iv) 12 pazienti; (v) 25 pazienti;

(vi) 9 pazienti; (vii) 9 pazienti; (viii) 4 pazienti.

I risultati riportati nella Tabella 29 mostrano l'azione selettiva che le preparazioni contenenti rifaximina, descritta negli esempi 1 e 2, svolgono nel favorire la colonizzazione dei lattobacilli, infatti risulta che la quantità dei lattobacilli alla visita V4 dei Gruppi B e C, ma in modo particolare quella del Gruppo B, diventa prevalente rispetto alle specie patogene nelle pazienti trattate con rifaximina, mentre rimane minoritaria nelle pazienti trattate con placebo, anche in quelle che hanno mostrato guarigione.

Tale evidenza supporta l'ipotesi che le pazienti trattate con le preparazioni di rifaximina possano conservare la risposta, mentre le altre sono destinate con tutta probabilità ad avere una recidiva.

ESEMPIO 19

Determinazione della composizione del microbiota vaginale con la tecnica PCR–DGGE dopo trattamento con le preparazioni di rifaximina

Durante lo studio clinico sono stati prelevati campioni dei lavaggi vaginali e determinata composizione del microbiota vaginale con la tecnica PCR–DGGE, che permette l'identificazione di vari DNA di tipo batterico attraverso un processo di separazione elettroforetico ed un'amplificazione del DNA con primers universali per la regione 16S rRNA dei batteri. Il risultato di questa tecnica è una sequenza di bande visibili, detti cluster, ciascuna delle quali è rappresentativa del DNA delle specie batteriche presenti nel campione in esame.

L'analisi dei cluster dei profili della DGGE dei campioni, eseguita utilizzando il software FPQuest (Bio-Rad), fornisce l'informazione su quanto due campioni sono simili. Nel caso specifico dove la guarigione è intesa come scomparsa di specie patogene, è da considerare positivo che il campione di una paziente dopo

trattamento sia molto diverso dal campione della stessa paziente prima del trattamento.

L'analisi è stata effettuata con i campioni vaginali alle visite V1,V3 e V4 per i quattro gruppi A, B, C e D delle pazienti trattate. In Tabella 30 sono riportate le percentuali delle pazienti con profili che “clusterizzano”.

Tabella 30

Percentuali delle pazienti con profili che “clusterizzano”				
Gruppo	A	B	C	D
Dose somministrata	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 5gg	Rifaximina, 1cpr 25 mg x 5gg	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 2 gg	Placebo
V1 vs. V3 (%)	37	24	28	56
V1 vs. V3 vs. V4 (%)	0	0	11	50

I risultati riportati in Tabella 30 indicano che c'è un'alta variabilità nella popolazione batterica identificata alla V1, V3 e V4 nelle pazienti trattate con le preparazioni di rifaximina, dimostrando così che il microbiota vaginale è stato significativamente modificato dall'azione farmacologica della rifaximina alle concentrazioni rilasciate dalle preparazioni somministrate.

In particolare risulta che la preparazione somministrata alle pazienti del Gruppo B ha maggiore effetto alla visita V3.

L'effetto delle preparazioni di rifaximina è ulteriormente confermata dopo la visita V4, dove, in particolare nei Gruppi A e B, la popolazione batterica è radicalmente modificata.

Per valutare l'azione farmacologica delle preparazioni di rifaximina in esame

sono stati confrontati i diversi gruppi di trattamento attraverso il cosiddetto “indice di similarità, anche noto in inglese con il termine “Similarity Indexes (SI)”. L’analisi consiste nel valutare la similarità di profili elettroforetici calcolata sulla base del coefficiente di correlazione di Pearson. Nel caso in esame SI indica la % di somiglianza tra due o più profili DGGE appartenenti alla stessa donna alle diverse visite.

Tabella 31
Indice di Similarità

Gruppo	A	B	C	D
Dose somministrata	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 5 gg	Rifaximina, 1cpr 25 mg x 5 gg	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 2 gg	Placebo
V1-V3	61,6	48,4	54,0	75,4
V1-V4	52,1	40,0	47,1	57,6
V3-V4	66,8	62,1	42,8	58,7
V1-V3-V4	50,8	36,4	37,6	56,7

I risultati della Tabella 31 indicano che nel caso di comparazione V1-V3 l’indice di similarità dei gruppi trattati con le preparazioni di rifaximina sono significativamente diversi dal gruppo placebo.

Un altro criterio adottato di valutazione dei campioni è il cosiddetto “indice di ricchezza”, noto in inglese con il termine “Richness Index (RI)”; questo criterio, che si basa sulle bande di ciascun profilo DGGE, dà una misura della complessità della popolazione batterica, che è un segno di malattia per l’insorgenza di nuove specie patogene. In Tabella 32 sono riportati i valori medi di RI, misurati alle visite V1 e V3.

Tabella 32

Indice di Ricchezza				
Gruppo	A	B	C	D
Dose somministrata	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 5 gg	Rifaximina, 1cpr 25 mg x 5 gg	Rifaximina, 1cpr 100 mg x 2 gg	Placebo
V1	13,5	14,0	15,4	13,3
V3	10,9	10,7	12,2	13,9

I risultati della Tabella 32 mostrano che i profili del microbiota vaginale diventano meno complessi nei gruppi trattati con le preparazioni di rifaximina quando sono confrontati con il gruppo trattato con placebo.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica solida, in forma di compresse comprendente rifaximina in una quantità da 10 a 500 mg in granuli ed eccipienti extragranulari farmaceuticamente accettabili.

2. Composizione farmaceutica in accordo alla rivendicazione 1 in cui i granuli comprendono i seguenti componenti nelle rispettive quantità:

rifaximina: 1-80%

agente(i) legante(i): 0,5-20%;

agente(i) diluente(i): 3-90%;

agente(i) lubrificante(i): 0,1-5% , rispetto al peso del granulo.

3. Composizione farmaceutica in accordo alle rivendicazioni 1 e 2 comprendenti:

granuli di rifaximina: 10-85%;

agente(i) legante(i): 0,1-5%

agente(i) diluente(i) : 10-80%

agente(i) lubrificante(i): 0,1-10%

agente(i) disgregante(i): 2-20%, rispetto al peso della compressa finita.

4. Composizione farmaceutica in accordo alla rivendicazione 1 in cui le compresse sono rivestite con rivestimento filmogeno.

5. Composizione farmaceutica in accordo alla rivendicazione 1 in cui la quantità di rifaximina è compresa tra 10 e 200 mg.

6. Composizione farmaceutica in accordo alla rivendicazione 3 in cui:

- l' (gli) agente(i) legante(i) è (sono) scelto(i) dal gruppo comprendente:
amidi di mais, gomma arabica, lattosio, malto destrine, polivinilpirrolidone (copovidone), saccarosio o loro miscele;

- l' (gli) agente(i) lubrificante(i) è (sono) scelto(i) dal gruppo comprendente: glicerolo dibenato, stearati di calcio o magnesio, alluminio, sodio stearil fumarato, oli idrogenati, vegetali, acido palmitico, alcol, amido, oli minerali, polietilen glicoli, sodio lauril solfato, talco, gliceridi, sodio benzoato o loro miscele;

- l' (gli) agente(i) diluente è (sono) scelto(i) dal gruppo comprendente: cellulosa, cellulosa microcristallina, fosfato di calcio, amido, caolino, solfato di calcio di-idrato, carbonato di calcio, lattosio, saccarosio, mannitolo, polisaccaridi, glucani, xiloglucano o loro miscele;

- l'(gli) agente(i) disgregante(i) adatto(i) alla preparazione della composizione dell'invenzione è (sono) scelto(i) dal gruppo comprendente: sodio amido glicolato, povidone (copolimero di vinil pirrolidone), copovidone (copolimero di polivinil pirrolidone e vinilacetato), carbossimetilcellulosa sodica detta anche caramellosa, carbossimetil cellulosa reticolata detta anche croscarmellosa, silicati di metalli alcalino e alcalino terrosi, oppure sodio amido glicolato, o loro miscele.

7. Composizione farmaceutica in accordo ad ognuna delle rivendicazioni 1-5 in cui i granuli di rifaximina comprendono rifaximina in una quantità compresa tra 0,01 e 25%, leganti in una quantità compresa tra 0,5 e 5%, diluenti in una quantità compresa tra 70 e 90% , lubrificanti in una quantità compresa tra 0,1 e 5% rispetto al peso totale della compressa finita.

8. Composizione farmaceutica in accordo alla rivendicazione 3 comprendente :

- granuli di rifaximina 20-60%;
- copovidone 0,2-3%;
- lattosio 15-70%;

- crosopvidone e calcio silicato 2-20%, rispetto al peso della compressa finita.

9. Composizione in accordo alla rivendicazione 1 comprendente polimorfi, amorfi e/o loro miscele di rifaximina.

10. Processo per la preparazione di una composizione farmaceutica in compresse comprendente una quantità di rifaximina da 10 a 500 mg, caratterizzato dal comprendere gli stadi:

a) granulazione a secco: rifaximina è mescolata con gli eccipienti granulari per ottenere una miscela omogenea e la miscela posta in un compattatore per l'ottenimento dei granuli;

b) miscelazione dei granuli con gli eccipienti extragranulari: i granuli sono mescolati con una miscela comprendente disgreganti, leganti, diluenti e lubrificanti ;

c) formazione compresse: la miscela granulato ottenuta dallo stadio b) è compattata per ottenere le compresse che opzionalmente sono ricoperte con un rivestimento filmogeno.

11. Composizione farmaceutica in accordo alla rivendicazione 1 per uso come medicamento.

12. Composizione farmaceutica in accordo alla rivendicazione 11 per il trattamento di infezioni vaginali.

13. Composizione farmaceutica in accordo alla rivendicazione 12 per il trattamento di vaginosi batteriche.

14. Composizione farmaceutica in accordo alla rivendicazione 13, in cui la quantità totale somministrata di rifaximina, utile per il trattamento di vaginosi batterica è minore di 700 mg.

- 15.** Composizione farmaceutica in accordo alla rivendicazione 13 utile per aumentare la quantità di Lattobacilli nella flora vaginale di pazienti affette da vaginosi batterica.
- 16.** Composizioni farmaceutiche in accordo alla rivendicazione 13 utili per ottenere la guarigione da infezioni vaginali con tempi di trattamento minori di una settimana.
- 17.** Composizioni farmaceutiche in accordo alla rivendicazione 13 utili per ottenere una riduzione degli indici di Nugent e Amsel in pazienti affette da vaginosi batterica.
- 18.** Composizioni farmaceutiche in accordo alla rivendicazione 13 utili nella prevenzione delle recidive di vaginosi batterica.

CLAIMS

1. Pharmaceutical composition in form of tablets, comprising rifaximin in an amount from between 10 to 500 mg in granules and extragranular pharmaceutically acceptable excipients.

2. Pharmaceutical composition according to claim 1, wherein the granules comprise the following components in the respective amounts:

rifaximin: 1-80%

binder(s): 0.5-20%

diluents(s): 3-90%

lubricant(s): 0.1-5% respect to the weight of the granule.

3. Pharmaceutical composition according to claims 1 and 2 comprising:

granules of rifaximin: 10-85%

binder(s): 0.1-5%

diluents: 10-80%

lubricant(s): 0.1-10%

disintegrant(s): 2-20% respect to the weight of the final composition in form of tablet.

4. Pharmaceutical composition according to claim 1 wherein the tablets are coated with film coating.

5. Pharmaceutical compositions according to claim 1 characterized in that the amount of rifaximin is comprised between ~~2-510~~ and ~~200500~~ mg.

6. Pharmaceutical composition according to claim 3 wherein the excipients comprise one or more:

- binder(s), chosen among corn starch, Arabic gum, lactose, malt dextrines, polyvinylpyrrolidone (copovidone), saccharose and mixtures thereof;

- lubricant(s), chosen among: glycerol behenate, magnesium or calcium stearate, aluminum, sodium stearil fumarate, hydrogenated oils, vegetal, palmitic acid, alcohol, mineral oils, polyethylene glycols, sodium lauryl sulfate, talc, glycerides, sodium benzoate and mixtures thereof;
- diluent(s), chosen among cellulose, microcrystalline cellulose, calcium phosphate, starch, kaolin, calcium sulfate dehydrate, calcium carbonate, lactose, saccharose, mannitol, polysaccharides, glucans, xyloglucan and mixtures thereof;
- disintegrant(s), chosen among sodium starch glycolate, polyvinylpyrrolidone (povidone), sodium carboxymethylcellulose (carmellose sodium), cross-linked sodium carboxymethylcellulose, (croscarmellose sodium), cross-linked polyvinylpolypyrrolidone (crospovidone), silicates of alkaline earth metals, and mixture thereof.

7. Pharmaceutical composition according to any one of claims 1-5 wherein the granules of rifaximin are characterized in that the amounts of rifaximin varies between 0.01 and 25%; the amount of binders varies between 0.5 and 5%, the amount of diluents varies between 70 and 90%, the amount of lubricant varies between 0.1% and 5% respect to the total weight of the tablet.

8. Pharmaceutical composition according to claim 3 comprising:

- rifaximin granules 20-60%;
- copovidone 0.2-3%;
- lactose 15-70%;
- crospovidone and calcium silicate 2-20%, in respect to the total weight of the tablet.

9. Pharmaceutical composition according to claim 1 comprising polymorphous or amorphous or their mixture of rifaximin.

10. Process for the manufacturing of pharmaceutical composition in form of tablets, comprising rifaximin in an amount from between ~~2-510~~ to 500 mg, characterized to comprise the following steps:

- a) dry granulation: rifaximin is mixed with granular excipients to obtain a homogenous mixture and then the mixture is putted in a compactor to obtain granules;
- b) the granules are mixed with extragranular excipients comprising disintegrants, diluents, binders and lubricants;
- c) the mixtures obtained by step b) is compressed to obtain tablets, which are optionally coated.

11. Pharmaceutical composition according to claim 1 for the use as medicament.

12. Pharmaceutical composition according to claim 11 for the treatment of vaginal infections.

13. Pharmaceutical composition according to claim 12 for the treatment of bacterial vaginosis.

14. Pharmaceutical composition according to claim 13 , wherein total amount of rifaximin, useful in the treatment of bacterial vaginosis, is less than 700 mg.

15. Pharmaceutical composition according to claim 13, useful to increase the Lactobacillus amount in the vaginal flora of patients affected by bacterial vaginosis.

16. Pharmaceutical composition according to claim 13 useful to obtain the bacterial vaginosis recover in a time less than one week.

17. Pharmaceutical composition according to claim 13, useful to obtain a reduction of Nugent and Amsel criteria in patients affected by bacterial vaginosis.

18. Pharmaceutical composition according to claim 13 useful to prevent bacterial vaginosis relapse.