

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190065** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.16

(22) Дата подачи заявки
2019.06.19

(51) Int. Cl. *A61K 9/48* (2006.01)
A61K 35/38 (2015.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 35/745 (2015.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА, СОДЕРЖАЩАЯ ЖИВОЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПРОДУКТ

(31) 1810061.0; 1818740.1

(32) 2018.06.19; 2018.11.16

(33) GB

(86) PCT/GB2019/051720

(87) WO 2019/243814 2019.12.26

(71) Заявитель:

4Д ФАРМА РИСЕРЧ ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:

**Кэрайт Кристофер, Декломеснил
Софи (GB)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложена энтеросолюбильная лекарственная форма, содержащая живой биотерапевтический продукт.

A1

202190065

202190065

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566262EA/032

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА, СОДЕРЖАЩАЯ ЖИВОЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПРОДУКТ

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим продуктам, содержащим живой биотерапевтический продукт. Настоящее изобретение также относится к способам изготовления таких фармацевтических продуктов и наборов, содержащих такие продукты.

Полагают, что кишечник человека является стерильным *in utero*, однако сразу после рождения подвергается воздействию большого количества микроорганизмов материнского организма и внешней среды. После этого происходит динамичный период микробной колонизации и сукцессии, на которые влияют такие факторы, как способ родоразрешения, окружающие условия, рацион и генотип хозяина, все они влияют на состав микробиоты кишечника, в частности на ранних стадиях жизни. Затем микробиота стабилизируется и становится похожей на микробиоту взрослого человека. Микробиота кишечника человека содержит более 500-1000 различных филофитов, принадлежащих по существу двум основным типам бактерий: *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. Успешные симбиотические взаимосвязи в результате колонизации бактериями кишечника человека обеспечили широкое множество метаболических, структурных, защитных и других благоприятных функций. Повышенная метаболическая активность колонизированного кишечника обеспечивает разложение в ином случае неперевариваемых компонентов питания с высвобождением промежуточных продуктов, обеспечивающих важный источник питательных веществ для хозяина. Кроме того, иммунологическая важность микробиоты кишечника является хорошо известной и проиллюстрирована у безмикробных животных с нарушениями иммунной системы, которая функционально восстанавливается после введения комменсальных бактерий.

Значительные изменения состава микробиоты были документально подтверждены при желудочно-кишечных нарушениях, таких как воспалительное заболевание кишечника (ВЗК). Например, количество бактерий *Clostridium* кластера XIVa оказывается сниженным у пациентов с ВЗК, в то время как количество *E. coli* увеличено, что указывает на сдвиг равновесия симбионтов и патобионтов в кишечнике. Интересно, что этот микробный дисбиоз также ассоциирован с дисбалансами в популяциях эффекторных Т-клеток.

Учитывая потенциальный положительный эффект, который некоторые штаммы бактерий могут оказывать на кишечник млекопитающих, были предложены различные штаммы для профилактики, лечения и излечения различных заболеваний. Примеры раскрытий использования живых бактериальных организмов для лечения физиологических состояний включают европейский патент № 1280541 (который раскрывает использование гидрогенотрофных микроорганизмов для лечения ряда патологических состояний, включая синдром раздраженного кишечника), европейский патент № 1448995 (который раскрывает использование бактерий *Bacteroides thetaiotamicron* для лечения воспалительных заболеваний), публикацию заявки на

европейский патент № 2763685 (которая раскрывает использование бактерии *Roseburia hominis* в качестве иммунорегуляторного агента), европейский патент № 3209310 (который раскрывает использование бактерии *Enterococcus gallinarum* в качестве противоопухолевой терапии) и публикацию заявки на европейский патент № 3206700 (которая раскрывает использование бактерии *Bifidobacterium* для лечения ряда аутоиммунных/воспалительных состояний, включая тяжелую астму).

Такие организмы используются в качестве активных компонентов в классе фармацевтических агентов, классифицируемых FDA США как живые биотерапевтические продукты (LBP - англ.: Live Biotherapeutic Products). В руководстве, опубликованном FDA в феврале 2012 г. и обновленном в 2016 г. (Guidance for Industry : Early Clinical Trials with Live Biotherapeutic Products: Chemistry, Manufacturing, and Control Information), LBP определяются как биологические продукты, которые: 1) содержат живые организмы, такие как бактерии; 2) применимы для профилактики, лечения или излечения болезней или патологических состояний человека; и 3) не являются вакцинами. В руководящем документе FDA также говорится, что (в отличие от пробиотических продуктов) LBP подвергаются такому же строгому контролю со стороны регулирующих органов, как и фармацевтические агенты.

Хотя LBP обеспечивают перспективные и инновационные методы лечения целого ряда болезненных состояний, по-прежнему сложно разработать рецептуру так, чтобы активные компоненты доставлялись пациенту в жизнеспособном виде, особенно после длительных периодов хранения перед введением.

Специалистам в данной области известны активные фармацевтические ингредиенты (АФИ), которые широко используются и требуют доставки в кишечник, например с целью избежания а) разложения в кислой среде желудка, например ингибиторы протонной помпы, такие как омепразол, эзомепразол и пантопразол, или б) вызывающие раздражение желудка, например аспирин.

Квалифицированный адресат описания также должен знать подходы к составлению рецептур, позволяющих надежно доставлять такие АФИ в кишечник даже после продолжительных периодов хранения. Одним из таких подходов является приготовление рецептуры АФИ в таблетках с энтеросолюбильным покрытием, т.е. когда сердцевинки таблеток покрыты одним или несколькими слоями из материала резистентного к действию желудочного сока. Когда такие таблетки вводят перорально пациентам, материал энтеросолюбильного покрытия не растворяется в кислой среде желудка, и, таким образом, предотвращается высвобождение содержащегося АФИ в желудке. Однако, как только таблетки переходят в кишечник и попадают в менее кислую среду, происходит растворение покрытия и высвобождается АФИ. Действительно, для АФИ, которые проявляют оптимальную эффективность в определенных областях кишечника, были разработаны pH-зависимые покрытия, которые растворяются и высвобождают АФИ, содержащийся внутри, когда покрытие подвергается воздействию среды с определенной pH. Например, энтеросолюбильные полимеры серии Eudragit® растворяются при pH 5,5

или выше (для марок L 30 D-55 и L 100-55), при pH 6,0 или выше (для марок L 100 и L 12,5) и pH выше 7,0 (для марок S 100, S 12,5 и FS 30 D).

Эти полимеры обычно поставляются в виде растворов или дисперсий, которые можно использовать для покрытия сердцевин таблеток, или в виде порошков, которые производитель таблеток может переводить в растворы или дисперсии и затем использовать для покрытия сердцевин таблеток.

Альтернативный, хотя и связанный с этим подход к составлению в отношении приготовления АФИ для доставки в кишечник состоит в том, чтобы создать рецептуру в форме капсулы, например мягкой или твердой желатиновой капсулы, а затем покрыть капсулу энтеросолюбильными полимерами, такими как те, что обсуждались выше. Кроме того, для предотвращения нежелательного выхода АФИ из капсулы с покрытием обычной практикой является дополнительное соединение капсул, состоящих из двух частей, для надежной герметизации капсулы.

Хотя такие подходы успешно применялись в промышленных масштабах для разработки рецептур некоторых АФИ для доставки в кишечник, было обнаружено, что они необязательно применимы к более чувствительным АФИ, особенно LBP.

В настоящем изобретении допускается, что одной из основных причин этой сложности в приготовлении рецептуры жизнеспособного продукта являются жесткие условия, которым подвергаются живые бактерии. Во многих LBP или пробиотических препаратах, бактерии представлены в лиофилизированной форме. Эта форма достигается с помощью сублимационной сушки - процесса, при котором используются низкие температуры и давления для получения сухого порошкообразного продукта, а воздействие таких условий на популяции бактерий приводит к потере жизнеспособных микроорганизмов.

Даже если процесс лиофилизации может быть оптимизирован таким образом, чтобы минимизировать потерю жизнеспособных организмов в бактериальной популяции, в настоящем изобретении допускается, что есть еще другие этапы в процессе приготовления рецептуры, которые могут привести к дальнейшим потерям бактерий.

Например, как правило, после лиофилизации, полученный порошок смешивают со вспомогательными веществами. Сдвигающие силы, производимые смесительным аппаратом, могут инактивировать бактерии. Кроме того, для анаэробных микроорганизмов присутствие кислорода в смесительном аппарате также может вызвать потерю жизнеспособных клеток.

Для некоторых применений, желательно доставлять LBP в кишечник. Специалисту в соответствующей области техники очевидно, что этого можно достичь за счет использования кишечнорастворимой(-ых) оболочки (оболочек), например для сердцевин таблеток или обычных капсул, содержащих LBP. Обнаружено, что этот этап в значительной степени отрицательно влияет на жизнеспособность бактерий в некоторых вариантах осуществления.

Без привлечения теории отметим, что настоящее изобретение предполагает, что это

происходит из-за попадания растворителя(-ей), используемого(-ых) во время нанесения кишечнорастворимого покрытия, внутрь лекарственной формы (например, в сердцевину таблетки или внутреннюю часть капсулы), который(-ые) убивает(-ют) живые бактерии, и/или из-за воздействия на продукты повышенных температур во время сушки покрытия.

В настоящем изобретении также признается, что после составления рецептуры все еще остаются риски для жизнеспособности бактериальной популяции. До введения лекарственной формы она может храниться в течение нескольких месяцев, если не лет. Со временем незначительные изменения в рецептуре могут отрицательно повлиять на количество жизнеспособных клеток, например поглощение атмосферной влаги или несовместимость вспомогательных веществ с LBP, и эти проблемы могут становиться очевидными только в течение продолжительных периодов.

Кроме того, в настоящем изобретении признается, что введение в приготовленного виде лекарственной формы продукта может также снижать количество жизнеспособных клеток. После проглатывания продукты встречаются с сильноокислой средой желудка, до того как они попадают в кишечник. Приготовление рецептур этих продуктов для защиты бактерий от внутрижелудочной среды, с целью сохранения их на этом этапе в достаточном количестве, может придавать значительный терапевтический эффект по сравнению с соответствующими бактериями, встречающимися в природе. Как упоминалось выше, один из подходов к увеличению гастрорезистентности АФИ, содержащихся в капсулах с энтеросолюбильным покрытием, состоит в том, чтобы соединить капсулы. Однако касательно LBP способы соединения (которые требуют использования растворителей и/или повышенных температур для сушки) в настоящее время связаны со снижением жизнеспособности бактерий.

Хотя в продажу поступил ряд пробиотических продуктов, покрытых энтеросолюбильным покрытием, рассматриваемые микроорганизмы обычно входят в рецептуру в очень большом количестве, чтобы допустить снижение количества жизнеспособных микроорганизмов в результате описанных выше эффектов. Специалистам в данной области техники, тем не менее, будет понятно, что такой подход не допустим для фармацевтических продуктов, таких как LBP, где надежность доставки определенного количества микроорганизмов предусматривается регулируемыми органами.

Кроме того, многие рецептуры пробиотиков основаны на бактериях с естественно высокой кислотоустойчивостью, таких как *виды рода Lactobacillus, например L. casei*, или на тех, которые могут образовывать защитные споры, такие как *виды рода Bacillus, например B. clausii*, которые затем могут оживать в благоприятных условиях кишечника. Однако многие LBP по своей природе не являются кислотоустойчивыми или не образуют спор, и поэтому требуют более высоких уровней защиты.

Еще одна трудность при составлении рецептур LBP заключается в том, что многие терапевтически активные микроорганизмы являются анаэробными, и воздействие воздуха на эти микроорганизмы либо во время изготовления продуктов, либо во время хранения

(например, из-за попадания воздуха внутрь продуктов, содержащих эти микроорганизмы), что проблематично и может приводить к снижению количества жизнеспособных клеток.

Таким образом, хотя были предприняты попытки производить фармацевтические продукты, содержащие LBP, для доставки жизнеспособных клеток в кишечник, в настоящем изобретении признается существование проблем изготовления таких лекарственных форм в промышленном масштабе. Соответственно, остается потребность в рецептуре, которую можно использовать для доставки эффективных объемов LBP пациенту с фармацевтически приемлемой надежностью и которую можно производить в промышленных масштабах, а также в способах получения таких рецептур.

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предлагается перорально вводимая кишечнорастворимая лекарственная форма, содержащая живой биотерапевтический продукт, который i) содержит антиоксидант, причем антиоксидант представляет собой цистеин, ii) не содержит карбонат натрия или карбонат кальция, и/или iii) не содержит мальтодекстрин.

Авторы изобретения обнаружили, что вышеупомянутый выбор (или в случае вариантов ii) или iii) избегание) вспомогательных веществ эффективно и неожиданно обеспечивает получение лекарственной формы, которая является пригодной для длительного хранения в течение по меньшей мере 12 месяцев при хранении при температуре от 2°C до 8 °C.

В контексте данного документа термин «пригодный для длительного хранения» означает, что когда лекарственная форма хранится не менее 12 месяцев во влагонепроницаемой упаковке при температуре от 2°C до 8 °C, количество жизнеспособных клеток в лекарственной форме (количество КОЕ на грамм, исключая оболочку капсулы (при ее наличии) или энтеросолюбильное покрытие (при наличии)) уменьшается не более чем на 3 логарифма. В некоторых вариантах осуществления количество жизнеспособных клеток в лекарственной форме уменьшается не более чем на 2 логарифма, когда лекарственная форма хранится не менее 12 месяцев во влагонепроницаемой упаковке при температуре от 2°C до 8 °C, а в некоторых других вариантах осуществления изобретения количество жизнеспособных клеток в лекарственной форме уменьшается не более чем на 1 логарифм, когда лекарственная форма хранится не менее 12 месяцев во влагонепроницаемой упаковке при температуре от 2°C до 8 °C. В вариантах осуществления изобретения количество жизнеспособных клеток в лекарственной форме при хранении в течение 6 месяцев во влагонепроницаемой упаковке при температуре 5°C уменьшается не более чем на 3 логарифма. В некоторых вариантах осуществления количество жизнеспособных клеток в лекарственной форме уменьшается не более чем на 2 логарифма за 6 месяцев хранения, в некоторых других вариантах осуществления количество жизнеспособных клеток в лекарственной форме уменьшается не более чем на 1 логарифм за 6 месяцев хранения. В некоторых других вариантах осуществления количество жизнеспособных клеток в лекарственной форме уменьшается не более чем на 0,5 логарифма за 6 месяцев хранения. В некоторых других

вариантах осуществления количество жизнеспособных клеток в лекарственной форме уменьшается не более чем на 1 логарифм за 21 месяц хранения.

Что касается признака i) лекарственной формы изобретения, то многие антиоксиданты известны специалистам в данной области фармацевтических рецептур. Авторы изобретения успешно обнаружили, что как показано в следующих примерах, цистеин превосходит традиционно используемые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, по поддержанию количества жизнеспособных клеток терапевтически активных бактерий.

В вариантах осуществления настоящего изобретения можно использовать антиоксиданты в дополнение к цистеину. К ним относятся аргинин, аскорбиновая кислота (и ее соли и сложные эфиры, например аскорбил пальмитат, аскорбат натрия), бутилированные агенты, такие как бутилированный гидроксанизол или бутилированный гидрокситолуол, лимонная кислота, эриторбиновая кислота, фумаровая кислота, глутаминовая кислота, глутатион, яблочная кислота, метионин, монотиоглицерин, пентетовая кислота, метабисульфит (например, метабисульфит натрия, метабисульфит калия), пропионовая кислота, пропилгаллат, мочева кислота, формальдегидсульфоксилат натрия, сульфит (например, сульфит натрия), тиосульфат натрия, диоксид серы, тимол, токоферол (свободный или сложноэтерифицированный), мочева кислота (и ее соли) и их соли и/или сложные эфиры.

В то время как цистеин был рассмотрен в качестве антиоксиданта в рецептурах определенных фармацевтических продуктов, его применение в рецептуре лекарственных форм, содержащих LBP, неизвестно. Тот факт, что цистеин может способствовать долгосрочной стабилизации LBP, является неожиданным, учитывая, что в течение многих лет было известно, что цистеин проявляет бактерицидные эффекты. В связи с этим можно привести ссылку на Berglin et al. (*Journal of Bacteriology*, October 1982, 152 (1), 81-8), особенно первый абзац этой статьи, в котором резюмируются бактериостатические эффекты цистеина. Однако, несмотря на этот эффект, в настоящее время было продемонстрировано в приведенных ниже примерах, что цистеин не оказывает свои бактериостатические эффекты на LBP, и (как упоминалось выше) на самом деле повышает стабильность лекарственных форм изобретения.

Признак ii) настоящего изобретения (исключение карбоната натрия или карбоната кальция) представляет собой дополнительный подход к рецептуре, которую изобретатели неожиданно определили как способствующий стабильности продукта, позволяющий доставлять пациентам фармацевтически приемлемые уровни LBP.

В рецептуре LBP традиционно используется ряд газовыделяющих вспомогательных веществ. Действительно, использование таких вспомогательных веществ в явном виде рекомендовалось в научной литературе. Например, в статье Kim et al. (*International Journal of Food Science and Technology* 2017, 52, 519-530), было рекомендовано использовать карбонат кальция в качестве инкапсулянта для увеличения выживаемости LBP в моделируемых условиях желудка и при хранении в холодильнике.

Majkowska et al. (Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2003, Vol. 12/53, SI 2, pp. 64-68) предложили использовать карбонат кальция в качестве биологически-активной пищевой добавки кальция. В отчете о препарате (<https://www.powerofprobiotics.com/Hyperbiotics-PRO-15.html>) пробиотика под названием PRO-15, запущенном в коммерческое производство компанией Hyperbiotics, объясняется, что использование карбоната натрия в этом продукте предназначено «для контроля уровня pH внутри таблетки и вокруг распадающейся таблетки в кишечнике». В статье, посвященной коммерчески доступным рецептурам пробиотиков (<https://livingwellnessblog.wordpress.com/2013/01/23/probiotic-paradox/>), доктор David Peterson объяснил, что «для увеличения выживаемости пробиотика следует не только хранить в холодильнике, но и защищать от воздействия кислоты». Многие компании не используют противокислотную защиту. Другие в целях обеспечения противокислотной защиты используют карбонат кальция, антацид. Он нейтрализует стерилизационное действие желудочной кислоты и стимуляцию выделения желчи и панкреатического сока».

Учитывая эти рекомендации неудивительно, что огромное количество коммерчески выпускаемых продуктов LBP содержат газовыделяющие вспомогательные вещества, такие как карбонат натрия или кальция. Примеры таких продуктов включают Hyperbiotics 'PRO-15, Guts & Glory's Probiotic Power 60 Capsules, American Health's Probiotic CD и Kyodophilus' Kyolic и многие другие.

Несмотря на это, авторы изобретения неожиданно обнаружили, что включение вспомогательных веществ, которые выделяют газ при контакте с кислотой, на самом деле оказывает пагубное влияние на жизнеспособность LBP, когда энтеральная лекарственная форма проходит через желудок или моделируемую внутрижелудочную среду при тестировании *in vitro*. Без привлечения теории полагают, что это происходит из-за проникновения следовых количеств кислоты, когда лекарственная форма подвергается действию фактической или моделируемой желудочной среды. В том случае, если это является причиной дестабилизации LBP, это неожиданно по двум причинам. Во-первых, учитывая, что энтеросолюбильные лекарственные формы получают из материалов, которые не допускают проникновение биологической среды до тех пор, пока лекарственная форма не достигнет кишечника, не предполагается попадание кислой среды из желудочной среды. Во-вторых, даже если бы специалист в данной области ожидал, что незначительные количества кислой среды из желудка могут проникнуть в лекарственную форму до того, как лекарственная форма попадет в кишечник, он должен знать благодаря приведенным выше ссылкам, что использование вспомогательных веществ таких как карбонат натрия или карбонат кальция, фактически защищает от потери жизнеспособности LBP, вызванной кислой средой. Однако теперь выяснилось, что все обстоит с точностью до наоборот.

Таким образом, в вариантах осуществления изобретения лекарственная форма изобретения не содержит карбонат натрия и/или карбонат кальция.

Третий признак настоящего изобретения (исключение мальтодекстрина) также полезен для обеспечения лекарственных форм длительного хранения, содержащих LBP, поскольку авторы настоящего изобретения обнаружили, что мальтодекстрин может быть несовместим с LBP.

Как объяснялось выше, лекарственная форма изобретения представляет собой перорально вводимую энтеросолюбильную лекарственную форму, т.е. такую, которая способна растворяться только в селективных средах (т.е. в кишечной среде), таким образом предотвращая высвобождение своего содержимого в желудке. Такая гастропротекторная лекарственная форма, описанная в данном документе, может содержать эффективное количество LBP (т.е. живых анаэробных бактерий) и антиоксидант, при этом эффективное количество LBP в колониеобразующих единицах (КОЕ) уменьшается не более чем на 1 логарифм в моделируемой желудочной среде. Гастропротекторные свойства могут быть определены, например: (а) подвергая лекарственную форму, описанную в данном документе, воздействию кислотной среды при pH 1,2 в течение 30 минут, (б) подвергая лекарственную форму воздействию кишечной среды при pH 6,8 в течение 45 минут, и (с) сравнивая КОЕ после воздействия и до воздействия.

Специалисты в данной области техники знакомы с перорально вводимыми энтеросолюбильными лекарственными формами, и они включают таблетки, капсулы, гранулы и другие микро- или нанорецептуры, такие как инкапсулированные альгинатом частицы, и в вариантах осуществления изобретения лекарственная форма может быть любой из них. В некоторых случаях особенно предпочтительны энтеросолюбильные таблетки или капсулы.

Специалисты в данной области также знакомы с методиками обеспечения энтеросолюбильности лекарственных форм. Обычно это достигается нанесением энтеросолюбильных покрытий на лекарственные формы, такие как таблетки или капсулы, и лекарственные формы с энтеросолюбильным покрытием представляют собой варианты осуществления настоящего изобретения. Материалы энтеросолюбильного покрытия, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают полимеры, растворяющиеся при pH 5,5 или выше (например, Eudragit марок L 30 D-55 и L 100-55), растворяющиеся при pH 6,0 или выше (для Eudragit марок L 100 и L 12,5) и/или растворяющиеся при pH выше 7,0 (для Eudragit марок S 100, S 12,5 и FS 30 D). Дополнительно или альтернативно, если лекарственная форма изобретения включает капсулу, в дополнение к энтеросолюбильному покрытию, капсула может быть также соединенной для предотвращения попадания желудочной среды в соединении между двумя половинами капсулы.

В альтернативных вариантах осуществления лекарственная форма может представлять собой по сути энтеросолюбильную капсулу. Авторы изобретения обнаружили, что использование таких лекарственных форм, в частности по сути энтеросолюбильных капсул, обеспечивает высокоэффективный и простой подход к

составлению рецептур с жизнеспособными LBP.

Используемый в данном документе термин «по сути энтеросолюбильная капсула» используется для обозначения капсулы, которая формируется (частично или полностью) из материала, который растворяется при воздействии среды, имеющей слабокислый, нейтральный или основной pH, высвобождая таким образом содержимое капсулы в среду. В вариантах осуществления изобретения по сути энтеросолюбильная капсула высвобождает свое содержимое при воздействии сред, имеющих pH примерно 4,0 или выше, примерно 4,5 или выше, примерно 5,0 или выше, примерно 5,5 или выше, примерно 6,0 или выше, примерно 6,5 или выше или примерно 7,0 или выше. Аналогичным образом, термин «энтеросолюбильный» используется для обозначения материала, который растворяется при воздействии сред, имеющих pH примерно 4,0 или выше, примерно 4,5 или выше, примерно 5,0 или выше, примерно 5,5 или выше, примерно 6,0 или выше, примерно 6,5 или выше или примерно 7,0 или выше.

Благодаря своим присущим энтеросолюбильным свойствам капсула не требует обработки после заполнения, что иначе могло бы потенциально нанести вред LBP, например при нанесении покрытия, сушке и/или соединении. Таким образом, в вариантах осуществления изобретения по сути энтеросолюбильная капсула не имеет сплошного покрытия (т.е. которое покрывает всю капсулу) и/или не является соединенной.

По сути энтеросолюбильная капсула может быть однослойной или многослойной и/или полностью или частично сформирована из желудочно-кишечно-солюбильного материала, который растворяется при определенном pH. В многослойных вариантах осуществления один или более слоев могут быть сформированы из энтеросолюбильного материала, растворяющегося при определенном pH.

По сути энтеросолюбильная капсула может быть образована из любого материала(-ов), который(-е) допускает(-ют) полное или частичное растворение капсулы при воздействии среды, имеющей слабокислый, нейтральный или основной pH. В вариантах осуществления изобретения по сути энтеросолюбильная капсула может быть частично или полностью сформирована из жирных кислот, восков, шеллака, полимерных материалов, растительных волокон, энтеросолюбильных полимеров или их смесей. Энтеросолюбильные материалы, которые могут быть использованы в настоящем изобретении (либо для получения по сути энтеросолюбильных лекарственных форм, либо, в альтернативных вариантах осуществления, для энтеросолюбильных покрытий), включают, без ограничения, полимеры метакрилата, сополимеры метилакрилата и метакриловой кислоты, сополимеры метакриловой кислоты и метилметакрилата, фталат поливинилацетата, шеллак, альгинат натрия, зеин, декстрины, амилозный крахмал и производные крахмала, а также целлюлозу и производные целлюлозы, включая фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, ацетат-сукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы, ацетат-сукцинат целлюлозы, ацетат-тримеллитат целлюлозы, ацетат-фталат целлюлозы или их смеси. Пластификаторы также могут содержаться в материале, из которого сформирована по сути энтеросолюбильная капсула. Примеры материалов, которые могут

быть использованы в производстве по сути энтеросолюбильных капсул, а также способы изготовления таких капсул, приведены в европейском патенте № 2722104, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Пример по сути энтеросолюбильных капсул предоставляется компанией Capsugel под торговыми названиями enTRinsic DDT или ECDDT.

Капсулы, используемые в настоящем изобретении, могут иметь любую форму, профиль или конструкцию при условии, что они могут быть закрыты, чтобы обеспечить энтеросолюбильную герметизацию вокруг LBP, содержащегося в них. Например, капсулы могут быть твердыми или мягкими. В вариантах осуществления изобретения капсула представляет собой капсулу, состоящую из двух частей, или капсулу, состоящую из нескольких частей (т.е. капсулу, закрытую соединением более двух частей).

Для капсул из двух частей или капсул из нескольких частей, части капсулы могут быть закрыты путем механического соединения двух или более частей капсулы. Может использоваться любая форма механического взаимодействия, которая приводит к образованию герметизирующего слоя вокруг LBP. Примеры механического взаимодействия, которые предусмотрены, включают в себя соединение с плотной посадкой, фрикционное соединение и/или резьбовое соединение.

Используемый в данном документе термин «живой биотерапевтический продукт» или «LBP» относится к продукту, который содержит живые бактерии и является эффективным в профилактике, лечении или излечении заболевания или патогенного состояния, и не является вакциной.

В вариантах осуществления изобретения LBP состоит из анаэробных бактерий или включает их. В некоторых вариантах осуществления LBP содержит бактерии или состоит из них, которые являются облигатными анаэробами. Как упоминалось выше, рецептура из анаэробных бактерий является особенно сложной задачей при использовании традиционных подходов к энтеросолюбильным рецептурам. Тем не менее, авторы настоящего изобретения обнаружили, что такие микроорганизмы могут сохранить жизнеспособность при приготовлении в рецептуре согласно настоящему изобретению.

Дополнительно или альтернативно бактерии, которые можно вводить в рецептуру согласно настоящему изобретению, могут быть гидрогенотрофными.

Микроорганизмы, которые могут быть приготовлены в рецептуре согласно настоящему изобретению, включают те, которые принадлежат к следующим родам: *Enterococcus* (например, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus caselliflavus*, *Enterococcus faecalis* или *Enterococcus faecium*), *Blautia* (например, *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris*, *Blautia wexlerae*, *Blautia coccoides* или *Blautia producta*), *Bacteroides* (например, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides massiliensis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides dorei* или *Bacteroides copricola*), *Faecalibacterium* (например, *Faecalibacterium prausnitzii*), *Bariatricus* (например, *Bariatricus massiliensis*), *Bifidobacterium* (например, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis* или *Bifidobacterium longum*), *Roseburia* (например, *Roseburia hominis*, *Roseburia intestinalis* или

Roseburia inulinivorans), Flavonifractor (например, Flavonifractor plautii), Anaerotruncus (например, Anaerotruncus colihominis), Parabacteroides (например, Parabacteroides distasonis, Parabacteroides goldsteinii, Parabacteroides merdae или Parabacteroides johnsonii), Erysipelatoclostridium (например, Erysipelatoclostridium ramosum), Megasphaera (например, Megasphaera massiliensis, Megasphaera elsdenii), Pediococcus (например, Pediococcus acidilacticii), Eubacterium (например, Eubacterium contortum, fissicatena, Eubacterium eligens, Eubacterium hadrum, Eubacterium hallii или Eubacterium rectale), Ruminococcus (например, Ruminococcus torques, Ruminococcus gnavus или Ruminococcus bromii), Pseudoflavonifractor (например, Pseudoflavonifractor capillosus), Clostridium (например, Clostridium nexile, Clostridium hylemonae, Clostridium butyricum, Clostridium tertium, Clostridium disporicum, Clostridium bifermentans, Clostridium inocuum, Clostridium mayombei, Clostridium bolteae, Clostridium bartletti, Clostridium symbiosum или Clostridium orbiscindens), или Coprococcus (например, Coprococcus comes или Coprococcus catus), Bifidobacterium (например, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium adolescentis или Bifidobacterium longum), Acetivibrio (например, Acetivibrio ethanolgignens), Dorea (например, Dorea longicatena) или Lachnospiraceae. Примеры таких микроорганизмов включают те, которые раскрыты в европейских патентах № 1280541, 1448995 и 3209310, публикациях заявки на европейский патент № 3206700, 2763685 и заявке на патент Великобритании № 1423084.1, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки. Дополнительные примеры микроорганизмов, которые могут быть включены в рецептуру согласно настоящему изобретению, включают те, которые раскрыты в заявках на патенты Великобритании № 1510470.6, 1510468.0, 1510469.8, 1510466.4 и 1510467.2, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки. В вариантах осуществления изобретения лекарственная форма не содержит микроорганизмов, принадлежащих к кластерам Clostridium IV или XIVa.

В вариантах осуществления изобретения LBP не являются обычными пробиотическими бактериями, например они не принадлежат к родам Lactobacillus, Bifidobacterium и/или не являются молочнокислыми бактериями.

В некоторых вариантах осуществления LBP может содержать облигатные анаэробные бактерии или состоять из них. В других вариантах осуществления LBP может содержать факультативные анаэробные бактерии и/или микроаэрофильные бактерии или состоять из них.

В иллюстративном варианте осуществления LBP содержит или состоит из неспорулирующих бактерий.

В некоторых вариантах осуществления лекарственные формы изобретения содержат один или более бактериальных штаммов определенного рода и не содержат бактерии из каких-либо других родов, или они содержат только de minimis или биологически несущественные количества бактерий из других родов.

В некоторых вариантах осуществления лекарственные формы изобретения содержат один или более бактериальных штаммов определенного вида и не содержат

бактерий любого другого вида, или они содержат только de minimis или биологически несущественные количества бактерий другого вида.

В некоторых вариантах осуществления лекарственные формы изобретения содержат один штамм или вид бактерий и не содержат никаких других штаммов или видов бактерий. Такие лекарственные формы могут содержать только de minimis или биологически несущественные количества других штаммов или видов бактерий.

В некоторых вариантах осуществления лекарственные формы изобретения содержат более одного штамма бактерий. Например, в некоторых вариантах осуществления лекарственные формы изобретения содержат более одного штамма одного вида (например, более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 45 штаммов) и, необязательно, не содержат бактерий других видов.

В некоторых вариантах осуществления лекарственные формы изобретения содержат менее 50 штаммов одного и того же вида (например, менее 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 штамма) и, необязательно, не содержат бактерий каких-либо других видов. В некоторых вариантах осуществления лекарственные формы изобретения включают 1-40, 1-30, 1-20, 1-19, 1-18, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 6-30, 6-15, 16-25 или 31-50 штаммов одного и того же вида и, необязательно, не содержат бактерий других видов. Настоящее изобретение включает любую вышеупомянутую комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма включает микробный консорциум. Например, в некоторых вариантах осуществления лекарственная форма включает конкретный штамм бактерий как часть микробного консорциума. Например, в некоторых вариантах осуществления лекарственная форма включает штамм бактерий, который присутствует в комбинации с одним или несколькими (например, по меньшей мере, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20) другими штаммами бактерий из других родов, с которыми он может симбиотически жить в кишечнике *in vivo*.

Например, в некоторых вариантах осуществления лекарственная форма содержит конкретный штамм бактерий в сочетании со штаммом бактерий из другого рода. В некоторых вариантах осуществления микробный консорциум включает два или более штаммов бактерий, полученных из образца фекалий одного организма, например человека. В некоторых вариантах осуществления микробный консорциум не встречается совместно в природе. Например, в некоторых вариантах осуществления микробный консорциум включает штаммы бактерий, полученные из образцов фекалий по меньшей мере двух различных организмов. В некоторых вариантах осуществления два различных организма принадлежат к одному виду, например двум разным людям. В некоторых вариантах осуществления двумя различными организмами являются младенец и взрослый человек. В некоторых вариантах осуществления два различных организма представляют собой человека и млекопитающее, не являющееся человеком.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к указанной выше фармацевтической лекарственной форме, в которой количество

бактериального штамма составляет примерно от 1×10^3 до 1×10^{11} колониеобразующих единиц на грамм по отношению к массе лекарственной формы (исключая тело капсулы (если есть) и энтеросолюбильное покрытие (если есть)).

В некоторых аспектах раскрытая в данном документе фармацевтическая лекарственная форма содержит одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Примеры фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе, включают, без ограничения, связующие вещества, разрыхлители, суперразрыхлители, смазывающие вещества, разбавители, наполнители, ароматизаторы, способствующие скольжению вещества, сорбенты, солюбилизаторы, хелатирующие агенты, эмульгаторы, загустители, диспергирующие агенты, стабилизаторы, суспендирующие агенты, адсорбенты, гранулирующие агенты, консерванты, буферы, красители и подсластители или их комбинации. Примеры связующих веществ включают микрокристаллическую целлюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, карбоксивиниловый полимер, поливинилпирролидон, поливинилполипирролидон, кальций карбоксиметилцеллюлозу, натрий карбоксиметилцеллюлозу, камедь рожкового дерева, хитозан, хлопковое масло, декстраты, декстрин, этилцеллюлозу, желатин, глюкозу, глицерилбегенат, полисахарид галактоманнана, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гипромеллозу, инулин, лактозу, алюмосиликат магния, мальтодекстрин, метилцеллюлозу, полоксамер, поликарбофил, полидекстрозу, полиэтиленгликоль, полиэтиленоксид, полиметакрилаты, альгинат натрия, сорбит, крахмал, сахарозу, подсолнечное масло, растительное масло, токоферсолан, зеин или их комбинации. Примеры разрыхлителей включают гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC), гидроксипропилцеллюлозу с низкой степенью замещения (L-HPC), натрий кроскармеллозу, натрийгликолят крахмал, лактозу, алюмосиликат магния, метилцеллюлозу, калий полакрилин, альгинат натрия, крахмал или их комбинации. Примеры смазывающего вещества включают стеариновую кислоту, стеарилфумарат натрия, глицерил бегенат, стеарат кальция, моностеарат глицерина, глицерилпальмитостеарат, лаурилсульфат магния, минеральное масло, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, полоксамер, полиэтиленгликоль, бензоат натрия, хлорид натрия, лаурилсульфат натрия, тальк, стеарат цинка, бензоат калия, стеарат магния или их комбинации. Примеры разбавителей включают тальк, альгинат аммония, карбонат кальция, лактат кальция, фосфат кальция, силикат кальция, сульфат кальция, целлюлозу, ацетат целлюлозы, кукурузный крахмал, декстраты, декстрин, декстрозу, эритрит, этилцеллюлозу, фруктозу, фумаровую кислоту, глицерил пальмитостеарат, изомальт, каолин, лактит, лактозу, карбонат магния, оксид магния, мальтодекстрин, мальтозу, маннит, микрокристаллическую целлюлозу, полидекстрозу, полиметакрилаты, симетикон, альгинат натрия, хлорид натрия, сорбит, крахмал, сахарозу, сульфобутиловый эфир β -циклоглодекстрина, трагакант, трегалозу, ксилит или их комбинации.

Различные пригодные наполнители или разбавители включают, без ограничения,

безводный двухосновный фосфат кальция, двухосновный дигидрат фосфат кальция, трехосновный фосфат кальция, сульфат кальция, порошкообразную целлюлозу, силикатизированную микрокристаллическую целлюлозу, ацетат целлюлозы, прессованный сахар, кондитерский сахар, декстраты, декстрин, декстрозу, фруктозу, каолин, лактит, лактозу, моногидрат лактозы, карбонат магния, оксид магния, мальтодекстрин, мальтозу, маннит, микрокристаллическую целлюлозу, полидекстрозу, симетикон, альгинат натрия, хлорид натрия, сорбит, крахмал, клейстеризованный крахмал, сахарозу, трегалозу и ксилит или их смеси.

Примеры подходящих смазывающих веществ включают, без ограничения, стеарат магния, стеарат кальция, стеарат цинка, стеариновую кислоту, тальк, глицерил бегенат, полиэтиленгликоль, полимеры полиэтиленоксида, лаурилсульфат натрия, лаурилсульфат магния, олеат натрия, стеарилфумарат натрия, DL-лейцин, коллоидный диоксид кремния и другие, известные в данной области. В некоторых вариантах осуществления смазывающее вещество представляет собой стеарат магния.

Различные пригодные вещества, способствующие скольжению, включают, без ограничения, трехосновный фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, порошкообразный коллоидный диоксид кремния, силикат магния, трисиликат магния, крахмал и тальк или их смеси.

Фармацевтически приемлемые поверхностно-активные вещества включают, без ограничения, как неионные, так и ионные поверхностно-активные вещества, подходящие для использования в фармацевтических лекарственных формах. Ионные поверхностно-активные вещества могут включать одно или более анионных, катионных или цвиттерионных поверхностно-активных веществ. Различные пригодные поверхностно-активные вещества включают, без ограничения, лаурилсульфат натрия, моноолеат, монолаурат, монопальмитат, моностеарат или другой сложный эфир полиоксиэтиленсорбитана, диоктилсульфосукцинат натрия (DOSS), лецитин, стеариновый спирт, цетостеариловый спирт, холестерин, полиоксиэтилен рициновое масло, полиоксиэтилен глицериды жирных кислот и полоксамер.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, в которой указанный бактериальный штамм лиофилизирован. В некоторых случаях бактериальный штамм лиофилизируют способом, в котором бактериальный штамм не подвергается воздействию температур выше примерно 100 °C, выше примерно 70 °C, выше примерно 50°C или выше примерно 30 °C.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к указанной выше к фармацевтической композиции, в которой, когда композиция хранится во влагонепроницаемом контейнере при температуре от 2°C до 8 °C, а контейнер помещается в атмосферу с относительной влажностью 50%, потеря бактериального штамма, измеренная в колониеобразующих единицах (КОЕ) на грамм, составляет не более 3 логарифмов, не более 2 логарифмов или не более 1 логарифма после периода времени не

менее 1 года, 1,5 года, 2 лет, 2,5 года или 3 года. Дополнительно или альтернативно, в вариантах осуществления изобретения, когда композиция хранится во влагонепроницаемом контейнере при температуре 5 °С, и контейнер помещен в атмосферу с относительной влажностью 50%, потеря бактериального штамма, измеренная в колониеобразующих единицах (КОЕ) на грамм, составляет не более 3 логарифмов, не более 2 логарифмов, не более 1 логарифма или не более 0,5 логарифма после периода времени 6 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма содержит LBP в количестве от примерно 1×10^3 до примерно 1×10^{13} КОЕ/г по отношению к массе лекарственной формы (за исключением тела капсулы (если присутствует) и любого энтеросолюбильного покрытия (если присутствует), например от примерно 1×10^4 до примерно 1×10^{12} КОЕ/г, от примерно 1×10^6 до примерно 1×10^{11} КОЕ/г, от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{12} или от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{10} КОЕ/г. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма может содержать по меньшей мере 1×10^{10} КОЕ/г, по меньшей мере 1×10^9 КОЕ/г, по меньшей мере 1×10^8 КОЕ/г, по меньшей мере 1×10^7 КОЕ/г или по меньшей мере 1×10^6 КОЕ/г.

Как упоминалось выше, продукты настоящего изобретения неожиданно сохраняют высокие уровни жизнеспособности LBP после воздействия кислой среды. В вариантах осуществления настоящего изобретения, количество клеток LBP, содержащихся в продуктах настоящего изобретения, после воздействия моделируемой желудочно-кишечной среды, а именно первой среды, имеющей pH 1,2, в течение 30 минут при скорости перемешивания лопастной мешалкой 50 об/мин с последующим воздействием второй среды, имеющей pH 6,8, в течение 45 минут при скорости перемешивания лопастной мешалкой 120 об/мин приводит к уменьшению количества жизнеспособных клеток на 3 логарифма или меньше, 2 логарифма или меньше или 1 логарифм или меньше.

Подсчет жизнеспособных клеток LBP (например, для определения КОЕ/г) можно проводить с использованием методов, известных специалистам в данной области. Например, подсчет КОЕ можно проводить на лиофилизированном LBP. При определении КОЕ/г определяется количество колониеобразующих единиц на грамм композиции, присутствующих в лекарственной форме (т.е. за исключением оболочки капсулы (если присутствует) и энтеросолюбильного покрытия (если присутствует)).

LBP, присутствующий в лекарственной форме, может быть комменсальным, т.е. получен от донора (например, младенца, ребенка, подростка или взрослого человека).

В вариантах осуществления изобретения лекарственная форма включает биологически чистый единичный штамм бактерий. Используемый в данном документе термин «биологически чистый» относится к культуре, которая содержит *de minimis* или биологически незначительные уровни других штаммов бактерий. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма содержит примерно менее 1%, примерно менее 0,5%, примерно менее 0,2%, примерно менее 0,1%, примерно менее 0,05%, примерно менее 0,02% или примерно менее 0,01% от общего количества клеток других видов бактерий.

В альтернативных вариантах осуществления лекарственная форма изобретения может включать множество штаммов, например 2, 3, 4, 5 или более 5 штаммов бактерий.

В дополнение к LBP фармацевтические продукты настоящего изобретения могут содержать одно или более вспомогательных веществ, включая, например, разбавители, стабилизаторы, стимуляторы роста, наполнители, смазывающие вещества, вещества, способствующие скольжению, и тому подобное.

В дополнение к LBP (и в случае признака i) лекарственной формы, описанной выше, цистеин), лекарственные формы изобретения могут содержать одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Примеры таких подходящих вспомогательных веществ можно найти в Handbook of Pharmaceutical Excipients. Приемлемые вспомогательные вещества для терапевтического применения хорошо известны в фармацевтической области.

Примеры подходящих веществ-носителей включают лактозу, крахмал, глюкозу, метилцеллюлозу, стеарат магния, маннит, сорбит и тому подобное.

Примеры подходящих разбавителей включают этанол, глицерин и воду. Выбор фармацевтического носителя, вспомогательного вещества или разбавителя может быть сделан в соответствии со стандартной фармацевтической практикой.

Эти лекарственные формы могут содержать любое подходящее(-ие) связующее(-ие) вещество(-а), смазывающее(-ие) вещество(-а), суспендирующий(-ие) агент(-ы), покрывающий(-ие) агент(-ы), солюбилизующий(-ие) агент(-ы).

Примеры подходящих связующих веществ включают крахмал, желатин, натуральные сахара, такие как глюкоза, безводная лактоза, сыпучая лактоза, бета-лактоза, кукурузные подсластители, натуральные и синтетические камеди, такие как гуммиарабик, трагакант или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлоза и полиэтиленгликоль.

Примеры подходящих смазывающих веществ включают олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия и тому подобное.

В фармацевтическую композицию могут входить консерванты, стабилизаторы, красители и даже ароматизаторы.

Примеры консервантов включают бензоат натрия, сорбиновую кислоту и сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты.

Также можно использовать суспендирующие агенты.

В вариантах осуществления изобретения LBP не является микроинкапсулированным.

В вариантах осуществления настоящего изобретения продукт настоящего изобретения может содержать сахар, например моносахарид или дисахарид. Дополнительно или альтернативно сахар может быть восстанавливающим или невосстанавливающим сахаром. В таких вариантах осуществления, когда продукты содержат восстанавливающий сахар, невосстанавливающие сахара могут быть исключены из продукта, и наоборот. Примеры конкретных сахаров, которые можно использовать в качестве вспомогательных веществ в настоящем изобретении, включают сахарозу и

трегалозу.

Фармацевтические продукты изобретения могут дополнительно содержать пребиотик. Термин «пребиотик» означает неусваиваемый ингредиент, который благотворно влияет на LBP, избирательно стимулируя рост и/или активность одной или ограниченного числа бактерий. Примеры пребиотиков включают олигосахариды, фруктоолигосахариды и галактоолигосахариды.

LBP (и, необязательно, одно или более из любых присутствующих вспомогательных веществ) могут быть представлены в виде лиофилизата. Лيوфилизат может дополнительно содержать другие вспомогательные вещества, с которыми LBP был лиофилизирован, чтобы защитить LBP во время лиофилизации или придать лиофилизату функциональные свойства. В качестве примеров вспомогательных веществ, которые могут присутствовать в лиофилизате, они включают маннит, обезжиренное молоко и бычий сывороточный альбумин (БСА), сахарозу, трегалозу и/или один из других сахаров, указанных выше. В качестве среды для лиофилизации может использоваться смесь маннита и сахарозы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лиофилизат, содержащий LBP, также может содержать антиоксидант (например, цистеин или его соль). Дополнительно или альтернативно могут присутствовать аргинин, аскорбиновая кислота (и ее соли и сложные эфиры, например аскорбил пальмитат, аскорбат натрия), бутилированные агенты, такие как бутилированный гидроксианизол или бутилированный гидрокситолуол, лимонная кислота, эриторбиновая кислота, fumarовая кислота, глутаминовая кислота, глутатион, яблочная кислота, метионин, монотиоглицерин, пентетовая кислота, метабисульфит (например, метабисульфит натрия, метабисульфит калия), пропионовая кислота, пропилгаллат, мочева кислота, формальдегидсульфоксилат натрия, сульфит (например, сульфит натрия), тиосульфат натрия, диоксид серы, тимол, токоферол (свободный или сложноэфирфицированный), мочева кислота (и ее соли), и их соли и/или сложные эфиры. В таких вариантах осуществления остальная часть лекарственной формы может не содержать антиоксидантов.

Антиоксидант, используемый в вариантах осуществления (например, цистеин), может присутствовать в виде соли. Примеры солей могут включать ацетат, акрилат, адипат, альгинат, аспарат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бисульфит, битартрат, бромид, бутират, бутин-1,4-диоат, камфорат, камфорсульфонат, капроат, каприлат, хлорбензоат, хлорид, цитрат, циклопентанпропионат, деканоат, диглюконат, дигидрофосфат, динитробензоат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, fumarат, глюкогептаноат, глицерофосфат, гликолят, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гексин-1,6-диоат, гидроксibenзоат, γ -гидроксibутират, гидрoхлорид, гидрoбромид, гидрoиодид, 2-гидроксietансульфонат, иодид, изобутират, лактат, малеат, малонат, метансульфонат, манделат, метафосфат, метансульфонат, метоксибензоат, метилбензоат, моногидрогенфосфат, 1-нафталинсульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, пальмоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат,

пиросульфат, пирофосфат, пропионат, фталат, фенилацетат, фенилбутират, пропансульфонат, салицилат, сукцинат, сульфат, сульфит, сукцинат, суберат, себацинат, сульфонат, тартрат, тиоцианат, тозилат, ундеконат и ксилолсульфонат.

Лиофилизат можно смешивать с дополнительными вспомогательными веществами. Таким образом, в вариантах осуществления изобретения лекарственная форма включает i) лиофилизат, содержащий LBP, и ii) одно или более дополнительных вспомогательных веществ. Одно или более дополнительных вспомогательных веществ также могут быть включены в лиофилизат.

В вариантах осуществления изобретения дополнительные вспомогательные вещества могут представлять собой любое из вспомогательных веществ, описанных в данном документе, например, один или более антиоксидантов, обсуждаемых в данном документе, носитель, разбавитель, связующее вещество, смазывающее вещество, суспендирующий агент, покрывающий агент, солюбилизующий агент, стабилизатор, стимулятор роста, наполнитель, смазывающее вещество и/или вещество, способствующее скольжению.

Было обнаружено, что жизнеспособность LBP сохраняется при хранении, когда содержание влаги в LBP сведено к минимуму. Считается, что это связано с тем, что присутствие влаги увеличивает чувствительность LBP к кислотной деградации. Соответственно, в продуктах изобретения содержание влаги в LBP в лекарственной форме изобретения составляет примерно менее 10000 частей на миллион, примерно менее 5000 частей на миллион, примерно менее 2000 частей на миллион, примерно менее 1000 частей на миллион, примерно менее 500 частей на миллион, примерно менее 200 частей или примерно менее 100 частей на миллион.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предоставляется способ изготовления перорально вводимой энтеросолюбильной лекарственной формы, содержащей живой биотерапевтический продукт, включающий i) получение живого биотерапевтического продукта и, необязательно, одного или более вспомогательных веществ, ii-a) заполнение LBP и вспомогательными веществами капсулы и закрывание капсулы для получения заполненной капсулы или ii-b) формирование сердцевин таблеток, содержащих LBP и вспомогательные вещества, для получения сердцевин таблеток, причем капсула является по сути энтеросолюбильной капсулой, или при этом способ включает этап iii) нанесения энтеросолюбильного покрытия на заполненные капсулы или сердцевины таблеток.

В вариантах осуществления изобретения одно или более вспомогательных веществ содержат антиоксидант, причем антиоксидант представляет собой цистеин, ii) не содержит карбонат натрия или карбонат кальция и/или iii) не содержит мальтодекстрин.

В способах изобретения живой биотерапевтический продукт может быть получен путем лиофилизации бактерий отдельно или в комбинации с одним или несколькими вспомогательными веществами для получения лиофилизата. Вспомогательное(-ые) вещество(-а), представленные на этапе i) способа изобретения, могут содержаться в

лиофилизате и/или быть отделены от лиофилизата.

Как упомянуто выше, использование по сути энтеросолюбильных капсул в сочетании с LBP является преимуществом, поскольку можно избежать использования обычных этапов процесса нанесения энтеросолюбильного покрытия, которые могут отрицательно повлиять на жизнеспособность LBP. Таким образом, в способах настоящего изобретения закрытая по сути энтеросолюбильная капсула не подвергается этапам нанесения покрытия, сушки и/или соединения.

Кроме того, в способе настоящего изобретения LBP нельзя подвергать воздействию температуры выше примерно 50 °C, выше примерно 40°C или выше примерно 30°C на этапах i), ii-a) и/или ii-b).

Как упоминалось выше, в вариантах осуществления изобретения LBP может содержать анаэробные бактерии. Соответственно, в способах изобретения для получения таких продуктов этапы i), ii-a) и/или ii-b) осуществляются в инертной (т.е. безвоздушной) среде. Термин «безвоздушная среда» используется в данном документе для обозначения среды, содержащей примерно менее 10000 частей на миллион, примерно менее 5000 частей на миллион, примерно менее 2000 частей на миллион, примерно менее 1000 частей на миллион, примерно менее 500 частей на миллион, примерно менее 200 частей на миллион или примерно менее 100 частей на миллион кислорода. Специалистам в данной области известны методы получения такой среды, например продувка инертным газом, например азотом.

Лекарственные формы изобретения могут быть представлены в упаковочном материале, который может содержать одну или более лекарственных форм. Упаковочный материал может, например, содержать металлическую (например, алюминиевую) или пластиковую фольгу, такую как блистерная упаковка. Кроме того, продукты могут быть расфасованы в бутылочки. Независимо от конкретного типа упаковки продукты настоящего изобретения могут быть упакованы в упаковочный материал, который представляет собой непроницаемые для воздуха и/или влаги контейнеры. В некоторых вариантах осуществления упаковка может включать изготовление упаковки при пониженном давлении.

В вариантах осуществления изобретения фармацевтические продукты представлены в виде набора, включающего продукты и инструкции по применению. Инструкции по применению могут включать инструкции по хранению продуктов при температурах примерно менее 20 °C, примерно менее 15°C или примерно менее 10 °C, например в холодильнике, например при температуре от 2 до 8 °C.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами.

Сравнительный пример 1

Лиофилизат, содержащий *Blautia Hydrogenotrophica* и маннит, сахарозу и цистеин, смешивали с карбонатом кальция, цистеином и стеаратом магния, готовили в чистой комнате с контролируемой температурой и заполняли капсулы технологии доставки

лекарств кишечнорастворимой капсулой 0 размера (Enteric capsule drug delivery technology (ECDDT)) (Capsugel®).

Затем капсулу с энтеросолюбильным покрытием подвергали воздействию модулируемых условий желудка (1 час в кислой среде при pH 1,2) и проводили подсчет клеток. Капсулы разрушились, их содержимое диспергировалось в кислотной среде. Был проведен подсчет жизнеспособных клеток LBP в этой среде, и было обнаружено, что произошла значительная потеря жизнеспособных клеток (более 3 логарифмов по сравнению с подсчетом клеток, проведенным после инкапсуляции).

Пример 2. Стабильность при хранении изобретенных продуктов

Взвешивали маннит, гидрохлорид цистеина и стеарат магния и смешивали их вместе в чистой комнате с контролируемой температурой. Полученную смесь затем смешивали с лиофилизатом, содержащим *Blautia Hydrogenotrophica*, маннит, сахарозу и цистеин, в смесителе в изолированном модуле с инертной атмосферой, при температуре <math><25^{\circ}\text{C}</math> и относительной влажности <math><40\%</math>. Затем полученной смесью в изолированном модуле заполняли капсулы технологии доставки лекарств кишечнорастворимой капсулой 0 размера (ECDDT) (Capsugel®), полученные капсулы затем упаковывали во влагонепроницаемые/воздухонепроницаемые мешки (ПЭТ/Алюминий/ПА/ПЭ).

Продукты хранили при температуре от 2 до 8 °C, и подсчет клеток проводился после i) инкапсуляции и ii) через тринадцать месяцев после инкапсуляции. После инкапсуляции количество жизнеспособных клеток составляло $1,3 \times 10^{11}$, в то время как через тринадцать месяцев количество составляло $6,6 \times 10^{10}$. Количество жизнеспособных клеток на капсулу составляло $4,7 \times 10^{10}$ после инкапсуляции и $2,0 \times 10^{10}$ после 15 месяцев хранения. Никакой существенной потери количества клеток (<math><1</math> логарифма) не наблюдалось в течение периодов, превышающих 12 месяцев, что свидетельствует о стабильности продуктов при хранении.

Пример 3. Растворение изобретенных продуктов

Лекарственные формы, приготовленные в соответствии с примером 2, подвергали воздействию кислой среды (pH 1,2) в течение 2 часов при перемешивании лопастной мешалкой в соответствии с Фармакопеей США <math><711></math>. Признаков дезинтеграции, разрушения или высвобождения содержимого капсул не наблюдалось. Затем продукты переносили в моделируемую кишечную среду (pH 6,8), в результате чего капсулы быстро распадались.

Пример 4. Гастропротекторные свойства изобретенных лекарственных форм

Лекарственные формы, приготовленные в соответствии с примером 2, подвергали воздействию кислой среды (pH 1,2) в течение 30 минут с применением способа с использованием лопастной мешалки. Затем их переносили в моделируемую кишечную среду (pH 6,8) на 45 минут. Пример был выполнен в инертной атмосфере (непрерывная продувка азотом). Воздействие моделируемой кишечной среды на продукты приводило к полному высвобождению LBP из капсулы, и был проведен подсчет клеток. Не наблюдалось существенной потери количества клеток (<math><1</math> логарифма). Подсчет клеток

также проводился в кислой среде, и высвобождение LBP не было обнаружено, что подтверждает гастропротекторный эффект лекарственных форм настоящего изобретения.

Пример 5. MRX518 с аскорбиновой кислотой по сравнению с цистеином

Лиофилизат, содержащий *Enterococcus gallinarum*, был приготовлен со следующими композициями:

Вспомогательное вещество	С антиоксидантом цистеином (% по массе вспомогательных веществ лиофилизата)	С антиоксидантом аскорбиновой кислотой (% по массе вспомогательных веществ лиофилизата)
Сахароза	84,0%	84,0%
Маннит	14,5%	14,5%
Цистеин	1,5%	
Аскорбиновая кислота		1,5%

Массовое соотношение этих вспомогательных веществ лиофилизации : биомасса *Enterococcus gallinarum* в лиофилизате составляло 1:1.

Подсчет жизнеспособных клеток проводился перед процессом сублимационной сушки и после него, и результаты показаны ниже. Обе рецептуры подвергались идентичным циклам лиофилизации:

	С антиоксидантом цистеином	С антиоксидантом аскорбиновой кислотой
КОЕ/г замороженной биомассы (до лиофилизации)	$5,01 \times 10^{11}$	$6,01 \times 10^{11}$
КОЕ/г при лиофилизации (после лиофилизации)	$4,64 \times 10^{11}$	$2,97 \times 10^{11}$
Потеря (логарифм)	0,03	0,31

Такая же оценка количества жизнеспособных клеток до и после лиофилизации была проведена в другом месте, и результаты показаны ниже. И снова обе рецептуры были подвергнуты идентичным циклам лиофилизации:

	С антиоксидантом цистеином	С антиоксидантом аскорбиновой кислотой
КОЕ/г замороженной биомассы (до лиофилизации)	$7,34 \times 10^{11}$	$7,29 \times 10^{11}$
КОЕ/г при лиофилизации (после лиофилизации)	$7,19 \times 10^{11}$	$2,76 \times 10^{11}$
Потеря (логарифм)	0,01	0,42

Таким образом, очевидно, что использование цистеина в качестве антиоксиданта привело к значительному и неожиданному снижению потери количества жизнеспособных клеток во время цикла лиофилизации.

Пример 6. Долгосрочная стабильность *Enterococcus Gallinarum*

Затем цистеинсодержащий лиофилизат смешивали со смесью вспомогательных веществ без антиоксидантов и инкапсулировали в по сути энтеросолюбильные капсулы. Полученные лекарственные формы затем упаковывали в алюминиевую/алюминиевую блистерную упаковку и хранили в течение двенадцати месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

Подсчет жизнеспособных клеток проводили в лекарственной форме: i) после инкапсуляции, ii) через двенадцать месяцев после инкапсуляции и iii) через двадцать один месяц после инкапсуляции. После инкапсуляции количество клеток составляло 1×10^{11} КОЕ/г (7×10^{10} на капсулу). После 12 месяцев хранения количество клеток составляло 4×10^{10} КОЕ/г (3×10^{10} на капсулу). Количество КОЕ на капсулу, зарегистрированное после 21 месяца хранения, составило 3×10^{10} . Это демонстрирует, что рецептура не только защищает ЛВР во время лиофилизации, но также позволяет получать лекарственную форму для длительного хранения.

Такое длительное хранение не распространяется на бактерии, встречающиеся в природе в естественных условиях, а скорее является способом действия изобретенных рецептур, описанных в данном документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Перорально вводимая энтеросолюбильная лекарственная форма длительного хранения, содержащая живой биотерапевтический продукт, которая i) содержит антиоксидант, причем антиоксидант представляет собой цистеин, ii) не содержит карбонат натрия или карбонат кальция и/или iii) не содержит мальтодекстрин.
2. Лекарственная форма по п. 1, в которой количество жизнеспособных клеток живого биотерапевтического продукта (КОЕ/г) уменьшается не более чем на 1 логарифм при хранении лекарственной формы в течение 12 месяцев во влагонепроницаемой упаковке при температуре от 2 °С до 8 °С.
3. Лекарственная форма по п. 1 или 2, в которой живой продукт содержит облигатные анаэробные бактерии.
4. Лекарственная форма по любому из пп. 1-3, в которой живой биотерапевтический продукт содержит один штамм бактерий.
5. Лекарственная форма по любому из пп. 1-4, в которой живой биотерапевтический продукт состоит по существу из неспорулирующих бактерий.
6. Лекарственная форма по любому из пп. 1-5, в которой живой биотерапевтический продукт содержит бактерии, принадлежащие к видам *Blautia Hydrogenotrophica*, *Enterococcus gallinarum*, *Bacteroides thetaiotamicron*, *Roseburia hominis* и/или *Bifidobacterium breve*.
7. Лекарственная форма по любому из пп. 1-6, в которой живой биотерапевтический продукт содержит бактерии на уровне от 1×10^3 до 1×10^{11} КОЕ/г, исключая оболочку капсулы, если она присутствует, или энтеросолюбильное покрытие, если оно присутствует.
8. Лекарственная форма по любому из пп. 1-7, в которой живой биотерапевтический продукт присутствует в виде лиофилизата.
9. Лекарственная форма по п. 8, в которой лиофилизат дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ.
10. Лекарственная форма по любому из пп. 1-9, дополнительно содержащая одно или более вспомогательных веществ.
11. Лекарственная форма по любому из пп. 8-10, причем лекарственная форма содержит лиофилизат и одно или более вспомогательных веществ.
12. Лекарственная форма по любому из пп. 8-11, в которой лиофилизат, содержащийся в лекарственной форме, был получен посредством процесса лиофилизации, в котором живой биотерапевтический продукт не подвергается воздействию температуры выше примерно 75 °С, выше примерно 50 °С, выше примерно 40 °С или выше примерно 30 °С.
13. Стабильная при хранении лекарственная форма, содержащая эффективное количество живых анаэробных бактерий и антиоксидант, в которой эффективное количество живых анаэробных бактерий в колониеобразующих единицах (КОЕ) уменьшается не более чем на 1 логарифм при хранении лекарственной формы в течение

21 месяца в алюминиевой/алюминиевой блистерной упаковке при температуре примерно от 2°C до 8°C.

14. Гастропротекторная лекарственная форма, содержащая эффективное количество живых анаэробных бактерий и антиоксидант, в которой эффективное количество живых анаэробных бактерий в колониеобразующих единицах (КОЕ) снижается не более чем на 1 логарифм в моделируемой желудочной среде, как определено:

воздействием на лекарственную форму кислотной среды при pH 1,2 в течение 30 минут,

воздействием на лекарственную форму кишечной среды при pH 6,8 в течение 45 минут, и

сравнением количества КОЕ после воздействия (b) и перед воздействием (a).

15. Лекарственная форма по п. 13, в которой антиоксидант представляет собой цистеин или его соль.

16. Лекарственная форма по п. 133 или 14, в которой антиоксидант представляет собой аскорбиновую кислоту или ее соль.

17. Лекарственная форма по любому из пп. 13-16, в которой живые анаэробные бактерии включают факультативные анаэробные бактерии, облигатные анаэробные бактерии или микроаэрофильные бактерии.

18. Лекарственная форма по любому из пп. 133-177, в которой живые анаэробные бактерии представляют собой неспорулирующие бактерии.

19. Лекарственная форма по любому из пп. 13-18, в которой живые анаэробные бактерии принадлежат к видам *Blautia Hydrogenotrophica*, *Enterococcus gallinarum*, *Bacteroides thetaiotamicron*, *Roseburia hominis* или *Bifidobacterium breve*.

20. Лекарственная форма по любому из пп. 13-19, в которой эффективное количество составляет примерно от 1×10^3 до 1×10^{13} КОЕ/г по отношению к массе лекарственной формы.

21. Лекарственная форма по любому из пп. 13-20, в которой эффективное количество составляет примерно от 1×10^6 до 1×10^{11} КОЕ/г по отношению к массе лекарственной формы.

22. Лекарственная форма по любому из пп. 13-21, в которой живые анаэробные бактерии не подвергаются воздействию температуры выше примерно 50 °C.

23. Лекарственная форма по любому из пп. 1-22, причем лекарственная форма представляет собой капсулу.

24. Лекарственная форма по п. 23, причем лекарственная форма представляет собой по сути энтеросолюбильную капсулу.

25. Способ приготовления энтеросолюбильной лекарственной формы для перорального введения, содержащей живой биотерапевтический продукт, включающий:

i) получение живого биотерапевтического продукта и, необязательно, одного или более вспомогательных веществ,

ii-a) заполнение капсулы живым биотерапевтическим продуктом и вспомогательными веществами и закрывание капсулы для получения заполненной капсулы, или

ii-b) формирование сердцевин таблеток, содержащих живой биотерапевтический продукт и вспомогательные вещества, для получения сердцевин таблеток,

причем капсула является по сути энтеросолюбильной капсулой, или при этом способ включает iii) нанесение энтеросолюбильного покрытия на заполненные капсулы или сердцевины таблеток.

26. Способ по п. 25, в котором одно или более вспомогательных веществ содержат антиоксидант, причем антиоксидант представляет собой цистеин, ii) не содержит карбонат натрия кальция и/или iii) не содержит мальтодекстрин.

или карбонат

27. Способ по п. 26, в котором капсула является по сути энтеросолюбильной капсулой, и способ не включает этапы нанесения покрытия, сушки и/или соединения.

28. Способ по п. 25 или п. 27, в котором живой биотерапевтический препарат не подвергается воздействию температуры выше примерно 75 °С, выше примерно 50 °С, выше примерно 40°С или выше примерно 30°С во время этапов i), ii-a) и/или ii-b).

29. Способ по любому из пп. 25-28, в котором этапы i), ii-a) и/или ii-b) проводят в инертной окружающей среде.

30. Способ по любому из пп. 25-29, дополнительно включающий этап упаковки лекарственной формы, полученной на этапе ii-b) или этапе iii), в непроницаемый для воздуха и/или влаги контейнер.

По доверенности