

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202192291** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2022.02.11

(51) Int. Cl. *A61K 9/48* (2006.01)  
*A61K 35/74* (2015.01)  
*A61K 35/741* (2015.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.04.14

---

(54) **КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ СТАБИЛЬНУЮ В ТЕЧЕНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО  
ВРЕМЕНИ ЖИВУЮ ФЕКАЛЬНУЮ МИКРОБИОТУ**

---

(31) 19382287.1

(32) 2019.04.15

(33) EP

(86) PCT/EP2020/060370

(87) WO 2020/212297 2020.10.22

(71) Заявитель:

**ИНСТИТУТ Д'ИНВЕСТИГАСЬОНС  
БИОМЕДИКАС АУГУСТ ПИ И  
СУНЬЕР (ИДИБАПС); ФУНДАСЬО  
КЛИНИК ПЕР А ЛА РЕСЕРКА  
БИОМЕДИКА; ОСПИТАЛЬ  
КЛИНИК ДЕ БАРСЕЛОНА;  
УНИВЕРСИТАТ ДЕ БАРСЕЛОНА  
(ES)**

(72) Изобретатель:

**Сунье Негрэ Хосеп М., Сориано  
Виладомиу Алекс, Аира Гомес Андреа,  
Феер Ксаба (ES)**

(74) Представитель:

**Вахнин А.М. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к твердой фармацевтической композиции для приёма внутрь, содержащей фармацевтически эффективное количество живых микроорганизмов и одно или несколько фармацевтически приемлемых гигроскопичных вспомогательных веществ, при этом композиция имеет содержание воды, определенное в соответствии с Европейской фармакопеей 9.4, раздел 2.5.12, от 0,5 до 30% от общей массы композиции. Изобретение также относится к способам ее получения, а также к ее применению в терапевтических целях. Композиция на основе живых клеток в соответствии с настоящим изобретением является стабильной в мягких условиях.

**A1**

**202192291**

**202192291**

**A1**

## **КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ СТАБИЛЬНУЮ В ТЕЧЕНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ЖИВУЮ ФЕКАЛЬНУЮ МИКРОБИОТУ**

В этой заявке испрашивается преимущество приоритета заявки на европейский патент EP19382287.1, поданной 15 апреля 2019 г.

5 Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей стабильную живую фекальную микробиоту.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

10 Трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ) представляет собой перенос фекального материала, содержащего микроорганизмы, от здорового человека к больному реципиенту.

Традиционно трансплантация в верхний отдел желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) осуществляется с помощью назогастральной, назоудоденальной, назоэюнальной интубации или с помощью эзофагогастродуоденоскопии или активной энтероскопии. Доставку в нижний отдел желудочно-кишечного тракта обычно осуществляют с помощью 15 колоноскопии, ректороманоскопии или клизмы. Каждый из этих методов имеет свои недостатки. Например, введение микробиоты в верхние отделы желудочно-кишечного тракта сопряжено с риском осложнений, связанных с аспирацией (особенно при назогастральном ведении), и представляет собой инвазивную процедуру, неудобную для реципиентов. Методы доставки в нижние отделы желудочно-кишечного тракта, такие как 20 колоноскопия и ректороманоскопия, также являются инвазивными и неудобными, и, кроме того, связаны со значительными затратами и рисками.

Таким образом, сохраняется потребность в безопасном, эффективном и менее инвазивном способе доставки сообществ микроорганизмов реципиентам (например, трансплантация фекальных масс или трансплантация фекальной микробиоты).

25 В процессе разработки инкапсулированных лекарственных форм для приёма внутрь, содержащих сообщества микроорганизмов, использовались два подхода: (а) сверхбыстрое замораживание водного раствора фекалий и (б) лиофилизация.

Первый подход предусматривает сверхбыстрое замораживание водного раствора фекалий в глицерине и солевом буфере. Водный раствор обеспечивает сохранение 30 жизнеспособности штаммов микроорганизмов, но данная процедура приводит к существенной нестабильности капсул, поскольку водорастворимые капсулы быстро разрушаются в водном растворе фекалий. Физическая нестабильность этих капсул затрудняет их массовое производство и создает клинические риски, поскольку капсулы могут разрушаться во время приёма. Такая нестабильность приводит к необходимости

хранения капсул при  $-70/-80^{\circ}\text{C}$  до момента их использования (т. е. до момента, когда их необходимо разморозить). Нестабильность капсул, наряду с необходимостью применения «сложных» устройств, ограничивает применение терапии фекальной микробиотой (ТФМ) условиями стационара под особым медицинским наблюдением. Таким образом, пациент, которому требуется данный вид терапии, должен отправиться в больницу, где есть все необходимые средства для замораживания и размораживания капсул. Однако это может привести к несоблюдению режима лечения, что в свою очередь приведет к отсутствию у пациента приверженности к лечению.

Было предпринято несколько попыток уменьшить содержание водного компонента фекалий. Одним из основных способов является обезвоживание сообщества микроорганизмов с помощью таких технологий, как лиофилизация. Однако процесс обезвоживания является крайне трудоемким и значительно снижает жизнеспособность микроорганизмов. Кроме того, иногда обезвоживание сообщества микроорганизмов не позволяет достичь соответствующего уровня стабильности, и для этой цели необходимо разрабатывать специальные контейнеры. В качестве примера в патенте KR20080059605 описывается упаковка лиофилизированных бактерий в контейнер с особой конструкцией для снижения влажности окружающей среды при контакте с капсулой. В этом корейском патентном документе предоставлены, помимо прочего, данные о стабильности лиофилизированных бактерий со вспомогательными веществами (Пример 6) или без них (Пример 5). В Примере 6 представлены данные о капсулах, содержащих лиофилизированные бактерии вместе с микрокристаллической целлюлозой и магния стеаратом. Примечательно, что капсулы без вспомогательных веществ были более стабильными при хранении в одних и тех же контейнерах по сравнению с капсулами с готовой смесью, содержащей вспомогательные вещества.

Несмотря на предпринятые усилия в этом направлении, сохраняется неудовлетворенная потребность в стабильной ТФМ на основе живых бактериальных клеток в домашних условиях.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторами настоящего изобретения были созданы капсулы с живой микробиотой, достаточно стабильные для хранения при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$ , а не при  $-65^{\circ}\text{C}$  или  $-80^{\circ}\text{C}$ , что обеспечивает возможность хранения данных капсул в обычном холодильнике в домашних условиях.

Как будет показано далее, авторы настоящего изобретения сначала получили смесь осадка фекальной микробиоты (полученной из водного раствора фекалий в глицерине) с микрокристаллической целлюлозой (далее обозначаемой МКЦ) и смазывающим

веществом (магния стеаратом). После приготовления капсул с этой смесью было установлено, что содержание в них влаги, определенное согласно Европейской фармакопее 9.4, раздел 2.5.12, составляет около 30% от общей массы композиции (см. таблицу 1).

5            Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что вышеупомянутые капсулы с живой микробиотой в среде, содержащей около 30% воды, оставались стабильными в течение 3 месяцев при +4°C (температура, соответствующая температуре в холодильнике) даже при таком высоком содержании влаги. В таблице 1 показано, что добавление гигроскопичного вспомогательного вещества обеспечивает такой же уровень  
10 стабильности инкапсулированной живой микробиоты, как и в случае лиофилизированной микробиоты. Таким образом, добавление гигроскопичного вспомогательного вещества является эффективной альтернативой процессу лиофилизации (последний более негативно сказывается на жизнеспособности бактерий).

С учетом известного уровня техники этот результат является неожиданным. Как  
15 указано выше, известный уровень техники предусматривает два способа получения стабильной инкапсулированной фекальной микробиоты: путем снижения температуры примерно до -80°C (при этом получается замороженная фекальная микробиота) или путем максимального снижения содержания воды за счет лиофилизации фекальной микробиоты. Даже в недавних работах сообщается об инкапсуляции лиофилизированных бактерий и  
20 упаковке полученных лиофилизированных бактерий в специальный контейнер, что позволяет еще больше снизить содержание влаги внутри контейнера (см., например, патент Южной Кореи KR20080059605). Поэтому изобретение, описываемое здесь, а именно получение стабильной живой фекальной микробиоты (которая имеет более высокое содержание влаги по сравнению с лиофилизированной) при более мягких  
25 температурах, является неожиданным для известного уровня техники.

Стабильность капсул отмечалась не только с точки зрения жизнеспособности бактерий, но и в отношении морфологии капсул. Как будет показано далее, после хранения капсул, состоящих из фекальной микробиоты и гигроскопичного вспомогательного вещества (МКЦ), в течение 3 месяцев при +4°C не было обнаружено  
30 изменений в отношении их длины, ширины или запаха.

Таким образом, композиция настоящего изобретения является значительным прогрессом в области трансплантации фекальной микробиоты (ТФМ), поскольку реципиент может осуществлять лечение дома без транспортировки в медицинское учреждение. Еще одно преимущество состоит в повышении приверженности терапии

благодаря большому удобству для пациентов и, как следствие, более строгому соблюдению режима терапии.

Таким образом, первый аспект настоящего изобретения относится к твердой фармацевтической композиции для приёма внутрь, содержащей фармацевтически эффективное количество живых микроорганизмов и одно или несколько фармацевтически приемлемых гигроскопичных вспомогательных веществ, при этом смесь имеет содержание воды, определенное в соответствии с Европейской фармакопеей 9.4, раздел 2.5.12, от 0,5% до 30% от общей массы композиции.

Второй аспект настоящего изобретения относится к способу получения фармацевтической композиции для приёма внутрь, как определено в первом аспекте изобретения, при этом способ предусматривает смешивание живых микроорганизмов с одним или несколькими гигроскопичными вспомогательными веществами.

Преимуществом настоящего изобретения по сравнению с известным уровнем техники является то, что для способа получения композиции настоящего изобретения требуется выполнение нескольких этапов в мягких условиях (комнатная температура и нормальные значения влажности воздуха), что позволяет минимизировать риски потери жизнеспособных бактерий.

Третий аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции для приёма внутрь, которую получают способом, определенном во втором аспекте настоящего изобретения.

Четвертый аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции для приёма внутрь, определенной в первом или третьем аспекте изобретения для применения в терапии.

Впервые сообщается о способности гигроскопичного вспомогательного вещества стабилизировать инкапсулированные живые микроорганизмы. Фактически, исходя из данных, представленных в корейском патенте KR20080059605, квалифицированный специалист мог бы ожидать, что гигроскопичные вспомогательные вещества отрицательно влияют на стабильность микробиоты при сравнении данных, представленных в примерах 5 и 6 известного уровня техники.

Не углубляясь в теорию, авторы настоящего изобретения полагают, что такой неожиданный эффект обусловлен тем фактом, что гигроскопичное вспомогательное вещество (такое как МКЦ, как показано ниже) взаимодействует с водой, присутствующей в осадке фекальной микробиоты таким образом, что часть воды остается «свободной», а незначительное ее количество абсорбируется в виде «структурированной воды», причем последняя приводит к образованию молекулярной губки. Таким образом, твердая

фармацевтическая композиция будет содержать примерно до 30% воды (что соответствует содержанию воды в исходном осадке фекальной микробиоты, использованном при изготовлении капсулы), но большая часть этой воды будет находиться внутри своеобразной «губки» (физическое тело, образованное абсорбирующим вспомогательным веществом). Такая «губка» может действовать как резервуар для воды или защитный барьер: живая микробиота внутри капсулы при определенных условиях окружающей среды может постепенно использовать воду, имеющуюся в капсуле. Следовательно, гигроскопичное вспомогательное вещество может оказывать стабилизирующее действие благодаря содержанию воды в смеси.

10 Вышесказанное объясняет, почему в корейском патенте 20080059605 то же гигроскопичное вспомогательное вещество (МКЦ) не может обеспечить такой стабилизирующий эффект: вспомогательное вещество не может стабилизировать микроорганизм, потому что оно не может абсорбировать достаточное количество воды, потому что (а) бактерии лиофилизированы (т. е. не содержат значительного количества  
15 воды), и (б) влажность окружающей среды низкая из-за особой конструкции контейнера.

Таким образом, пятый аспект настоящего изобретения относится к применению гигроскопичного вспомогательного вещества для стабилизации живых микроорганизмов в твердой фармацевтической композиции для приёма внутрь.

Наконец, настоящее изобретение дополнительно относится к твердой композиции для приёма внутрь, как определено в первом или третьем аспекте изобретения, для применения при лечении заболевания, связанного с дисбактериозом. В качестве альтернативы этот аспект может быть сформулирован как применение твердой композиции для приёма внутрь, как определено в первом или третьем аспекте изобретения, при производстве лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с дисбактериозом. В качестве альтернативы этот аспект может быть сформулирован как способ лечения или предотвращения заболевания, связанного с дисбактериозом, причем способ включает в себя введение терапевтически эффективного количества композиции, как определено в первом или третьем аспекте изобретения  
25 нуждающемуся в этом субъекту.

## 30 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Все термины, используемые в данной заявке, если не указано иное, следует понимать в их обычном значении, известном из уровня техники. Другие более конкретные определения некоторых терминов, используемых в настоящей заявке, изложены ниже и предназначены для единообразного применения во всем описании и формуле  
35 изобретения, если иное четко сформулированное определение не предоставляет более

широкое определение. Кроме того, для целей настоящего изобретения любые указанные диапазоны включают как нижнюю, так и верхнюю конечные точки диапазона. Указанные диапазоны, такие как температура, время, масса и т. д., следует считать приблизительными, если не указано иное.

5 Как указано выше, в первом аспекте настоящее изобретение относится к твердой фармацевтической композиции для приёма внутрь, содержащей живые микроорганизмы и одно или несколько гигроскопичных вспомогательных веществ.

Используемый здесь термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству живых микроорганизмов, которое при введении является достаточным для предотвращения развития или облегчения до некоторой степени одного или нескольких  
10 симптомов заболевания, которое подлежит лечению. Конкретная доза живых микроорганизмов, вводимая в соответствии с настоящим изобретением, конечно, будет определяться конкретными обстоятельствами конкретного случая, включая вводимое соединение, способ введения, конкретное заболевание, которое подлежит лечению, и  
15 подобные соображения.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к тем композициям, которые оказывают благоприятное воздействие на человека и животных.

В одном варианте осуществления первого аспекта изобретения, при необходимости в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, представленных ниже,  
20 живой микроорганизм представляет собой пробиотический микроорганизм или фекальную микробиоту. В другом варианте осуществления изобретения, при необходимости в комбинации с любым из вариантов осуществления, приведенных выше или ниже, живые микроорганизмы представляют собой фекальную микробиоту.

В данном контексте термин «микробиота» относится к сообществу  
25 микроорганизмов,

которое развивается (устойчиво или временно) в и на животном (обычно млекопитающем, например, человеке), включая эукариоты, археи, бактерии, грибы, такие как дрожжи, и вирусы (включая бактериофаги, т. е. фаги). Фекальная микробиота содержит неизвестное, но большое количество видов микроорганизмов.

30 В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) композиция содержит одно гигроскопичное вспомогательное вещество.

В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или  
35 далее) гигроскопичное вспомогательное вещество выбрано из: вспомогательного

вещества на основе целлюлозы или его фармацевтически приемлемой соли; каолинита; талька; палыгорскита; сепиолита; коллоидного диоксида кремния; и смектитов (среди которых наиболее широко используются монтмориллонит, сапонит и гекторит). В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с

5 любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) гигроскопичное вспомогательное вещество представляет собой вспомогательное вещество на основе целлюлозы. В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) гигроскопичное вспомогательное вещество представляет

10 собой производное простого эфира целлюлозы (такого как алкиловый (например,  $C_{1-10}$ -алкиловый) эфир, гидроксисалкиловый (например,  $HO-(C_{1-10})$ алкиловый) эфир или карбоксисалкиловый (например,  $OH(O)C-(C_{1-10})$ алкиловый) эфир или его фармацевтически приемлемая соль), сложного эфира целлюлозы (например, производное ацетата целлюлозы, триацетата целлюлозы, пропионата целлюлозы, пропионата ацетата

15 целлюлозы (CAP), бутирата ацетата целлюлозы (CAB)) или их смесь (т.е. одно или несколько производных простого эфира с одним или несколькими производными простого эфира, одно или несколько производных простого эфира с одним или несколькими сложноэфирными производными или одно или несколько сложноэфирных производных с одним или несколькими сложноэфирными производными). В другом

20 варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) вспомогательное вещество на основе целлюлозы выбрано из: метилцеллюлозы, этилцеллюлозы, этилметилцеллюлозы, гидроксиэтилцеллюлозы, гидроксиэтилметилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, гидроксипропилэтилцеллюлозы,

25 карбоксиметилцеллюлозы и микрокристаллической целлюлоза (МКЦ). В одном варианте осуществления изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) гигроскопичное вспомогательное вещество представляет собой производное простого эфира целлюлозы. В

30 другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) гигроскопичное вспомогательное вещество представляет собой МКЦ. В другом варианте осуществления композиции первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, представленных выше)

35 она включает в себя фекальную микробиоту и МКЦ.

Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к тем солям, которые, в рамках обоснованного медицинского заключения, подходят для использования в контакте с тканями людей и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т. п., и обеспечивают разумное соотношение «польза/риск». Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны из уровня техники. Примерами фармацевтически приемлемых нетоксичных кислотно-аддитивных солей являются соли аминогруппы, образованные с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и хлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, трифторуксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с использованием других способов, используемых в данной области техники, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают в себя адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, fumarat, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат, ундеканоат, валерат и т. п. Соли, полученные из соответствующих оснований, включают в себя соли щелочных металлов, щелочноземельных металлов и аммония. Типичные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают в себя соли натрия, лития, калия, кальция, магния и т. п. Другие фармацевтически приемлемые соли включают в себя, при необходимости, нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и аминов, образованные с использованием противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, низший алкилсульфонат и арилсульфонат.

Фармацевтическая композиция настоящего изобретения характеризуется содержанием воды до 30%. В одном варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) содержание воды составляет от 1% до 30%, от 5% до 30% или от 9% до 30% по отношению к общей массе композиции. В качестве альтернативы фармацевтическая композиция первого аспекта изобретения имеет содержание воды 1, 2,

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30% по отношению к общей массе композиции.

В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или

5 далее) твердая фармацевтическая композиция для приёма внутрь имеет содержание воды от 1% до 30%, от 5% до 30% или от 9% до 30% относительно общей массы композиции, и гигроскопичное вспомогательное вещество выбрано из: вспомогательного вещества на основе целлюлозы или его фармацевтически приемлемой соли; каолинита; талька; палыгорскита; сепиолита; коллоидного диоксида кремния и смектиты (среди которых

10 наиболее широко используются монтмориллонит, сапонит и гекторит). В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) твердая фармацевтическая композиция для приёма внутрь имеет содержание воды от 1% до 30%, от 5% до 30% или от 9% до 30% по отношению к общей массе композиции, а

15 гигроскопичное вспомогательное вещество представляет собой вспомогательное вещество на основе целлюлозы. В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) твердая фармацевтическая композиция для приёма внутрь имеет содержание воды от 1% до 30%, от 5% до 30% или от 9% до 30% по отношению к

20 общей массе композиции, и гигроскопичное вспомогательное вещество представляет собой производное простого эфира целлюлозы (такого как алкиловый (например, C<sub>1-10</sub>-алкиловый) эфир, гидроксиалкиловый (например, HO-(C<sub>1-10</sub>)алкиловый) эфир или карбоксиалкиловый (например, OH(O)C-(C<sub>1-10</sub>)алкиловый) эфир или его фармацевтически приемлемая соль), сложного эфира целлюлозы (например, производное ацетата

25 целлюлозы, триацетата целлюлозы, пропионата целлюлозы, пропионата ацетата целлюлозы (CAP), бутирата ацетата целлюлозы (CAB)) или их смесь (т. е. одно или несколько производных простого эфира с одним или несколькими производными простого эфира, одно или несколько производных простого эфира с одним или несколькими сложноэфирными производными или одно или несколько сложноэфирных

30 производных с одним или несколькими сложноэфирными производными). В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) твердая фармацевтическая композиция для приёма внутрь имеет содержание воды от 1% до 30%, от 5% до 30% или от 9% до 30% по отношению к общей массе композиции, а

35 вспомогательное вещество на основе целлюлозы выбрано из метилцеллюлозы,



вспомогательных веществ являются смазывающие вещества, криопротекторы и тому подобное. За исключением случаев, когда любая традиционная вспомогательная среда несовместима с веществом или его производными, например, вызывая какой-либо нежелательный биологический эффект или иным образом отрицательно взаимодействуя с  
5 любым другим компонентом(-ами) фармацевтической композиции, ее использование предполагается в рамках объема данного изобретения.

В одном варианте осуществления композиции первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) она дополнительно содержит одно или несколько  
10 фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, выбранных из: криопротектора, смазывающего вещества и их комбинации.

Композиция может содержать, по меньшей мере, один криопротектор. Примерами криопротекторов, которые можно использовать, являются глицерин, углеводы, водорастворимые антиоксиданты, такие как натрия аскорбат, глутатион, рибофлавин, L-  
15 цистеин и их фармацевтически приемлемые соли или их комбинации. В одном варианте осуществления композиции первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) композиция содержит криопротектор. В другом варианте осуществления композиции первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов  
20 осуществления изобретения, приведенных выше или далее) композиция содержит глицерин.

В другом варианте осуществления композиции первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) она содержит криопротектор и смазывающее вещество. В  
25 другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) композиция дополнительно содержит глицерин и смазывающее вещество. В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее)  
30 композиция дополнительно содержит криопротектор и соль стеариновой кислоты. В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) композиция дополнительно содержит глицерин и соль стеариновой кислоты. В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в

комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) композиция дополнительно содержит глицерин и магния стеарат.

В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или  
5 далее) композиция содержит: фекальную микробиоту, производное целлюлозы, соль стериновой кислоты и криопротектор. В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) композиция содержит: фекальную микробиоту, производное простого эфира целлюлозы, соль стеариновой кислоты и  
10 глицерин. В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) композиция содержит: фекальную микробиоту, МКЦ, соль стеариновой кислоты и глицерин. В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или  
15 далее) композиция содержит: фекальную микробиоту, МКЦ, соль стеариновой кислоты и глицерин. В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) композиция содержит: фекальную микробиоту, производное простого эфира целлюлозы, магния стеарат и глицерин. В другом варианте осуществления первого  
20 аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) композиция содержит фекальную микробиоту, МКЦ, магния стеарат и глицерин.

В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или  
25 далее) твердая фармацевтическая композиция для приёма внутрь представляет собой капсулу, т. е. одиночную твердую или мягкую капсулу. В настоящем изобретении термин «одиночная капсула» означает, что фармацевтическая композиция для приёма внутрь состоит только из одной капсулы, содержащей микробиоту и адсорбент(-ы). Следовательно, этот вариант осуществления изобретения (т.е. «одиночная капсула») не  
30 включает в себя возможность того, что капсула, содержащая микробиоту и адсорбент(-ы), находится внутри другой капсулы. В другом варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) твердая фармацевтическая композиция для приёма внутрь состоит из одиночной капсулы, состоящей из микробиоты и  
35 адсорбента(-ов).

Используемый здесь термин «капсула» относится к обычной твердой капсуле, предназначенной для перорального введения человеку или животному. Капсулы настоящего изобретения структурно не отклоняются от общепринятого определения твердых капсул. Когда в данном документе упоминается «капсула», это относится к 5 внешней или внутренней капсуле или внешней капсуле, содержащей внутреннюю капсулу, если контекст не указывает иное. Обычно термин «капсула» относится как к пустым, так и к заполненным капсулам, тогда как термин «оболочка» конкретно относится к пустой капсуле.

Как известно среднему специалисту в данной области техники, имеющиеся в 10 продаже капсулы, представленные в виде обычных капсул или удлиненных капсул, обозначаются номерами и суффиксом «el» для удлиненных капсул.

Еще одно преимущество состоит в том, что для изготовления капсул настоящего изобретения не требуется сушка, которая может привести к значительной потере жизнеспособных бактерий: достаточно просто заполнить капсулу смесью (с помощью 15 любой из обычных технологий, известных из уровня техники).

В одном варианте осуществления первого аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) композиция представляет собой кишечнорастворимую капсулу. Термин «кишечнорастворимые капсулы» означает капсулы, обладающие кишечнорастворимыми 20 свойствами. Термин «кишечнорастворимые свойства» означает, что капсула может быть растворимой или разрушаться под действием щелочных кишечных секретов, но по существу нерастворима или устойчива к растворению в кислотных секретах желудка. Также в продаже имеются кишечнорастворимые капсулы для заполнения смесью, представленной в настоящем изобретении.

25 Все варианты осуществления, представленные в соответствии с первым аспектом изобретения, также являются вариантами осуществления второго, третьего, четвертого и пятого аспектов изобретения.

Во втором аспекте настоящего изобретения предложен способ получения композиции первого аспекта изобретения.

30 В одном варианте осуществления способ проводят при комнатной температуре и относительной влажности комнатных условий.

Термин «комнатная температура» относится к температуре без нагрева или охлаждения от +15 до +25°C.

35 Термин «относительная влажность комнатных условий» означает, что процесс выполняется при определенном значении относительной влажности воздуха. В одном

варианте осуществления изобретения(не обязательно в сочетании с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) относительная влажность составляет от 50 до 80%. В одном варианте осуществления изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или  
5 далее) относительная влажность составляет  $60\% \pm 5\%$ .

В одном варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) способ включает в себя смешивание избытка по массе вспомогательного вещества (веществ) по отношению к количеству живых микроорганизмов, которое выражается в  
10 единицах объёма. Когда композиция настоящего изобретения содержит более одного гигроскопичного вспомогательного вещества, выражение «избыток по массе вспомогательных веществ» означает, что общее количество гигроскопичных вспомогательных веществ превышает объём живых микроорганизмов.

В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в  
15 комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) соотношение между количеством живых микроорганизмов, выраженным в единицах объёма, и количеством гигроскопичного вспомогательного вещества (веществ), выраженного в единицах массы, составляет от  $0,1 : 1$  до  $0,99 : 1$ , предпочтительно от  $0,70 : 1$  до  $0,95 : 1$ . Когда композиция настоящего изобретения содержит более одного  
20 гигроскопичного вспомогательного вещества, выражение «количество гигроскопичных вспомогательных веществ» относится к общему количеству этих вспомогательных веществ.

В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или  
25 далее) композиция содержит смазывающее вещество, и соотношение по массе между гигроскопичным агентом(-ами) и смазывающим веществом составляет от  $30 : 1$  до  $70 : 1$ , предпочтительно от  $40 : 1$  до  $60 : 1$ , более предпочтительно  $50 : 1$ .

В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или  
30 далее) живые микроорганизмы представляют собой экстракт фекальной микробиоты.

Экстракт фекальной микробиоты может быть получен способом, включающим в себя этапы: (а) предоставления фекального материала, полученного от подходящего донора; и (b) подвергания фекального материала, по меньшей мере, одному этапу обработки в условиях, при которых из фекального материала получают  
35 гомогенизованную композицию бактерий, архей, грибов и вирусов.

Фекальные массы должны быть защищены от кислорода, например путем покрытия образца сразу после его получения физиологическим раствором с пониженным содержанием кислорода и выполнения большей части обработки в анаэробной среде либо с использованием анаэробной камеры, либо путем продувки, например, Ar, N<sub>2</sub> или CO<sub>2</sub>.

5 В одном варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) фекалии и физиологический раствор гомогенизируют, фильтруют и центрифугируют. Надосадочную жидкость удаляют, а осадок смешивают с глицерином в качестве криопротектора для получения экстракта фекальной микробиоты.

10 В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) способ включает в себя:

(a) получение экстракта фекальной микробиоты;

(b) смешивание экстракта фекальной микробиоты с одним или несколькими  
15 гигроскопичными вспомогательными веществами, как определено в любом из вариантов осуществления изобретения, представленных выше.

В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) способ включает в себя:

20 (a) получение экстракта фекальной микробиоты путем: (a.1) гомогенизации фекалий с физиологическим раствором, (a.2) фильтрации раствора, (a.3) центрифугирования и (a.4) смешивания осадка с криопротектором;

(b) смешивание экстракта фекальной микробиоты с одним или несколькими  
25 гигроскопичными вспомогательными веществами, как определено в любом из вариантов осуществления изобретения, представленных выше.

В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) способ включает в себя:

30 (a) получение экстракта фекальной микробиоты путем: (a.1) гомогенизации фекалий с физиологическим раствором, (a.2) фильтрации раствора, (a.3) добавления криопротектора и (a.4.) центрифугирования;

(b) смешивание экстракта фекальной микробиоты с одним или несколькими  
гигроскопичными вспомогательными веществами, как определено в любом из вариантов осуществления изобретения, представленных выше.

В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления, приведенных выше или далее) способ включает в себя:

(а) получение экстракта фекальной микробиоты путем: (а.1) гомогенизации фекалий с физиологическим раствором и криопротектором (таким как глицерин), при этом процентное содержание криопротектора по объёму по отношению к общему объёму раствора составляет от 5 до 15% или 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15% (о/о), (а.2) фильтрации раствора, (а.3) добавления криопротектора в% по объёму по отношению к общему объёму раствора от 10 до 50%, от 10 до 40%, от 15 до 35% или 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35% (о/о) и (а.4) центрифугирования; и (b) смешивание экстракта фекальной микробиоты с одним или несколькими гигроскопичными вспомогательными веществами, как определено в любом из вариантов осуществления изобретения, представленных выше.

В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) способ включает в себя:

(а) получение экстракта фекальной микробиоты путем: (а.1) гомогенизации фекалий с физиологическим раствором и криопротектором (таким как глицерин), где процентное содержание по объёму криопротектора по отношению к общему объёму раствора составляет 10% (о/о), (а.2) фильтрования раствора, (а.3) добавления криопротектора в% по объёму по отношению к общему объёму раствора 20% (о/о) и (а.4) центрифугирования; и (b) смешивание экстракта фекальной микробиоты с одним или несколькими гигроскопичными вспомогательными веществами, как определено в любом из вариантов осуществления изобретения, представленных выше.

В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) способ включает в себя:

(а) получение экстракта фекальной микробиоты путем: (а.1) гомогенизации фекалий с физиологическим раствором, (а.2) фильтрации раствора, (а.3) центрифугирования и (а.4) смешивания осадка с глицерином;

(b) смешивание экстракта фекальной микробиоты с одним гигроскопичным вспомогательным веществом, как определено в любом из вариантов осуществления изобретения, представленных выше.

В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) способ получения капсулы включает в себя:

- (а) получение экстракта фекальной микробиоты;
- 5 (b) смешивание экстракта фекальной микробиоты с одним или несколькими гигроскопичными вспомогательными веществами, как определено в любом из вариантов осуществления изобретения, представленных выше;
- (с) добавление одного или нескольких дополнительных фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ; и
- 10 (d) капсулирование полученной смеси.

В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) способ получения капсулы включает в себя:

- (а) получение экстракта фекальной микробиоты путем: (а.1) гомогенизации
- 15 фекалий с физиологическим раствором, (а.2) фильтрации раствора, (а.3) центрифугирования и (а.4) смешивания осадка с криопротектором;
- (b) смешивание экстракта фекальной микробиоты с одним гигроскопичным вспомогательным веществом, как определено в любом из вариантов осуществления изобретения, представленных выше;
- 20 (с) добавление одного или нескольких фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ; и
- (d) капсулирование полученной смеси.

В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или

25 далее) способ получения капсулы включает в себя:

- (а) получение экстракта фекальной микробиоты путем: (а.1) гомогенизации фекалий с физиологическим раствором, (а.2) фильтрации раствора, (а.3) центрифугирования и (а.4) смешивания осадка с криопротектором;
- (b) смешивание экстракта фекальной микробиоты с одним или несколькими
- 30 гигроскопичными вспомогательными веществами, как определено в любом из вариантов осуществления изобретения, представленных выше;
- (с) добавление смазывающего вещества; и
- (d) капсулирование полученной смеси.

В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) способ получения капсулы включает в себя:

5 (а) получение экстракта фекальной микробиоты путем: (а.1) гомогенизации фекалий с физиологическим раствором, (а.2) фильтрации раствора, (а.3) центрифугирования и (а.4) смешивания осадка с криопротектором;

(b) смешивание экстракта фекальной микробиоты с вспомогательным веществом на основе целлюлозы, как определено в любом из вариантов осуществления изобретения, представленных выше;

10 (с) добавление одного или нескольких дополнительных фармацевтически или ветеринарно приемлемых вспомогательных веществ; и

(d) капсулирование полученной смеси.

В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или

15 далее) способ получения капсулы включает в себя:

(а) получение экстракта фекальной микробиоты путем: (а.1) гомогенизации фекалий с физиологическим раствором, (а.2) фильтрации раствора, (а.3) центрифугирования и (а.4) смешивания осадка с криопротектором;

20 (b) смешивание экстракта фекальной микробиоты с производным целлюлозы, как определено выше;

(с) добавление смазывающего вещества; и

(d) капсулирование полученной смеси.

В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или

25 далее) способ получения капсулы включает в себя:

(а) получение экстракта фекальной микробиоты путем: (а.1) гомогенизации фекалий с физиологическим раствором, (а.2) фильтрации раствора, (а.3) центрифугирования и (а.4) смешивания осадка с криопротектором;

(b) смешивание экстракта фекальной микробиоты с МКЦ;

30 (с) добавление стеарата; и

(d) капсулирование полученной смеси.

В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) способ получения капсулы включает в себя:

(а) получение экстракта фекальной микробиоты путем: (а.1) гомогенизации фекалий с физиологическим раствором, (а.2) фильтрации раствора, (а.3) центрифугирования и (а.4) смешивания осадка с криопротектором;

5 (b) смешивание экстракта фекальной микробиоты с МКЦ, при этом количество МКЦ, выраженное в единицах массы, добавляют в избытке по отношению к количеству экстракта фекальной микробиоты, выраженному в единицах объема;

(с) добавление стеарата; и

(d) капсулирование полученной смеси.

10 В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) способ получения капсулы включает в себя:

(а) получение экстракта фекальной микробиоты путем: (а.1) гомогенизации фекалий с физиологическим раствором, (а.2) фильтрации раствора, (а.3) добавления криопротектора, (а.4.) центрифугирования и (а. 5.) экстрагирования;

15 (b) смешивание экстракта фекальной микробиоты с одним или несколькими гигроскопичными вспомогательными веществами, как определено в любом из вариантов осуществления изобретения, представленных выше;

(с) добавление одного или нескольких дополнительных фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, таких как смазывающее вещество; и

20 (d) капсулирование полученной смеси.

В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) способ получения капсулы включает в себя:

25 (а) получение экстракта фекальной микробиоты путем: (а.1) гомогенизации фекалий с физиологическим раствором и криопротектором (таким как глицерин), при этом процентное содержание криопротектора по объёму по отношению к общему объёму раствора составляет от 5% до 15% или 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15% (о/о), (а.2) фильтрации раствора, (а.3) добавления криопротектора в процентах по объёму по отношению к общему объёму раствора от 10 до 50%, от 10 до 40%, от 15 до 35% или 15,  
30 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35% (о/о), (а.4) центрифугирования; и (а.5.) выделения экстракта;

(b) смешивание экстракта фекальной микробиоты с одним или несколькими гигроскопичными вспомогательными веществами, как определено в любом из вариантов осуществления изобретения, представленных выше;

(с) добавление одного или нескольких дополнительных фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, таких как смазывающее вещество; и

(d) капсулирование полученной смеси.

В другом варианте осуществления второго аспекта изобретения (не обязательно в комбинации с любым из вариантов осуществления изобретения, приведенных выше или далее) способ получения капсулы включает в себя:

(а) получение экстракта фекальной микробиоты путем: (а.1) гомогенизации фекалий с физиологическим раствором и криопротектором (таким как глицерин), где процентное содержание по объёму криопротектора по отношению к общему объёму раствора составляет 10% (о/о), (а.2) фильтрации раствора, (а.3) добавления криопротектора в% по объёму по отношению к общему объёму раствора 20% (о/о), (а.4) центрифугирования и (а.5) выделения экстракта;

(b) смешивание экстракта фекальной микробиоты с одним или несколькими гигроскопичными вспомогательными веществами, как определено в любом из вариантов осуществления изобретения, представленных выше;

(с) добавление одного или нескольких дополнительных фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, таких как смазывающее вещество; и

(d) капсулирование полученной смеси.

Твердая композиция настоящего изобретения применима для заселения желудочно-кишечного тракта любого субъекта, такого как реципиент-человек, путем перорального введения субъекту эффективного количества композиции, содержащей микроорганизмы. В зависимости от тяжести и текущего статуса заболевания, нарушения или медицинского состояния реципиент может считаться пациентом, и термин «нуждающийся в этом субъект» включает в себя и то, и другое. Если в контексте не указано иное, то все три термина предназначены для обозначения человека или животного, принимающего одну или несколько капсул настоящего изобретения.

Используемый здесь термин «субъект» относится к любому млекопитающему, включая без ограничений, домашний скот и других сельскохозяйственных животных (таких как крупный рогатый скот, козы, овцы, лошади, свиньи и куры), служебных животных (таких как скаковые лошади), животных-компаньонов (например, кошки и собаки), лабораторных животных и людей. Обычно субъектом является человек.

Капсулы, содержащие композицию, могут применяться для лечения, профилактики, отсрочки или уменьшения симптомов заболеваний, связанных с дисбактериозом (дисбаланс или дезадаптация микроорганизмов на или в организме). Более конкретно, капсулы из настоящего изобретения могут применяться для

предотвращения или лечения инфекций, вызванных *C. difficile*, *Salmonella* spp., энтеропатогенной *E. coli*, бактериями с множественной лекарственной устойчивостью, такими как *Klebsiella* и *E. coli*, устойчивыми к карбапенему Enterobacteriaceae (CRE), энтерококками, устойчивыми к бета-лактамам антибиотикам расширенного спектра (ESBL), и энтерококками, устойчивыми к ванкомицину (VRE).

В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта есть воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), например болезнь Крона, колит (например язвенный колит или микроскопический колит) или резервуарный илеит; или имеется синдром раздраженного кишечника или функциональная диспепсия. В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта есть заболевание печени, такое как неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), печеночная энцефалопатия, первичный склерозирующий холангит (ПСХ), аутоиммунный гепатит или лекарственное поражение печени. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект страдает аутоиммунным заболеванием, таким как целиакия или эозинофильный эзофагит. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект страдает гиперпролиферативным заболеванием или злокачественным новообразованием желудочно-кишечного тракта, таким как колоректальный рак / полипы, рак пищевода или пищевод Баретта. В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта есть метаболическое заболевание, такое как метаболический синдром, сахарный диабет 1 или 2 типа, ожирение, недостаточность питания или гипотрофия, или сердечно-сосудистое заболевание (например, атеросклероз). В других вариантах осуществления изобретения субъект страдает ревматологическим заболеванием, таким как воспалительный артрит (ревматоидный артрит или РА, анкилозирующий спондилит, псориатический артрит, спондилоартропатия ВЗК), фибромиалгией, синдромом хронической усталости или аутоиммунным заболеванием и нарушением со стороны соединительной ткани (например, системная красная волчанка, склеродермия и синдром Шегрена). В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта имеется васкулит (например, ревматическая полимиалгия / гигантоклеточный артериит или узелковый полиартериит). В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект страдает психическим расстройством, таким как расстройство настроения (например, депрессия или биполярное расстройство), тревожным расстройством (например, общее тревожное расстройство, посттравматическое стрессовое расстройство) или нарушением развития (например, расстройство аутистического спектра, синдром дефицита внимания с гиперактивностью). В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта есть один или несколько полипов в толстой кишке, кисты, дивертикулярная болезнь, запор, кишечная

непроходимость, синдром мальабсорбции, изъязвление слизистой оболочки и диарея. Другими примерами заболеваний или нарушений, которые можно лечить с помощью капсулы настоящего изобретения, являются атопический дерматит, ринит и инфекция верхних дыхательных путей (ИВДП).

5           Поскольку микробиом субъектов с хроническим заболеванием или расстройством имеет тенденцию возвращаться к их собственному аномальному микробиому, может потребоваться повторное введение сообществ микроорганизмов для обеспечения устойчивого клинического излечения. Соответственно, композиция настоящего изобретения, содержащая микроорганизмы, может быть доставлена в виде  
10 поддерживающих доз. Режим введения поддерживающих доз может варьироваться, в том числе в зависимости от дозы микроорганизмов, частоты введения, интервала и продолжительности введения, а также в зависимости от заболевания и биологии субъекта.

          Например, для лечения хронического медицинского заболевания может потребоваться доза от примерно 5 до примерно 50 капсул для индукционной терапии,  
15 например от примерно 5 до примерно 40 капсул на введение. Например, композиция может вводиться в дозе примерно 10, примерно 15, примерно 20, примерно 25, примерно 30, примерно 35, примерно 40, примерно 45 или примерно 50 капсул на одно введение. Субъект может получать лечение один или несколько раз. Для поддерживающей терапии капсулы можно вводить ежедневно, от двух до пяти раз в неделю или от одного до десяти  
20 раз в месяц. Поддерживающая терапия может продолжаться от нескольких недель до нескольких месяцев. Например, поддерживающая терапия может продолжаться от около двух до около шести недель (например, около одного месяца) или может продолжаться от около двух до около шести месяцев (например, от около двух до четырех месяцев) или даже дольше. Термин «введение» относится к капсулам, принимаемым внутрь в течение  
25 одних суток.

          В описании и формуле изобретения термин «содержать» и варианты этого термина не предназначены для исключения других технических характеристик, добавок, компонентов или этапов. Кроме того, термин «содержать» включает в себя случай «состоящий из». Дополнительные задачи, преимущества и признаки настоящего  
30 изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники после изучения описания или могут быть реализованы при практическом применении изобретения. Следующие ниже примеры представлены в качестве иллюстрации и не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Кроме того, настоящее изобретение охватывает все возможные комбинации конкретных и предпочтительных  
35 вариантов осуществления, описанных в данном документе.

## ПРИМЕРЫ

**Пример 1**

Пул свежих охлажденных фекалий (300 г) переносили в пакеты для циркулятора Stomacher, в которые добавляли 0,9% NaCl (1 : 10). Его помещали в циркулятор Stomacher  
5 400 (Seward Ltd., Сассекс, Великобритания) на 1 минуту при 230 об/мин с получением суспензии. Смесь переносили в промаркированные пластиковые пробирки вместимостью 50 мл и добавляли 10% чистого глицерина (99%) перед замораживанием при -80°C.

Для продолжения обработки образцы размораживали в течение ночи при +4°C и добавляли 20% глицерина (99%). Затем смесь центрифугировали при 400 g в течение 20  
10 минут при +4°C (центрифуга Heraeus Megafuge 16R, Thermo Fisher Scientific Inc., Массачусетс, США) для удаления остатков образца. Надосадочную жидкость переносили в высокоустойчивые пробирки, предварительно профильтровав через обычное сито для удаления возможного детрита, и объём центрифугировали при 10000 g в течение 30 минут при +4°C (центрифуга Sorvall Evolution RC, Thermo Fisher Scientific Inc., Массачусетс,  
15 США), чтобы получить осадок из микроорганизмов. Надосадочную жидкость удаляли декантацией, а осадок извлекли шпателем, не допуская контакта с оставшейся надосадочной жидкостью.

Осадок разделяли на 2 части для лиофилизации (сравнительный контроль) и испытаний адсорбции (изобретение), каждая с 3 идентичными аликвотами для проведения  
20 испытаний (три повторности), при этом каждая из аликвот содержала эквивалент 50 г фекалий.

**А. Получение капсулы согласно изобретению.**

Аликвоты по 9,3 мл смешивали с 10 г микрокристаллической целлюлозы (Vivapur®-101), получая таким образом адсорбат. Образование адсорбата можно  
25 определить визуально, поскольку аликвота меняет свой внешний вид с жидкой текстуры на текстуру типа «опилки». С целью облегчения инкапсулирования к адсорбату дополнительно добавляли 200 мг магния стеарата.

После получения адсорбата и перед инкапсулированием продукт хранили в течение ночи при +4°C в холодильнике. Продукт окружили пластинами силикагеля для  
30 уменьшения/устранения влажности в холодильнике, где хранилась смесь.

Наконец, полученный таким образом адсорбат инкапсулировали с помощью полуавтоматического инкапсулятора FagronLAB™ FG (Fagron Iberica, Барселона, Испания) в кислотоустойчивую капсулу размером №00.

### Б. Получение капсулы с лиофилизированной микробиотой (сравнительный контроль)

Процедуру лиофилизации выполняли с использованием Telstar LIOLAB 3, и следуя инструкциям производителя.

- 5 Полученные таким образом лиофилизаты инкапсулировали с помощью полуавтоматического инкапсулятора FagronLAB™ FG (Fagron Iberica, Барселона, Испания) в кислотоустойчивые капсулы размером №00.

### С. Анализ жизнеспособности бактерий

- Количество и жизнеспособность бактерий в исходном пуле, осадке и капсулах  
10 через 0, 1 и 3 месяца после выдерживания образцов при +4°C определяли с использованием набора LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability and Counting Kit (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США) для проточной цитометрии и количественного определения бактериальной культуры в колумбийском агаре с 5% овечьей крови (Becton Dickinson GmbH, Германия). Использовали цитометр BD  
15 FACSCantoII (BD Biosciences, Калифорния, США) и программное обеспечение BD FACSDiva 8.0 в соответствии с инструкциями производителя. Соотношение Syto9 : пропидия йодид оптимизировали до 1 : 1 с использованием 0,1 мкл в конечном объеме 250 мкл образца. Оптимальное разведение анализируемого образца составило 1 : 10000.

- Для анализа методом проточной цитометрии испытуемые аликвоты капсул,  
20 неинкапсулированного адсорбата и лиофилизата разводили в соотношении 1 : 10000, как описано выше, с помощью 0,9% раствора NaCl и интенсивно встряхивали до получения однородной жидкости. Разведение в 0,9%-ном растворе NaCl выполнили для достижения бактериального разведения  $10^{-4}$  (1 : 10000), в котором содержались SYTO9 и пропидия йодид в соотношении 1 : 1 (0,1 мкл Syto9 и 0,1 мкл пропидия йодида в конечном объеме  
25 250 микролитров), а также 10 мкл микросфер (разведенных 1:2), включенных в набор. После получения результатов концентрацию живых бактерий определяли в соответствии с уравнением, приведённым в методике:

$$\frac{((\text{окраш. бактериальных частиц}) \times (\text{коэф. бактериального разведения}))}{((\text{окраш. микросфер}) \times (\text{коэф. разведения микросфер}))} = \text{число бактерий / мл}$$

### Д. Стабильность и морфологический анализ

- 30 Возможные морфологические изменения, а также влажность лиофилизата и капсул настоящего изобретения определяли в смеси, полученной, как описано выше, и выдержанной при температуре ниже +4°C с силикагелем или без него, с использованием метода Карла Фишера (кулонометр Metrohm 899) в соответствии с Европейской

фармакопеей 9.4 (раздел 2.5.12). Влажность испытывали в 3 капсулах отдельно для каждого условия с использованием Hydranal-Coulomat AG в качестве реагента. Из содержимого каждой капсулы отбирали аликвоту по 100 мг и анализировали при параметре скорости перемешивания, равном 10.

## 5 РЕЗУЛЬТАТЫ

Из каждой аликвоты, представляющей 50 г фекалий, получили 3 капсулы лиофилизата, тогда как из адсорбата было получено от 14 до 17 капсул. Ни в одной из капсул не было обнаружено морфологических изменений (в длине или ширине капсулы) или изменений запаха на протяжении 3 месяцев исследования.

10 Таблица 1. Результаты бактериального посева и анализа капсул методом проточной цитометрии. Результаты показывают жизнеспособность (т. е. количество живой микробиоты)

	Временная точка 0		3 месяца	
	н/п		+4°C	
Образец	Бактериальная культура	Проточная цитометрия	Бактериальная культура	Проточная цитометрия
Пул (КОЕ/мл)	3,32E + 07	9,10E + 08		
Осадок (КОЕ/мл)	1,50E + 08	1,53E + 10		
Капсула с лиофилизатом (КОЕ/капсула)	3,98E + 09	1,12E + 11	6,41E + 09	1,34E + 11
Капсула изобретения (КОЕ/капсула)	1,61E + 09	1,12E + 10	1,23E + 09	1,44E + 10

Как можно видеть, капсулы изобретения были стабильными после трех месяцев выдержки при +4°C. Когда провели определение содержания воды, обнаружили, что капсулы настоящего изобретения, имеют очень высокое содержание воды (см. таблицу 2 ниже). Столь высокое содержание должно отрицательно сказываться на жизнеспособности клеток (в действительности специалист в данной области техники мог бы ожидать экспоненциальный рост клеток).

20 Напротив, популяция бактерий в значительной степени сохранялась, как и в начале испытания, благодаря введению с состав гигроскопичного вспомогательного вещества.

Авторы изобретения повторили те же стадии эксперимента, но без добавления магния стеарата. Также был сделан вывод о том, что гигроскопичное вспомогательное вещество оказывает на микробиоту аналогичный «защитный эффект».

Таблица 2. Результаты определения влажности в капсулах настоящего изобретения

Определение	Метод	Условие	Образец	Результат	Среда	Sn-1	КВ (%)
% H <sub>2</sub> O	Евр. фарм. 9.6 (2.5.12)	Прямое инкапсулирование	1	28,95%	27,83 %	0,98	3,54 %
			2	27,46%			
			3	27,09%			
		Инкапсулирование после десикации силикагелем	1	10,33%	9,76%	0,68	7,00 %
			2	9,95%			
			3	9,00%			

### Пример 2

#### Материал/способы

Для анализа концентрации живых бактерий и микробиологического состава в период времени до 6 месяцев при +4°C были получены 2 образца из 50 г фекалий (обозначенных M1 и M2) от 2 разных добровольцев.

Каждый образец обрабатывали отдельно, следуя описанному ранее протоколу, и получали капсулы адсорбата:

(а) в качестве адсорбента добавляли только Vivapur-101 (т. е. микрокристаллическую целлюлозу) (образцы M1V и M2V); и

(б) добавляли Vivapur-101 в комбинации с магния стеаратом, как описано выше (образцы M1VS и M2VS).

Соотношение между объёмом аликвоты (выраженным в миллилитрах) и количеством адсорбента и магния стеарата (выраженным в граммах) было по существу таким же, как указано в примере 1 выше.

Определение концентрации бактерий методом проточной цитометрии и геномный анализ с помощью секвенирования 16S провели на исходных образцах после обработки и центрифугирования (осадок) и после получения адсорбата с двумя комбинациями вспомогательных веществ (M1V, M2V, M1VS и M2VS).

Для проточной цитометрии использовали набор LIVE/DEAD BacLight Staining and Counting Kit (ThermoFisher), а для геномного анализа ДНК экстрагировали с помощью набора PureLink™ Microbiome DNA Purification (Invitrogen); области V3–V4 гена 16S рРНК секвенировали с помощью платформы Miseq (Illumina) с использованием полимеразы KAPA HiFi HotSart (Roche). На основе полученных данных секвенирования был определен таксономический состав, а также было рассчитано альфа-разнообразие образцов, чтобы проверить стабильность продукта с точки зрения микробиологического состава.

Альфа-разнообразие характеризует видовое богатство и разнообразие в каждом образце. Для его определения используется индекс разнообразия Фейта или филогенетическое разнообразие (PD), которое рассчитывается как количество различных видов, обнаруженных в образце, включая филогенетическое расстояние между ними на кладыграмме с использованием платформы qiime2 ([www.qiime2](http://www.qiime2)). Анализ разнообразия оказался пригодным для наблюдения за потерей бактериального разнообразия во время получения и хранения продукта.

Статистический анализ проводили с использованием парного t-критерия, считая  $p < 0,05$  статистически значимым, чтобы проверить разницу между результатами с использованием версии R 3.6.2; графики были получены с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.02.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Анализ концентрации бактерий

Таблица 3. Результаты проточной цитометрии.

Живые бактерии / 50 г фекалий	M1V	M2V
Капсулы, t = 0	2,02E + 11	1,28E + 11
Капсулы, t = 6 мес.	1,05E + 11	1,21E + 11

Результаты свидетельствуют, что в группе MV не было значимых различий между капсулами при  $t = 0$  ( $p = 0,125$ ) и  $t = 6$  мес. ( $p = 0,029$ ).

Эти результаты подтверждают, что основной причиной неожиданного стабилизирующего эффекта для жизнеспособности бактерий до 6 месяцев при  $+4^{\circ}\text{C}$  является адсорбент, смешанный с фекальной микробиотой.

### Геномный анализ

После того, как было подтверждено, что капсулы настоящего изобретения содержат большое количество жизнеспособных клеток, сохраняющих жизнеспособность в течение долгого времени, следующим шагом было подтверждение того, сохраняется ли исходное бактериальное разнообразие из донорского образца. Это также имеет большое значение, потому что чем дольше сохраняется бактериальное разнообразие, тем выше может быть эффективность препарата.

Таблица 4. Результаты определения альфа-разнообразия с использованием индекса Фейта (PD).

Альфа-разнообразие (индекс Фейта)	M1V	M1VS	M2VS

Исходный образец	9,641666008	9,641666008	8,38365486
Капсулы, t = 6 мес.	9,570578536	9,951546215	8,47101626

Из этих результатов можно сделать вывод об отсутствии значимых различий между исходным образцом и капсулой через 6 месяцев ( $p = 0,922$ ), когда в состав содержимого капсулы входил адсорбент (MV1). Это означает, что введение в состав адсорбента обеспечивает формирование соответствующей среды, которая не нарушает и фактически  
5 позволяет сохранить полное разнообразие исходной микробиоты.

В таблице 4 также показано, что введение дополнительного вспомогательного вещества в состав содержимого капсулы настоящего изобретения не привело к изменению характеристик, обеспечиваемых адсорбентом, при этом не было обнаружено значимых различий между исходными образцами и капсулами через 6 месяцев (M1VS и M2VS). Это  
10 свидетельствует о выраженном благоприятном стабилизирующем эффекте, обеспечиваемом адсорбентом, поскольку даже включение других вспомогательных веществ для оптимизации производства капсул не оказывает отрицательного воздействия на такой стабилизирующий эффект, так как при этом в значительной степени сохраняется начальное разнообразие исходного образца микробиоты.

#### 15 **Список цитирования**

Патентная литература

KR20080059605.

Непатентная литература

Раздел 2.5.12, «Вода: определение полумикрометодом», Европейская фармакопея  
20 9.4, 2018 г., стр. 5107

**ФОРМУЛЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Твёрдая фармацевтическая композиция для приёма внутрь, содержащая фармацевтически эффективное количество живых микроорганизмов и одно или несколько фармацевтически приемлемых гигроскопичных вспомогательных веществ, где  
5 композиция имеет содержание воды, определенное в соответствии с Европейской фармакопеей 9.4, раздел 2.5.12, от 0,5% до 30% от общей массы композиции.

2. Композиция по п. 1, которая представляет собой одну капсулу.

3. Композиция по любому из предыдущих пп. 1–2, где живые микроорганизмы представляют собой фекальную микробиоту.

10 4. Композиция по любому из пп. 1–3, где гигроскопичное вспомогательное вещество выбрано из вспомогательного вещества на основе целлюлозы или его фармацевтически приемлемой соли; каолинита; талька; палыгорскита; сепиолита; и смектитов.

15 5. Композиция по любому из предыдущих пп. 1–4, где гигроскопичное вспомогательное вещество представляет собой производное простого эфира целлюлозы, производное сложного эфира целлюлозы или их комбинацию.

6. Композиция по любому из предыдущих пп. 1–5, где гигроскопичное вспомогательное вещество представляет собой МКЦ.

20 7. Композиция по любому из предыдущих пп. 1–6, где содержание воды составляет от 5% до 30% по отношению к общей массе композиции.

8. Композиция по любому из предыдущих пп. 1–7, где композиция содержит одно или несколько дополнительных фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

9. Композиция по пп. 1–8, где композиция содержит:

- 25 - криопротектор; или, альтернативно,  
- смазывающее вещество; или, альтернативно,  
- криопротектор и смазывающее вещество.

10. Композиция по любому из предыдущих пп. 1–9, которая содержит:

- 30 - фекальную микробиоту, производное простого эфира целлюлозы, соль стеариновой кислоты и криопротектор; или, альтернативно,  
- фекальную микробиоту, производное простого эфира целлюлозы, соль стеариновой кислоты и глицерин; или, альтернативно,

- фекальную микробиоту, производное простого эфира целлюлозы, магния стеарат и глицерин; или, альтернативно,

- фекальную микробиоту, МКЦ, соль стеариновой кислоты и глицерин; или, альтернативно,

5 - фекальную микробиоту, МКЦ, магния стеарат и глицерин.

11. Способ получения фармацевтической композиции для приёма внутрь по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что способ включает в себя смешивание живых микроорганизмов с одним или несколькими гигроскопичными вспомогательными веществами.

10 12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что способ включает в себя смешивание избытка по массе гигроскопичного вспомогательного вещества (веществ) по отношению к количеству живых микроорганизмов, выраженному в единицах объёма.

13. Способ по любому из предыдущих пп. 11–12, который дополнительно включает в себя добавление смазывающего вещества, при этом массовое соотношение  
15 гигроскопичное вспомогательное вещество(-а) : смазывающее вещество составляет от 30 : 1 до 70 : 1.

14. Твёрдая фармацевтическая композиция для приёма внутрь по любому из предыдущих пп. 1–10 для применения в терапии.

15 20 15. Применение гигроскопичного вспомогательного вещества для стабилизации живых микроорганизмов в фармацевтической композиции.