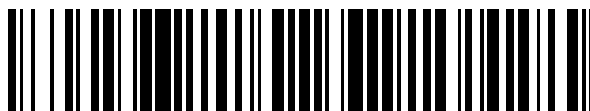


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 947 578**

51 Int. Cl.:

A61K 9/48 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 35/745 (2015.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61K 35/741 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2018 PCT/EP2018/081650**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2019 WO19097030**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2018 E 18803675 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2023 EP 3709978**

54 Título: **Formulación oral farmacéutica que comprende bacterias**

30 Prioridad:

17.11.2017 EP 17306602

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.08.2023

73 Titular/es:

MAAT PHARMA (50.0%)
70 Avenue Tony Garnier
69007 Lyon, FR y
BIOCODEX (50.0%)

72 Inventor/es:

SCHWINTNER, CAROLE;
ROBIN, MARIANNE;
DUBUISSON, JEAN-FRANÇOIS;
AFFAGARD, HERVÉ;
MICHENET, CÉDRIC y
BARDY, AMANDINE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 947 578 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulación oral farmacéutica que comprende bacterias

5 Campo técnico

La presente invención se relaciona con una formulación oral farmacéutica para su uso en la administración de bacterias derivadas de microbiota fecal a mamíferos para el tratamiento y/o prevención de disbiosis y patologías asociadas. La formulación oral farmacéutica puede usarse en métodos de trasplante de microbiota fecal (FMT) autólogos o alogénicos. La formulación oral farmacéutica es ventajosa en comparación con las formulaciones nasoduodenales, transcolonoscópicas y basadas en enemas y también en comparación con las formulaciones farmacéuticas orales de FMT conocidas. La formulación oral farmacéutica está especialmente diseñada para administrarse principalmente en el íleon y el colon y para mantener la viabilidad y diversidad bacteriana de la muestra.

15 Antecedentes de la invención

La microbiota intestinal humana está compuesta por todos los microorganismos del sistema gastrointestinal humano (estómago, intestino y colon). La microbiota intestinal del individuo adulto comprende aproximadamente 10^{14} bacterias, que representan un metagenoma bacteriano dominante de 200 000 a 800 000 genes por individuo, es decir, de 10 a 50 veces el número de genes del genoma humano. El intestino, que es estéril en el útero, se coloniza en los primeros días de vida y evoluciona a una población de microbiota única. Los individuos tienen poblaciones de especies bacterianas relativamente cercanas, pero la composición exacta de la microbiota (las especies bacterianas y su proporción) es en gran medida específica del hospedero. Por lo tanto, la microbiota intestinal humana es un ecosistema muy diverso, complejo y específico de cada individuo.

Es esencial para la salud de un individuo mantener una microbiota estable que pueda volver a su estado inicial después de un cambio y que sea resistente a la invasión de patógenos. Mantener la diversidad de la microbiota ayuda a proporcionar estabilidad. Sin embargo, determinadas patologías o tratamientos médicos alteran la microbiota, lo que da lugar a la disbiosis. Por ejemplo, enfermedades inflamatorias, tales como las enfermedades inflamatorias intestinales crónicas, pueden limitar la diversidad de la microbiota intestinal. La disbiosis iatrogénica ocurre cuando la disbiosis es causada por una intervención o tratamiento médico. Los tratamientos con antibióticos (o antibioterapia), en particular, dan como resultado el deterioro de la microbiota y la pérdida de la función de barrera intestinal, lo que puede favorecer la proliferación de organismos patógenos como, por ejemplo, *Clostridium difficile*, responsable de diarreas intrahospitalarias y, a menudo, resistente a los antibióticos tradicionales de amplio espectro (tales como la vancomicina o el metronidazol).

El FMT es un método que se usa hoy en día para restaurar una microbiota intestinal "saludable". En el FMT, la materia fecal de un donante sano o de un grupo de donantes sanos se introduce en el tracto digestivo de un paciente receptor para "restablecer" o curar la disbiosis intestinal del hospedero. El trasplante puede ser alogénico (es decir, de un donante individual sano o de un grupo de donantes hacia un paciente) o puede ser autólogo, en donde se toman muestras fecales de un individuo antes de someterse a una hospitalización, tratamiento antibiótico u otro tratamiento que pueda perturbar la microbiota del individuo o cualquier evento posiblemente generador de disbiosis.

Los métodos actuales de trasplante incluyen métodos naso-duodenales, transcolonoscópicos o basados en enema. Sin embargo, la administración naso-duodenal es difícil para los pacientes y existe riesgo de que ocurran vómitos. Los métodos transcolonoscópicos o basados en enema deben llevarse a cabo en un ámbito hospitalario y pueden presentar incomodidad para el paciente y el método de tratamiento "único" significa que la recolonización debe realizarse en un tiempo muy limitado. Las formulaciones orales para su uso en el FMT representan una ventaja sobre los últimos métodos desde el punto de vista de la comodidad y conveniencia del paciente y actualmente se desarrollan para superar estas dificultades.

En los métodos de administración bacteriana, incluida la terapia de FMT, es importante que la muestra bacteriana/microbiota se administre al íleon y al colon. Por lo tanto, una formulación oral debe poder pasar intacta a través del estómago y liberarse solo cuando alcanza el íleon o el colon. La liberación al entorno de pH neutro del íleon y el colon favorece la supervivencia bacteriana. Además, debe preservarse la viabilidad y el perfil bacteriano (población de especies de la formulación oral).

Algunos informes de formulaciones orales para el FMT están disponibles. Por ejemplo, la administración de formulaciones orales de FMT liofilizadas para el tratamiento de *Clostridium difficile* se ha informado infección [Hecker y otros (2016) Open Forum Infect Dis (2016) 3 (2): ofw091. DOI: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw091>]. La formulación consistía en la suspensión de heces liofilizadas en cápsulas de tamaño 0, cada cápsula contenía aproximadamente 60 mg de material liofilizado. La concentración de anaerobios totales por ml del material liofilizado fue de aproximadamente $8,5 \cdot 10^{10}$ UFC (Unidades Formadoras de Colonias)/ml, con un número de organismos aeróbicos y facultativos de aproximadamente $4,3 \cdot 10^{10}$ UFC/ml a $5,0 \cdot 10^{10}$ UFC/ml. Se indica que un gran número (es decir, 20-40)

de cápsulas fueron ingeridos. Por supuesto, esto es desagradable y requiere una prueba de riesgo de aspiración, así como también la presencia de un médico.

En otra formulación oral, descrita en el documento WO 2016/201114, la microbiota fecal liofilizada se presenta en una cápsula gastrorresistente de tamaño 0. El excipiente de liofilización puede comprender PEG 3350, glicerol, trehalosa, sacarosa o polivinilpirrolidona. La cabeza y el cuerpo de la cápsula están revestidos con un material de bandas resistente al pH bajo. Las cápsulas pueden almacenarse a aproximadamente 4 °C. Se indica que una cápsula puede incluir aproximadamente $6,7 \times 10^9$ UFC, y que pueden requerirse ocho cápsulas, tomadas dos veces al día, para que sean equivalentes a una dosis de enema.

Otro documento relevante de la técnica anterior es el documento WO 2014/152338 A1, donde se describen formas de dosificación oral que contienen flora fecal bacteriana seca, en particular cápsulas recubiertas con recubrimientos sensibles al pH.

En vista del creciente interés en la terapia bacteriana, incluido el FMT, existe la necesidad de proporcionar formulaciones orales farmacéuticas de bacterias derivadas de la microbiota fecal, que sean efectivas y fáciles de fabricar, en particular, a escala industrial, para su uso en el tratamiento de la disbiosis intestinal y patologías relacionadas. Existe la necesidad de proporcionar una formulación oral farmacéutica que pueda suministrar bacterias derivadas de la microbiota fecal al íleon y al colon. Esto significa que el contenido de la formulación oral no debe liberarse significativamente en el intestino hasta que se alcance un pH de aproximadamente 7 o mayor. Además, existe la necesidad de proporcionar formulaciones orales farmacéuticas de bacterias derivadas de la microbiota fecal en las que la viabilidad de las bacterias, así como también el perfil de la población bacteriana, se conserven durante toda la fabricación de la formulación, así como también en el sitio deseado de liberación en el intestino. Existe la necesidad de proporcionar formulaciones que puedan almacenarse en el frigorífico o a temperatura ambiente y usarse a temperatura ambiente. Existe la necesidad de proporcionar formulaciones orales farmacéuticas de bacterias derivadas de la microbiota fecal que sean estables durante un largo período de tiempo.

Existe la necesidad de proporcionar formulaciones orales farmacéuticas para su uso en el tratamiento y prevención de disbiosis intestinal bacteriana (iatrogénica o no iatrogénica) y patologías asociadas. Las patologías en cuestión pueden ser infecciones, tales como *Clostridium difficile*, colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, diabetes tipo II, alergias alimentarias, cáncer, que incluye la leucemia, enfermedad refractaria de injerto contra hospederio (GvHD), obesidad y obesidad mórbida. Otras patologías asociadas a la disbiosis son el autismo, la esclerosis, la diarrea del viajero, la infección vaginal crónica (cistitis, micosis), las infecciones óseas y articulares, la disbiosis relacionada con la unidad de cuidados intensivos (UCI), la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia y los trastornos bipolares y la disbiosis intestinal asociada con quimioterapia o inmunoterapia contra el cáncer.

Existe la necesidad de proporcionar formulaciones orales farmacéuticas para su uso en el tratamiento o la prevención de la disbiosis intestinal iatrogénica y patologías y complicaciones asociadas que incluyen, pero no se limitan a, sepsis, choque séptico y trastornos gastrointestinales, que incluyen, pero no se limitan a, diarrea, mucositis, dolor abdominal, sangrado gastrointestinal.

La presente invención satisface las necesidades descritas anteriormente.

Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar una formulación oral farmacéutica para usar en el FMT y para usar en general en la administración de al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal, que puede producirse fácilmente de una manera confiable y reproducible, es aceptable para el usuario, y que preserva la viabilidad bacteriana y la diversidad de la muestra bacteriana inicial hasta su entrega al íleon y/o colon.

Resumen de la invención

De acuerdo con un aspecto, la invención se refiere a una formulación oral farmacéutica de una mezcla encapsulada de al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal, en donde las cápsulas están recubiertas de una composición polimérica sensible al pH que comprende:

- a. 50-70 % de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 en peso de polímero seco,
- b. 10-30 % de poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 en peso de polímero seco,
- c. 5 a 10 % en peso de al menos un éster de mono-, di- o triglicérido de ácido graso, o mezclas de los mismos,
- d. 5 a 8 % en peso de al menos un plastificante,
- e. 6 a 9 % en peso de al menos un emulsionante no iónico.

Preferentemente, la cápsula se fabrica de hidroxipropilmetilcelulosa.

La composición polimérica sensible al pH generalmente puede comprender:

- 5
- a. 60-70 % de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 en peso de polímero seco,
 - b. 10-20 % de poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 en peso de polímero seco,
 - c. 5 a 10 % en peso de monoestearato de glicerol,
 - d. 5 a 8 % en peso de citrato de trietilo,
 - e. 6 a 9 % en peso de al menos un emulsionante no iónico, preferentemente con un HLB entre 12 y 16.

De acuerdo con una modalidad de la invención, la composición polimérica sensible al pH puede comprender:

- 10
- a. 62 a 66 % de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 en peso de polímero seco,
 - b. 14 a 18 % de poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 en peso de polímero seco,
 - c. 5 a 8 % en peso de monoestearato de glicerol (por ejemplo, 40-55),
 - d. 5 a 8 % en peso de citrato de trietilo,
 - e. 6 a 9 % en peso de polisorbato 80.
- 15

De acuerdo con una modalidad de la invención, la composición polimérica sensible al pH puede comprender:

- 20
- a. 54 a 58 % de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 en peso de polímero seco,
 - b. 22 a 26 % de poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 en peso de polímero seco,
 - c. 5 a 8 % en peso de monoestearato de glicerol (por ejemplo, 40-55),
 - d. 5 a 8 % en peso de citrato de trietilo,
 - e. 6 a 9 % en peso de polisorbato 80.
- 25

De acuerdo con una modalidad de la invención, la formulación oral farmacéutica puede comprender una mezcla encapsulada que comprende la microbiota fecal completa de uno o más donantes.

30 De acuerdo con una modalidad de la invención, la mezcla encapsulada de al menos dos bacterias puede estar en forma de liofilizado.

De acuerdo con una modalidad de la invención, el liofilizado puede haberse producido mediante las siguientes etapas:

- 35
- A) Mezclar una muestra de microbiota de origen fecal con un diluyente elegido entre un poliol, un di-, tri- o polisacárido, o mezclas de los mismos y un agente de relleno, en una relación de entre 1:1 y 1:10,
 - B) Congelar la mezcla obtenida en A) y luego liofilizarla.

40 De acuerdo con una modalidad de la invención, la formulación comprende una microbiota fecal completa o una microbiota fecal modificada de uno o más donantes.

De acuerdo con una modalidad de la invención, la formulación oral farmacéutica comprende una mezcla de al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal.

45 De acuerdo con otro aspecto de la invención, la formulación oral farmacéutica puede usarse en el trasplante de microbiota fecal autóloga o alogénica, o en el trasplante de microbiota fecal modificada autóloga o alogénica.

La formulación oral farmacéutica puede usarse en el tratamiento o prevención de disbiosis intestinal y patologías asociadas.

50 De acuerdo con otra modalidad de la invención, las patologías asociadas se eligen entre infección y diarrea asociada a *Clostridium difficile* (CDI), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), síndrome del intestino irritable (ISB), estreñimiento idiopático, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, diabetes tipo II, alergias alimentarias, cáncer, GvHD refractaria, obesidad y obesidad mórbida, autismo, esclerosis, diarrea del viajero, infección vaginal crónica (que incluye cistitis, micosis), infecciones de huesos y articulaciones, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia y trastornos bipolares y disbiosis intestinal asociada con quimioterapia o inmunoterapia contra el cáncer.

60 La formulación oral farmacéutica puede usarse en el tratamiento o la prevención de la disbiosis intestinal iatrogénica y patologías y complicaciones asociadas que incluyen, pero no se limitan a, sepsis, choque séptico y trastornos gastrointestinales, que incluyen, pero no se limitan a, diarrea, mucositis, dolor abdominal, sangrado gastrointestinal.

65 De acuerdo con otra modalidad de la invención, la formulación oral farmacéutica puede comprender las siguientes bacterias: *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides fragilis*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia hominis*. La última formulación oral farmacéutica puede usarse en el tratamiento o prevención de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (IBD).

De acuerdo con otra modalidad de la invención, la formulación oral farmacéutica puede comprender las siguientes bacterias: *Akkermansia muciniphila* y *Christensenella spp.*

La última formulación oral farmacéutica puede usarse en el tratamiento o prevención de la obesidad y la diabetes.

De acuerdo con otra modalidad de la invención, la formulación oral farmacéutica puede comprender las siguientes bacterias: *Akkermansia muciniphila*, *Enterococcus spp.*, y *Bacteroides fragilis*. La última formulación oral farmacéutica puede usarse en el tratamiento o prevención o tratamiento de disbiosis intestinal asociada con quimioterapia o inmunoterapia contra el cáncer.

De acuerdo con otra modalidad de la invención, la mezcla de al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal contenida en la formulación oral farmacéutica, se libera sustancialmente a un pH de aproximadamente 7,2, preferentemente a un pH de 7,2.

En una modalidad de la invención, el sujeto que recibe la formulación oral es un ser humano.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1a es un perfil de disolución obtenido para una formulación oral farmacéutica de acuerdo con una modalidad de la invención mediante el uso del método USP2.

La Figura 1b es un perfil de disolución obtenido para una formulación oral farmacéutica de acuerdo con una modalidad de la invención mediante el uso del método USP2 adaptado.

La Figura 2a es un perfil de disolución obtenido para un número de formulaciones orales farmacéuticas de acuerdo con modalidades de la invención mediante el uso del método USP2.

Descripción Detallada de la Invención

Por "formulación oral farmacéutica" se entiende una formulación oral farmacéutica que puede usarse para el tratamiento o prevención de una patología o trastorno fisiológico.

Por "FMT" se entiende el trasplante de microbiota fecal, que se refiere a la transferencia de materia fecal que contiene microorganismos de al menos un donante sano o de al menos un donante que tiene una o más características deseadas, al tracto intestinal de un paciente. El FMT también puede ser autólogo, lo que significa que el paciente donante y el receptor son el mismo individuo. En general, FMT se refiere a la restauración completa de toda la microbiota fecal.

Por el término "FMT modificado", se entiende el trasplante de microbiota fecal modificada, que se refiere al FMT en el que la población de microorganismos de la materia fecal se ha modificado con respecto a la población de microorganismos en la muestra de materia fecal inicial. La modificación de la población de microorganismos puede llevarse a cabo mediante varios métodos o una combinación de los mismos. Por ejemplo, la población de microorganismos puede alterarse mediante el cultivo de los microorganismos fecales en condiciones que favorezcan o desfavorezcan el crecimiento de determinadas especies. Esto también puede denominarse como selección de microorganismos. También puede llevarse a cabo mediante el enriquecimiento de los microorganismos fecales mediante la adición de una o más especies bacterianas a los microorganismos fecales. También puede llevarse a cabo mediante el aislamiento de un subgrupo de uno o más microorganismos fecales de la población original de microorganismos fecales. Este subgrupo de una o más especies se usa luego en el FMT modificado. Por el término "bacterioterapia fecal" se entiende la administración de al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal.

Por "disbiosis" se entiende una microbiota alterada, en donde una especie normalmente dominante queda subrepresentada, o las especies que normalmente son superadas o contenidas, aumentan en población. Cuando la disbiosis es causada por una intervención médica, tal como un tratamiento con antibióticos o alimentación enteral, se conoce como disbiosis iatrogénica.

Por "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende la cantidad requerida para producir el efecto terapéutico deseado. Generalmente, en el presente caso, una cantidad terapéuticamente efectiva es la carga bacteriana que restablece la colonización intestinal deseada.

Por "polímero sensible al pH" se entiende un polímero que se disuelve a un pH dado.

Por "liberado sustancialmente" se entiende que se libera más del 80 %.

Por "lío-filización" se entiende el proceso de lio-filización o lio-filización. Es la eliminación de agua de una muestra previamente congelada mediante las fases de sublimación y desorción. Primero se realiza la fase de sublimación o secado primario. La sublimación es cuando un sólido (hielo) cambia directamente a vapor sin pasar primero por una fase líquida (agua). Luego, al colocar el producto en un vacío profundo y aumentar la temperatura, el agua sólida (hielo) se transforma en vapor. El vapor es capturado en el equipo. Cuando se ha eliminado la mayor parte del

contenido de agua del producto, la temperatura del producto comienza a subir, lo que indica el final del proceso de sublimación. En esta etapa, para extraer las últimas moléculas de agua, se realiza una fase de desorción o secado secundario. La fase de desorción se usa para eliminar las moléculas de agua unidas al producto. Con este fin, se aumenta la temperatura en el sistema.

5 Las cantidades se indican como peso/volumen a menos que se indique de otra forma.

Mezclas bacterianas en las formulaciones orales farmacéuticas:

10 Las formulaciones orales farmacéuticas de la invención, en general, comprenden una mezcla liofilizada encapsulada que comprende al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal, al menos un crioprotector y, opcionalmente, otros agentes.

15 Las "al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal" pueden ser una microbiota completa de un donante individual o una microbiota combinada de un grupo de donantes individuales.

20 Alternativamente, "al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal" pueden ser una mezcla de muchas bacterias derivadas de la microbiota fecal, pero no la microbiota completa. La mezcla puede ser de un donante individual o de un grupo de donantes individuales.

25 Por ejemplo, la mezcla de muchas bacterias derivadas de la microbiota fecal puede ser una mezcla que contiene al menos 2, o al menos 5, o al menos 10, o al menos 20, o al menos 30, o al menos 40, o al menos 50, o al menos 60, o al menos 70, o al menos 80, o al menos 90, o al menos 100, o al menos 200 o al menos 300, o al menos 400, o al menos 500, o al menos 600 o al menos 700 o al menos 800 o al menos 900 o al menos 1000 especies diferentes de bacterias.

Preferentemente, la mezcla de muchas bacterias derivadas de la microbiota fecal es una mezcla que contiene al menos dos especies diferentes de bacterias.

30 Como bacterias preferidas derivadas de la microbiota fecal para su uso en mezcla, podemos citar las siguientes:

Faecalibacterium prausnitzii, *Blautia hydrogenotrophica*, *Akkermansia muciniphila*, *Enterococcus spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia hominis*, *Christensenella spp.*, *Lactobacilles spp.*

35 Como mezclas preferidas de bacterias derivadas de la microbiota fecal en la formulación oral farmacéutica, podemos citar las siguientes:

- *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides fragilis*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia hominis*. Esta mezcla puede usarse para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD).
- 40 – *Faecalibacterium prausnitzii*, *Blautia hydrogenotrophica*. Esta mezcla puede usarse para el tratamiento del síndrome del intestino irritable (IBS).
- *Akkermansia muciniphila*, *Christensenella spp.* Esta mezcla puede usarse para el tratamiento de la obesidad y la diabetes.
- 45 – *Akkermansia muciniphila*, *Enterococcus spp.*, y *Bacteroides fragilis*. Esta mezcla puede usarse para el tratamiento de disbiosis intestinal asociada con quimioterapia o inmunoterapia.

Las bacterias derivadas de la microbiota fecal pueden identificarse mediante métodos de secuenciación de ARNr 16S que son conocidos por los expertos.

50 Preparación de la muestra:

55 En general, la muestra de la mezcla de al menos dos bacterias derivadas de microbiota fecal preparada por técnicas conocidas de liofilización. También pueden usarse otras técnicas conocidas por los expertos. Por ejemplo, puede citarse la tecnología de matriz de emulsión microbiana (MEM) desarrollada por OpenBiome, un banco de heces sin fines de lucro. La MEM usa ácidos grasos de cadena larga para crear una matriz portadora, que es una emulsión de agua en aceite en la que las bacterias congeladas están integradas en microgotas de fase acuosa (ver el "FMT Capsule G3 Clinical Primer" en www.openbiome.org).

60 Louis y otros describen la preparación de una muestra fecal en solución salina tamponada con fosfato prereducida seguida de centrifugación en serie intercalada con decantación y resuspensión de los sedimentos en una cantidad mínima de PBS. Luego, la muestra se microinyecta en cápsulas de gelatina # 1 que luego se sobreencapsulan con cápsulas # 0 y # 00 [ver Oral abstract session: new considerations in *C. difficile* prevention and treatment, fecal microbiota transplantation (FMT) via oral fecal microbial capsules for recurrent *Clostridium* differential infection (rCDI), (<https://idsa.confex.com/IDSA/2013/webprogram/paper41427.html>)].

65

Por lo tanto, la formulación oral farmacéutica, de acuerdo con una modalidad de la invención, puede prepararse como se describe en el último documento, pero mediante el uso de cápsulas recubiertas adecuadamente grandes (con el polímero sensible al pH) para encapsular cápsulas de gelatina adecuadamente pequeñas.

5 Generalmente, las muestras para su uso en el FMT también pueden prepararse mediante el uso de los métodos de recolección descritos en la solicitud de patente internacional WO 2016/170285, que divulga métodos para preparar muestras de microbiota fecal de sujetos donantes. Los métodos proporcionan la recolección de al menos una muestra de microbiota fecal y colocarla en un dispositivo de recolección hermético al oxígeno, mezclar la muestra
10 con al menos una solución salina acuosa que contiene a al menos un crioprotector y/o agente de relleno y, opcionalmente, filtrar la mezcla mediante el uso de un filtro, por ejemplo, con poros inferiores o iguales a 0,7 mm, preferentemente inferiores a 0,5 mm, y almacenar la mezcla obtenida o congelar la mezcla obtenida. También pueden usarse variantes de este método, conocidas por el experto, para preparar la muestra de microbiota fecal.

15 Otros métodos de liofilización adecuados para su uso en la preparación de muestras para las formulaciones orales farmacéuticas de la presente invención se describen en la solicitud de patente internacional WO 2017/103550. Por ejemplo, puede prepararse una muestra de microbiota fecal de acuerdo con las siguientes etapas:

20 A) Mezclar la muestra de microbiota fecal de un sujeto donante con un diluyente, por ejemplo, elegido entre polioles, di-, tri o polisacáridos y un agente de relleno tal como una maltodextrina, preferentemente con la relación de microbiota fecal, preferentemente, purificada (g)/volumen de diluyente (ml) comprendido entre 1:1 y 1:10.

B) Congelar la mezcla obtenida en A) a una temperatura inferior a -50 °C, preferentemente a una temperatura entre -7 °C y -100 °C, luego liofilizar la muestra.

25 Preferentemente, de acuerdo con una modalidad de la invención, la formulación oral farmacéutica es para uso en el FMT, la muestra de microbiota fecal es una muestra de heces fecales de al menos un donante. Efectivamente, la muestra de heces fecales de los donantes contiene la microbiota fecal. En el caso del FMT autólogo, el donante es el sujeto a tratar. En el caso del FMT alogénico, el(los) donante(s) es(son) el sujeto a tratar.

30 Ejemplos de métodos adecuados para recolectar muestras de heces fecales se describen en el documento WO 2016/170285 y en el documento WO 2017/103550 (ver páginas 6 y 7).

Puede usarse cualquier diluyente/crioprotector adecuado para la preparación de muestras. Preferentemente, pueden usarse polioles o di-, tri- o polisacáridos, o una mezcla de los mismos. Como poliol adecuado, puede citarse glicerol, manitol, sorbitol, propilenglicol o etilenglicol. Como di-, tri- o polisacáridos adecuados, pueden citarse dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros de unidades diferentes o idénticas, eligiéndose dichas unidades entre glucosa, fructosa, galactosa, fucosa y ácido N-acetilneuramínico. Entre los disacáridos adecuados que pueden usarse, puede citarse la trehalosa o uno de sus análogos o la sacarosa.

35 Preferentemente, el crioprotector se elige entre glicerol, manitol, sorbitol, propilenglicol, etilenglicol, trehalosa y sus análogos, sacarosa, galactosa-lactosa y sus mezclas. Con mayor preferencia, el crioprotector es galactosa-lactosa o trehalosa.

40 Típicamente, la cantidad de crioprotector presente en la solución salina acuosa está comprendida entre el 3 y el 30 % en peso con respecto al volumen total de la solución (p/v), preferentemente entre el 4 % y el 20 % (p/v).

45 Como agentes de relleno, pueden citarse, por ejemplo, hidrolizados parciales de almidón, en particular, de trigo o de maíz, así como también hidrolizados parciales de heces, por ejemplo, patata, que contienen grandes cantidades de maltodextrina. Preferentemente, el agente de relleno es una mezcla de maltodextrinas, en la que la maltodextrina está presente entre un 4 y un 20 % (p/v).

50 Preferentemente, el diluyente/crioprotector es una solución salina acuosa que comprende al menos un crioprotector y/o un agente de relleno. Por lo tanto, típicamente la solución contiene agua y sales fisiológicamente aceptables. Típicamente, la solución contendrá sales de calcio, sodio, potasio o magnesio con cloruro, gluconato, acetato o carbonato de hidrógeno. La solución salina acuosa también puede contener opcionalmente al menos un
55 antioxidante. El antioxidante puede elegirse entre el ácido ascórbico y sus sales, los tocoferoles, la cisteína y sus sales, en particular el clorhidrato, y sus mezclas. Preferentemente, la solución salina acuosa comprende al menos una sal elegida entre cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, fluoruro de potasio, gluconato de sodio y acetato de sodio, y opcionalmente al menos un antioxidante, preferentemente elegido entre L-ascorbato sódico, tocoferol, L- monohidrato de clorhidrato de cisteína y mezclas de los mismos. Típicamente, la sal está presente en la
60 solución salina acuosa a una concentración de aproximadamente entre 5 y 20 g/l, preferentemente, entre 7 y 10 g/l.

Típicamente, el antioxidante está presente en la solución salina acuosa en una cantidad comprendida entre 0,3 y 1 % p/v, preferentemente entre 0,4 y 0,6 % p/v. Pueden encontrarse más detalles sobre diluyentes/crioprotectores adecuados en la página 9 del documento WO 2017/103550. Los protocolos de liofilización de muestras adecuados se describen en el documento WO 2017/103550, en las páginas 10 - 20.

65

Como alternativa a comprender muestras de heces fecales procesadas que comprenden toda la microbiota intestinal, la formulación oral farmacéutica, de acuerdo con determinadas modalidades de la presente invención de la presente invención, puede comprender mezclas de al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal. En ese caso, la mezcla de al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal puede prepararse de acuerdo con métodos similares a los descritos anteriormente y detallados en el documento WO 2017/103550. El experto en la materia sabe cómo adaptar estos métodos para preparar una mezcla de al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal. Por ejemplo, la mezcla de al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal puede proporcionarse en forma de solución, polvo u otra forma. A continuación, puede mezclarse con una solución salina acuosa que comprende un crioprotector y, opcionalmente, un agente de relleno y/o un antioxidante. A continuación, la mezcla puede congelarse a una temperatura inferior a 50 °C y luego liofilizarse de acuerdo con los métodos descritos en la técnica, en particular en el documento WO 2017/103550.

Las muestras para su uso en el FMT modificado (mFMT) pueden prepararse de manera similar a las de FMT descritas anteriormente, pero con etapas adicionales para modificar la población de microorganismos fecales. Métodos conocidos, por ejemplo, como los descritos en el documento WO 2017/103550 pueden usarse para el aislamiento de la bacteria de la muestra de heces fecales. La modificación de la población de microorganismos fecales puede realizarse, por ejemplo, mediante el cultivo de los microorganismos fecales en condiciones que modifiquen la población, por ejemplo, favoreciendo o desfavoreciendo el crecimiento de determinadas especies. La microbiota fecal también puede modificarse al aislar determinadas especies bacterianas de la muestra fecal original y cultivar más las especies aisladas. La modificación de la microbiota fecal puede enriquecerse mediante la adición de una o más especies bacterianas a los microorganismos fecales.

Una vez preparadas las muestras de microbiota fecal, se prepara la microbiota fecal modificada o de al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal, se envasan en cápsulas, mediante el uso de métodos conocidos por el experto.

Carga bacteriana:

De acuerdo con una modalidad de la invención, la solución líquida usada para la liofilización puede contener $1 \cdot 10^9$ - $2 \cdot 10^{10}$ bacterias por ml. Por lo tanto, de acuerdo con una modalidad de la invención, una cápsula de tamaño 0 que contiene una muestra liofilizada de esta solución puede contener aproximadamente $1 \cdot 10^{10}$ bacterias.

Puede usarse una carga bacteriana similar o idéntica si las cápsulas contienen una muestra de una microbiota fecal completa o una mezcla de al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal que no es una microbiota fecal completa.

En este último caso, donde la formulación oral farmacéutica contiene una mezcla de al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal, la solución líquida usada para la liofilización podrá contener $1 \cdot 10^9$ - $2 \cdot 10^{10}$ bacterias por ml. Una cápsula de tamaño 0 que contiene una muestra liofilizada de la solución, por lo tanto, puede contener aproximadamente $1 \cdot 10^{10}$ bacterias.

Cápsulas:

Generalmente, la formulación oral farmacéutica se encapsula en una cápsula adecuada para la administración oral a mamíferos, en particular, a humanos. La cápsula es generalmente una cápsula "dura" hecha en dos mitades: un "cuerpo" de menor diámetro que se llena y luego se sella mediante el uso de una "tapa" de mayor diámetro. Esta cápsula "dura" puede estar hecha de una solución acuosa de uno o más agentes gelificantes, tal como una proteína animal, preferentemente gelatina, o un polisacárido vegetal o un derivado, como una carragenina o formas modificadas de almidón y celulosa. Pueden agregarse otros ingredientes a la solución del agente gelificante, que incluye plastificantes tales como glicerina o sorbitol para disminuir la dureza de la cápsula, agentes colorantes, conservantes, desintegrantes, lubricantes y tratamiento superficial. Preferentemente, la cápsula se fabrica de al menos un material derivado de una planta, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), también conocida como "hipromelosa", o hidrolizado de almidón. Las cápsulas adecuadas están disponibles en ACG (India), por ejemplo, con el nombre comercial "Naturecaps", o en Capsugel (Nueva Jersey, Estados Unidos) con el nombre "Vcaps".

Los tamaños de cápsula adecuados son 5, 4, 3, 2, 2el, 1, 0, Del, 00, 00el y 000. De acuerdo con una modalidad de la invención, se prefieren las cápsulas de tamaño 0 para la administración a seres humanos.

Polímero sensible al pH:

Generalmente, la cápsula está recubierta con un polímero sensible al pH específico. El polímero sensible al pH está diseñado para que las muestras dentro del contenido de la cápsula no se liberen sustancialmente en el cuerpo antes de llegar al íleon y al colon. Esto significa que la liberación no debería tener lugar por debajo de un pH de aproximadamente 7,2, y el contenido debería liberarse a un pH de aproximadamente 7,2, que corresponde al pH del íleon. Específicamente, las cápsulas recubiertas de acuerdo con una modalidad de la invención se han diseñado de modo que, tras probarse sucesivamente a pH 1,2, 6,8 y 7,2, la liberación acumulada en las dos primeras etapas de

prueba no supera el 10 %, preferentemente no supera el 2 %, y que más del 80 % del contenido de la cápsula se libera a un pH de aproximadamente 7,2.

5 Las pruebas de disolución se realizan de acuerdo con el capítulo <711> de la farmacopea de los Estados Unidos (USP) y el capítulo 2.9.3 de la farmacopea europea (EP) mediante el uso del aparato USB I, II (con una velocidad de 50-100 rpm) o IV. La temperatura del medio de prueba se ajusta a 37± 0,5 °C. Una cápsula se trata en un recipiente separado para inspeccionar visualmente la integridad del contenido de la cápsula al cambiar el medio o ajustar el pH.

10 Como polímero sensible al pH, los inventores han descubierto que se prefiere una composición que comprende una mezcla de dos copolímeros de (met)acrilato aniónicos.

El primer polímero de (met)acrilato está constituido para disolverse por encima de un pH de aproximadamente 7,0. El segundo polímero está generalmente constituido para disolverse por encima de un pH de aproximadamente 5,5.

15 El primer copolímero de (met)acrilato se polimeriza generalmente de 10 a 30 % en peso de metacrilato de metilo, 50 a 70 % en peso de acrilato de metilo y 5 a 15 % en peso de ácido metacrílico. Estos polímeros se venden bajo el nombre de gama "EUDRAGIT® FS" de Evonik (ALEMANIA).

20 Preferentemente, el primer polímero es un copolímero que se polimeriza de 25 % en peso de metil metacrilato de metilo, 65 % en peso de acrilato de metilo y 10 % en peso de ácido metacrílico. Este tipo de polímero está disponible comercialmente, por ejemplo, de Evonik (ALEMANIA) bajo el nombre de EUDRAGIT® FS. Otra forma comercial, bajo el nombre de EUDRAGIT® FS 30 D, que es una dispersión que comprende un 30 % en peso de EUDRAGIT® FS, también está disponible comercialmente de Evonik. El nombre IUPAC para este último polímero es poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1.

25 El segundo copolímero de (met)acrilato aniónico se polimeriza generalmente de 40 a 60 % en peso de ácido metacrílico y 60 a 40 % de acrilato de etilo. Estos polímeros se venden bajo el nombre de gama "EUDRAGIT® L" de Evonik.

30 Preferentemente, el segundo copolímero de (met)acrilato aniónico es un copolímero polimerizado a partir de un 50 % en peso de acrilato de etilo y un 50 % en peso de ácido metacrílico. Este polímero está disponible comercialmente, por ejemplo, de Evonik bajo el nombre EUDRAGIT® L 100-55. Otra forma comercial, bajo el nombre de EUDRAGIT® L 30 D-55, que es una dispersión que comprende un 30 % en peso de EUDRAGIT® L 100-55, también está disponible comercialmente de Evonik. El nombre IUPAC para este último polímero es poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1.

35 Generalmente, el primer polímero está presente en la composición polimérica en aproximadamente 50 a 70 % en peso (del polímero seco), preferentemente en aproximadamente 55-66 % en peso de la composición polimérica. Generalmente, el segundo polímero está presente en la composición polimérica en aproximadamente 10 a 30 % en peso (del polímero seco), preferentemente en aproximadamente 15 a 25 % en peso de la composición polimérica.

40 De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, el primer polímero está presente en la composición polimérica en aproximadamente 60 a 70 % en peso (del polímero seco), preferentemente en aproximadamente 64 % en peso de la composición polimérica.

45 De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, el segundo polímero está presente en la composición polimérica en aproximadamente 10 a 20 % en peso (del polímero seco), preferentemente en aproximadamente 14 a 18 %, con mayor preferencia a aproximadamente 16 %.

50 De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, el primer polímero está presente en la composición polimérica en aproximadamente 54 a 58 % en peso (del polímero seco), preferentemente en aproximadamente 56 % en peso de la composición polimérica.

55 De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, el segundo polímero está presente en la composición polimérica en aproximadamente 22 a 25 %, preferentemente en aproximadamente 24 % en peso de la composición polimérica.

60 De acuerdo con una modalidad preferida, el poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 está presente en la composición polimérica al 50-70 % en peso del polímero seco, preferentemente al 55-65 %, y poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 está presente en la composición polimérica al 10-30 % en peso del polímero seco, preferentemente, al 22-25 %.

65 De acuerdo con una modalidad preferida, el poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 está presente en la composición polimérica al 60-70 % en peso del polímero seco, preferentemente al 64 %, y

poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 está presente en la composición polimérica al 10-20 % en peso del polímero seco, preferentemente, al 14-18 %, con mayor preferencia a aproximadamente 16 %.

5 De acuerdo con una modalidad preferida, el poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 está presente en la composición polimérica al 54-58 % en peso del polímero seco, preferentemente al 56 %, y poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 está presente en la composición polimérica al 22-25 % en peso del polímero seco, preferentemente, al 24 %.

10 La composición polimérica sensible al pH, por lo tanto, generalmente comprende los siguientes componentes:

- a. 50-70 % de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 en peso de polímero seco,
- b. 10-30 % de poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 en peso de polímero seco,
- 15 c. al menos un éster de mono-, di- o triglicérido de ácido graso, o mezclas de los mismos,
- d. al menos un plastificante,
- e. al menos un emulsionante no iónico.

20 De acuerdo con una modalidad de la invención, los componentes a. y b. constituyen aproximadamente del 75 al 85 %, preferentemente el 80 % de la composición polimérica sensible al pH, mientras que los componentes c., d. y e., constituyen aproximadamente del 25 al 15 %, preferentemente el 20 % de la composición polimérica sensible al pH.

25 De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, la composición polimérica sensible al pH comprende los siguientes componentes:

- a. 60-70 % de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 en peso de polímero seco,
- b. 10-20 % de poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 en peso de polímero seco,
- 30 c. al menos un éster de mono-, di- o triglicérido de ácido graso, o mezclas de los mismos,
- d. al menos un plastificante,
- e. al menos un emulsionante no iónico.

35 De acuerdo con otra modalidad preferida de la invención, la composición polimérica sensible al pH, comprende los siguientes componentes:

- a. 55-65 % de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 en peso de polímero seco,
- b. 15-25 % de poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 en peso de polímero seco,
- 40 c. al menos un éster de mono-, di- o triglicérido de ácido graso, o mezclas de los mismos,
- d. al menos un plastificante,
- e. al menos un emulsionante no iónico.

45 Como componente c., pueden usarse uno o más mono-, di- o tri-ésteres de glicerol de ácidos grasos conocidos, adecuados para usar en una composición farmacéutica, o mezclas de los mismos. Se prefieren los monoésteres y diésteres de glicerol. Se prefiere especialmente el monoestearato de glicerol, por ejemplo, "monoestearato de glicerol 40-55".

50 El mono-, di- o triglicérido de éster de ácido graso puede estar presente generalmente en aproximadamente 5 a 10 %, preferentemente, 6-7 %, con mayor preferencia 6 % de la composición en peso.

Como componente d., pueden usarse uno o más plastificantes conocidos, adecuados para usar en una composición farmacéutica. Como ejemplo, puede citarse el citrato de trietilo.

55 El uno o más plastificantes pueden estar presentes generalmente en aproximadamente 5 a 10 %, preferentemente aproximadamente 6-8 %, con mayor preferencia aproximadamente 5-6 % de la composición en peso.

60 El componente e., uno o más emulsionantes no iónicos, adecuados para su uso en una composición farmacéutica, conocidos por los expertos, se incluyen en la composición polimérica. Preferentemente, el emulsionante no iónico tiene un valor HLB de entre 12 y 16. Un emulsionante no iónico preferido es monooleato de sorbitán polioxi-etileno (20) (también conocido como polisorbato 80, y vendido bajo el nombre comercial Tween 80).

65 El uno o más emulsionantes no iónicos, si están presentes, pueden estar presentes generalmente en aproximadamente 4 a 12 %, preferentemente aproximadamente 6-10 %, con mayor preferencia aproximadamente 7-9 % en peso de la composición.

De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, la composición polimérica sensible al pH comprende:

- 5
- a. 50-70 % de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 en peso de polímero seco,
 - b. 10-30 % de poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 en peso de polímero seco,
 - c. 5 a 10 % de monoestearato de glicerol,
 - d. 5 a 8 % de citrato de trietilo,
 - e. 6 a 9 % de polisorbato 80.

10 Los componentes c., d., y parte del componente e. puede suministrarse convenientemente como una mezcla, por ejemplo, bajo el nombre comercial de Plasacryl[®] suministrado por Evonik, en Alemania. De acuerdo con una modalidad de la invención, si Plasacryl[®] se usa en la fabricación de la composición de polímero sensible al pH, debe agregarse un emulsionante no iónico adicional para lograr el intervalo correcto para el componente e. Por ejemplo, si la composición polimérica sensible al pH está compuesta por un 80 % de componentes de mezcla polimérica a. y b., y 20 % de los componentes c., d. y e. (al menos un éster de mono-, di- o triglicérido de ácido graso, o mezclas de los mismos, al menos un plastificante y al menos un emulsionante no iónico), puede añadirse, por ejemplo, 12 % de Plasacryl[®]T20 y un 8 % adicional de un emulsionante no iónico para lograr las cantidades correctas de componentes c., d. y e.

De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, la composición polimérica sensible al pH comprende:

- 20
- a. 60-70 % de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 en peso de polímero seco,
 - b. 10-20 % de poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 en peso de polímero seco,
 - c. 5 a 10 % de monoestearato de glicerol,
 - d. 5 a 8 % de citrato de trietilo,
 - e. 6 a 9 % de polisorbato 80.
- 25

De acuerdo con otra modalidad preferida de la invención, la composición polimérica sensible al pH comprende:

- 30
- a. 50-60 % de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 en peso de polímero seco,
 - b. 20-30 % de poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 en peso de polímero seco,
 - c. 5 a 10 % de monoestearato de glicerol,
 - d. 5 a 8 % de citrato de trietilo,
 - e. 6 a 9 % de polisorbato 80.
- 35

Las cápsulas pueden recubrirse con el polímero sensible al pH de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos. Por ejemplo, puede citarse el recubrimiento de tambor o el recubrimiento en lecho fluido. Generalmente, las cápsulas están recubiertas con aproximadamente 3,5 o 4,0 mg/cm² a aproximadamente de 6,0 mg/cm² de polímero aplicado a la cápsula. Como sabe el experto en la materia, el grosor del recubrimiento puede usarse para modificar ligeramente el tiempo de liberación del contenido de la cápsula. Por lo tanto, las cápsulas recubiertas con aproximadamente 3,5 mg/cm² de polímero liberará su contenido en el intestino un poco antes que las cápsulas recubiertas con, por ejemplo, 5,5 mg/cm².

40

Si se usa un material de cápsula que tiene tendencia a entrecruzarse con el polímero sensible al pH (por ejemplo, gelatina), se recomienda llevar a cabo un recubrimiento previo de dicha cápsula con hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) o hidroximetilcelulosa (HMC), preferentemente con 0,1-0,5 mg/cm², antes de proceder con el recubrimiento con el polímero sensible al pH.

45

Si las cápsulas tienen tendencia a adherirse entre sí o al soporte o al material de empaquetado que se está usando, después de recubrirlas con el polímero sensible al pH, puede emplearse un recubrimiento adicional de tipo cosmético para evitar que se peguen. Un recubrimiento cosmético es aquel que no afecta las características fisiológicas de la cápsula y típicamente se usa para cambiar el color, la textura, el tamaño o la sensación en la boca de la cápsula oral. Como agente de recubrimiento cosmético, puede citarse PEG 6000, o por ejemplo Opadry[®] (disponible en Colorcon, PA, Estados Unidos).

50

55

A continuación, las cápsulas recubiertas pueden rellenarse con la muestra bacteriana. Típicamente, una cápsula de tamaño 0 puede rellenarse entre aproximadamente 0,2 y 0,6 g, preferentemente aproximadamente 0,4 g de producto seco.

Después del llenado, las cápsulas se cierran y se coloca la parte de la "tapa" de la cápsula sobre la parte del "cuerpo" de la cápsula. El rellenado y cierre de las cápsulas se lleva a cabo mediante métodos conocidos por el experto en la materia y normalmente se realizan de forma automática o semiautomática mediante el uso de equipos adecuados. Puede citarse como ejemplo un sistema de encapsulación semimanual como Optimatic 300 (FarmaLabor, Italia).

60

65

Alternativamente, las cápsulas pueden rellenarse con la muestra bacteriana preparada y luego cerrarse, seguido de un recubrimiento con el polímero sensible al pH, de acuerdo con los métodos de recubrimiento conocidos por los expertos.

5 Usos de las formulaciones farmacéuticas orales de acuerdo con la invención:

FMT:

10 De acuerdo con una modalidad de la invención, las formulaciones orales farmacéuticas son particularmente adecuadas para su uso en el FMT.

15 El FMT generalmente se usa para administrar una o más muestras de microbiota fecal de un donante sano, que puede ser un donante individual o un grupo de donantes, a un sujeto que sufre de disbiosis, o en riesgo de desarrollar disbiosis y posiblemente también sufre de una patología relacionada, o en riesgo de desarrollar una patología relacionada. Las patologías relacionadas incluyen diarreas asociadas a *Clostridium difficile* (CDI), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), síndrome del intestino irritable (ISB), estreñimiento idiopático, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, diabetes tipo II, alergias alimentarias, cáncer, que incluye leucemia, GvHD refractaria y obesidad mórbida, autismo, esclerosis, diarrea del viajero, infección vaginal crónica (que incluye cistitis, micosis), infecciones de huesos y articulaciones, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia y trastornos bipolares.

20 El sujeto puede estar sufriendo de disbiosis iatrogénica y patologías y complicaciones relacionadas que incluyen, pero no se limitan a, sepsis, choque séptico, trastornos gastrointestinales (que incluyen, pero no se limitan a, diarrea, mucositis, dolor abdominal, sangrado GI).

25 A un sujeto se le puede administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación oral farmacéutica.

30 Este tipo de FMT se conoce como FMT alogénico. En el caso de un grupo de donantes, las muestras de microbiota fecal se agrupan y procesan de acuerdo con métodos conocidos, de esta manera se obtiene una muestra de microbiota fecal representativa del grupo.

Las formulaciones orales farmacéuticas pueden administrarse a un sujeto durante o después de una intervención o tratamiento médico que probablemente provoque disbiosis (disbiosis iatrogénica).

35 Las formulaciones orales farmacéuticas pueden administrarse a un sujeto para prevenir o tratar la disbiosis iatrogénica y patologías y complicaciones relacionadas que incluyen, pero no se limitan a, sepsis, choque séptico, trastornos gastrointestinales (que incluyen, pero no se limitan a, diarrea, mucositis, dolor abdominal, sangrado GI).

40 Si el propio sujeto proporciona una muestra de microbiota fecal antes de dicha intervención o tratamiento médico, y luego se le administra dicha muestra de microbiota fecal, durante o después de dicha intervención o tratamiento médico, el FMT se conoce como FMT autólogo.

Las formulaciones orales farmacéuticas pueden usarse para la administración en FMT autólogo o alogénico.

45 Las formulaciones orales farmacéuticas pueden administrarse a un sujeto antes del tratamiento médico para aumentar la probabilidad de éxito o eficacia del tratamiento médico. Por ejemplo, podemos citar el área de la oncología, donde puede realizarse el FMT en pacientes antes de determinados tratamientos contra el cáncer para aumentar la eficacia del tratamiento (ver, por ejemplo, la solicitud de patente europea EP 3209692. En este documento, se usa una selección de cepas que se encuentran comúnmente en la microbiota sana como adyuvante del tratamiento con bloqueadores de puntos de control inmunitarios, para inmunoestimular a los pacientes, potenciando la eficacia del tratamiento contra el cáncer).

50 Las formulaciones orales farmacéuticas para su uso en el FMT generalmente comprenden una cápsula "dura" recubierta con un polímero sensible al pH, que contiene cantidades terapéuticamente efectivas de una mezcla bacteriana. Típicamente, para una cápsula de tamaño 0, cada cápsula contiene aproximadamente $1,0 \cdot 10^{10}$ a $2 \cdot 10^{10}$ bacterias.

55 También pueden estar presentes en las cápsulas otros agentes tales como probióticos, prebióticos, agentes antiinfecciosos u otros agentes que pueden potenciar la recolonización intestinal.

60 Como ejemplos de prebióticos podemos citar 2'Fucosilactosa, Lacto-difucotetraosa, 3-Fucosilactosa, Lacto-N-fucopentaosa I, Lacto-N-fucopentaosa II, Lacto-N-fucopentaosa III, Lacto-N-neotetraosa, Lacto-N-tetraosa, 3'sialilactosa, 6'sialilactosa, 3'sialilacto-N-tetraosa, 6'sialil-lacto-N-neotetraosa, inulina, fructooligosacárido (FOS), fructooligosacárido de cadena corta (FOS de cadena corta), galactooligosacárido (GOS), inulina, xilooligosacárido (XOS), gangliósido, goma guar parcialmente hidrolizada, goma arábiga, goma de soja o mezclas de los mismos.

65

Como probióticos, podemos citar los siguientes *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, y *E. coli* Nissle. En particular, los probióticos y los probióticos no replicantes, tal como el género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* o una combinación de los mismos, por ejemplo *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium breve*, o combinaciones de los mismos, y/o fracciones no viables de estas bacterias.

Como ejemplos de agentes antiinfecciosos, podemos citar agentes bactericidas tales como la reuterina, las lactococinas o fagos específicos.

Como ejemplos de otros agentes que pueden potenciar la recolonización intestinal, podemos citar los micronutrientes como por ejemplo el zinc o el cobre, o los polifenoles.

TMF modificado:

De acuerdo con una modalidad de la invención, las formulaciones orales farmacéuticas son particularmente adecuadas para su uso en el FMT modificado (mFMT). El mFMT puede usarse para administrar una o más muestras de microbiota fecal modificada de un donante sano, que puede ser un donante individual o un grupo de donantes, a un sujeto. El sujeto puede sufrir disbiosis, o correr el riesgo de desarrollar disbiosis y posiblemente también sufrir una patología relacionada, o correr el riesgo de desarrollar una patología relacionada. Las patologías relacionadas incluyen diarreas asociadas a *Clostridium difficile* (CDI), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), síndrome del intestino irritable (ISB), estreñimiento idiopático, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, diabetes tipo II, alergias alimentarias, cáncer, GvHD refractaria y obesidad mórbida, autismo, esclerosis, diarrea del viajero, infección vaginal crónica (que incluye cistitis, micosis), infecciones de huesos y articulaciones, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia y trastornos bipolares. El mFMT puede usarse para asegurar la efectividad terapéutica de una bacteria específica o una mezcla de bacterias específicas en la formulación farmacéutica. Generalmente, la cantidad de bacterias que se entregan al intestino es de tal manera que la población relativa final de esa bacteria o mezcla de bacterias administrada aumenta significativamente con respecto a la población antes del mFMT. Por ejemplo, se desea que una cantidad terapéuticamente efectiva de *Faecalibacterium prausnitzii* se entregue al intestino en el tratamiento o prevención de enfermedades inflamatorias del intestino. La cantidad para producir el efecto terapéutico depende de la abundancia relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* en el intestino. En este caso, la formulación oral debe contener suficientes bacterias para aumentar esta abundancia relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* en el intestino, al menos al 15 %. El experto en la materia sabe cómo dosificar la bacteria o la mezcla de bacterias para que se alcance el objetivo de colonización.

Puede programarse el sujeto para que se someta a una intervención médica. La modificación de la microbiota fecal puede realizarse, por ejemplo, mediante el cultivo de los microorganismos fecales en condiciones que favorecen o desfavorecen el crecimiento de determinadas especies. Esto también puede denominarse como selección de microorganismos. También puede llevarse a cabo mediante el enriquecimiento de los microorganismos fecales mediante la adición de una o más especies bacterianas a los microorganismos fecales. También puede llevarse a cabo mediante el aislamiento de un subgrupo de uno o más microorganismos fecales de la población original de microorganismos fecales. Este subgrupo de una o más especies se usa luego en el FMT modificado. Típicamente, en las formulaciones orales para su uso en el mFMT, para una cápsula de tamaño 0, cada cápsula contiene aproximadamente $1,0 \cdot 10^{10}$ a $2 \cdot 10^{10}$ bacterias.

Bacterioterapia fecal:

De acuerdo con una modalidad de la invención, las formulaciones orales farmacéuticas son particularmente adecuadas para su uso en la bacterioterapia fecal. De acuerdo con esta modalidad, las cápsulas comprenden una mezcla de al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal para el tratamiento o prevención de patologías asociadas a la disbiosis.

Al sujeto se le puede administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación oral farmacéutica.

Preferentemente, la mezcla compleja de muchas bacterias derivadas de la microbiota fecal es una mezcla que contiene al menos dos especies diferentes de bacterias.

Como mezclas de bacterias derivadas de la microbiota fecal, podemos citar mezclas escogidas de las siguientes bacterias: *Faecalibacterium prausnitzii*, *Blautia hydrogenotrophica*, *Akkermansia muciniphila*, *Enterococcus spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia hominis*, *Christensenella spp.*, *Lactobacillus spp.*

Por ejemplo, la formulación oral farmacéutica de acuerdo con una modalidad de la invención, comprende una mezcla de las siguientes bacterias *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides fragilis*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia hominis*. Esta mezcla puede usarse para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD).

5 De acuerdo con una modalidad de la invención, la formulación oral farmacéutica comprende una mezcla de las siguientes bacterias *Akkermansia muciniphila*, *Christensenella spp.* Esta mezcla puede usarse para el tratamiento de la obesidad y la diabetes.

10 De acuerdo con otra modalidad de la invención, la formulación oral farmacéutica comprende una mezcla de las siguientes bacterias *Akkermansia muciniphila*, *Enterococcus spp.*, y *Bacteroides fragilis*. Esta mezcla puede usarse para el tratamiento de la disbiosis intestinal asociada con quimioterapia o inmunoterapia.

15 Al igual que las formulaciones orales farmacéuticas para su uso en el FMT, en las que se trasplanta toda una microbiota fecal, las formulaciones orales farmacéuticas para su uso en "bacterioterapia fecal" en las que se administran mezclas de al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal, comprenden una cápsula "dura" recubierta con un polímero sensible al pH, que contiene cantidades terapéuticamente efectivas de una mezcla bacteriana. Típicamente, para una cápsula de tamaño 0, cada cápsula contiene aproximadamente $1,0 \cdot 10^{10}$ a $2 \cdot 10^{10}$ bacterias. Como se discutió para el mFMT, la cantidad de bacterias o mezcla de bacterias que se administrará al intestino es generalmente una cantidad tal que la población relativa final de esa bacteria o mezcla de bacterias aumenta con respecto a la población relativa antes de la bacterioterapia fecal. El experto en la materia sabe cómo dosificar la bacteria o la mezcla de bacterias para que se alcance el objetivo de colonización.

20 También pueden estar presentes en las cápsulas otros agentes tales como prebióticos, agentes antiinfecciosos u otros agentes que incluye probióticos, que pueden potenciar la recolonización intestinal.

25 Como probióticos, podemos citar los siguientes *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, y *E. coli Nissle*. En particular, los probióticos y los probióticos no replicantes, tal como el género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* o una combinación de los mismos, por ejemplo *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium breve*, o combinaciones de los mismos, y/o fracciones no viables de estas bacterias.

35 Como ejemplos de agentes antiinfecciosos, podemos citar agentes bactericidas tales como la reuterina, las lactococinas o fagos específicos.

40 Como ejemplos de otros agentes que pueden potenciar la recolonización intestinal, podemos citar los micronutrientes como, por ejemplo, el zinc o el cobre, o los polifenoles.

Ventajas y eficacia de las formulaciones orales farmacéuticas:

45 Las formulaciones orales farmacéuticas de la invención proporcionan una forma de dosificación eficaz, fiable y fácil de usar para la terapia del FMT y también para la bacterioterapia fecal. Las formulaciones orales de la invención son especialmente adecuadas para la terapia del FMT ya que liberan su contenido en el íleon y el colon. Por lo tanto, las formulaciones tienen excelentes perfiles de disolución, sin una liberación de contenido significativa entre pH 1,2 y pH 6,8, seguida de una liberación rápida a pH 7,2.

50 La precisión lograda con respecto a la liberación del contenido a pH 7,2 o superior se debe a la mezcla de polímeros sensibles al pH usada para recubrir las cápsulas. Sin estar ligado a la teoría, se considera que las cantidades exactas de los componentes c., d. y e. sirven para homogeneizar eficientemente la mezcla de polímeros de los componentes a. y b., de esta manera proporcionan un recubrimiento extremadamente homogéneo y permite una rápida iniciación de la liberación a pH 7,2. Como se detalla anteriormente, la proporción relativa de cada uno de los componentes del polímero a. y b. es importante, así como también la proporción de la mezcla de a. y b. a la proporción de c., d. y e. generalmente la proporción de [a.+ b.]:[c. + d. +e.] es 75-85: 15-25, 80:20. Sorprendentemente, los inventores también han descubierto que las cantidades reivindicadas (6-9 %) de tensioactivo no iónico (componente e.) son particularmente importantes para lograr el inicio de la liberación a un pH de 7,2 y, por lo tanto, sin una liberación significativa a un pH de 6,8. Las proporciones más bajas de tensioactivo no iónico no permiten que comience la administración en el íleon y el colon, porque el inicio de la liberación es a un pH inferior a 6,8 (datos no mostrados).

65 Pueden incluirse dosis relativamente eficaces de bacterias para la recolonización intestinal en las formulaciones orales farmacéuticas, lo que reduce de esta manera el número de cápsulas que debe ingerir el paciente. Esto representa una ventaja significativa sobre otros métodos de bacterioterapia y de FMT, e incluso con respecto a otras formulaciones orales farmacéuticas para mezclas bacterianas.

Típicamente, la carga bacteriana en un enema de FMT es de aproximadamente 5×10^{10} a 6×10^{10} bacterias, cantidad adecuada para una buena recolonización. De acuerdo con una modalidad de la invención, una cápsula de la formulación oral farmacéutica puede contener desde $1,0 \times 10^{10}$ a 2×10^{10} bacterias. Por lo tanto, la administración de cuatro o cinco cápsulas a un sujeto puede ser suficiente para proporcionar una carga bacteriana suficiente para que se produzca la recolonización intestinal con la microbiota fecal de la formulación oral farmacéutica.

Una ventaja importante de las formulaciones orales farmacéuticas es que pueden ser ingeridas por el sujeto sin vigilancia médica. No es necesario congelarlos y pueden almacenarse en el refrigerador o a temperatura ambiente. Estas ventajas conducen a una mayor comodidad y cumplimiento del paciente. Esto también significa que el tratamiento puede tomarse durante varios días si es necesario, lo que permite, de esta manera, que la recolonización intestinal se produzca de forma progresiva. Por lo tanto, el tratamiento puede realizarse en un período de varios, por ejemplo 3, 4, 5 o 6 días, frente a 1 o 2 días que son habituales para los tratamientos de enema o transcolónicos.

La ventaja del uso de las formulaciones orales farmacéuticas de la invención es que la mezcla de bacterias derivadas de la microbiota fecal se entrega al íleon y colon, sin haber sido liberada en el estómago o el duodeno. Se conserva la viabilidad bacteriana y se conserva el perfil taxonómico (diversidad). El Ejemplo 3 describe un conjunto de pruebas de disolución en cápsulas de acuerdo con el Ejemplo 2. Las cápsulas del Ejemplo 2 que contenían cafeína se sometieron a pruebas de disolución USP2, así como también a pruebas de disolución USP2 adaptadas. Los resultados de la prueba de disolución USP2 se muestran en la Tabla 2 y la Figura 1a. Los resultados indican que no hay disolución significativa a pH 1,2 y pH 6,8. La liberación comienza rápidamente a pH 7,2.

De manera similar, en las pruebas de disolución USP 2 adaptadas que discriminan más específicamente el yeyuno (pH 6,8) y el íleon (pH 7,2), se observa que no hay una liberación significativa (menos del 1 %) a pH 1,2 y pH 6,8. Sin embargo, la liberación es rápida a pH 7,2. Los resultados de la prueba de disolución USP2 adaptada se muestran en la Tabla 3 más abajo.

Se fabricaron varios lotes de cápsulas de acuerdo con las diferentes modalidades de la invención (ver el Ejemplo 4 más abajo) y se probaron en las pruebas de disolución USP2 (ver el Ejemplo 5). Todos los lotes consistían en cápsulas recubiertas con la mezcla polimérica de EUDRAGIT[®], EUDRAGIT[®] FS 30 D /EUDRAGIT[®] L 30 D-55. Algunos de los lotes se recubrieron adicionalmente con PEG 6000 para evitar que las cápsulas se pegaran entre sí. Los perfiles de disolución obtenidos en el Ejemplo 5 se muestran en la Figura 2. Los resultados indican que no hay disolución significativa a pH 1,2 y pH 6,8. La liberación comienza rápidamente a pH 7,2. Notamos que el Lote #14 corresponde a una cápsula recubierta con $3,5 \text{ mg/cm}^2$ de la mezcla polimérica de EUDRAGIT[®], mientras que el Lote # 20B corresponde a una cápsula recubierta con $5,5 \text{ mg/cm}^2$ de la mezcla polimérica de EUDRAGIT[®]. Ambos lotes se recubren mediante el uso de un recubrimiento de tambor. Notamos que el Lote # 20B publica su contenido un poco más tarde (aproximadamente 30 minutos) que el Lote # 14.

Se llevaron a cabo más pruebas de disolución en un sistema TIM-1 que es un modelo preclínico del tracto gastrointestinal compuesto por cuatro compartimentos, es decir, el estómago, el duodeno, el yeyuno y el íleon. En esta prueba, la liberación ocurre solo en el íleon.

La conservación de la viabilidad bacteriana y la preservación de la diversidad de la microbiota también ha sido demostrada por el solicitante de las formulaciones orales farmacéuticas, de acuerdo con una modalidad de la invención. El Ejemplo 1 describe una preparación de producto de FMT liofilizado, en el que se recogieron heces y se preparó una muestra de microbiota fecal liofilizada. El perfil taxonómico de la muestra se estimó mediante el uso de datos metagenómicos específicos (16S) obtenidos mediante la secuenciación del segmento V3-V4 del gen 16S de ADNr mediante el uso de métodos estándar. El perfilado se realizó antes y después de la liofilización y el almacenamiento intermedio, así como también antes y después de la molienda y el encapsulado. Se encontró que las formulaciones tenían viabilidad preservada, así como también diversidad preservada.

La invención se describe además con referencia a los ejemplos siguientes. Se apreciará que la invención, como se reivindica, no pretende quedar limitada de ningún modo por estos ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación del producto de FMT liofilizado

1) Recolección de heces y preparación de inóculo.

Se recogieron heces frescas en un dispositivo adecuado (durante un máximo de 72 horas) y la muestra se transformó en un inóculo líquido mediante el uso del método descrito en el Ejemplo 2 de la solicitud de patente internacional WO 2017/103550. La viabilidad bacteriana del inóculo antes de la liofilización se determinó mediante el uso de la tecnología de citometría de flujo celular de forma estándar. El perfil taxonómico del inóculo se estimó mediante el uso de datos metagenómicos (16S) específicos obtenidos mediante la secuenciación del segmento V3-V4 del gen 16S de ADNr mediante el uso de métodos estándar.

2) Secado por congelación y almacenamiento intermedio

El inóculo se liofilizó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3 del documento WO 2017/103550. Después de la liofilización, los liofilizados se trituraron manualmente y se almacenaron en empaques protectores (tubos de PE/vidrio con tapón desecante o bolsa de aluminio con cremallera). Se determinó la viabilidad del liofilizado y se estimó su perfil taxonómico.

5

3) Molienda y encapsulación

Después del almacenamiento, los productos se molieron mediante el uso de un molinillo de cuchillas (Tube Mill - cápsulas de un solo uso, IKA Werke GmbH & Co. KG, Alemania), con molienda realizada entre 10 000 y 5000 RPM, durante 20 a 40 segundos. Se determinó la viabilidad del liofilizado molido y se estimó su perfil taxonómico.

10

Se encontró que las formulaciones proporcionaban una cantidad de bacterias viables que oscilaba entre $6,80 \cdot 10^9$ a $1,39 \cdot 10^{10}$ unidad/0,5 gramos de producto molido.

15

La preservación de la diversidad de la microbiota se confirmó mediante el cálculo de la riqueza de los índices de diversidad Alfa y el índice de Simpson para cada muestra. La riqueza es el número de especies diferentes (OTU) observadas dentro de una muestra. El índice de Simpson se deriva de la riqueza y considera la abundancia relativa de cada especie, está comprendido entre 0 y 1 (0, en su mayoría una especie dominante -> 1, en su mayoría muchas especies raras o varias especies dominantes y muchas raras). Dentro de cada par (un inóculo y su liofilizado derivado), la riqueza dio un valor de entre 225 y 325 especies. La diferencia máxima dentro de un par fue de aproximadamente 25 especies, lo cual es muy limitado. La reducción del índice de Simpson entre inóculo y liofilizado osciló entre 1 y 2 %. Esto significa que la riqueza de las muestras se mantiene después del secado por congelación y la liofilización.

20

Además, los perfiles de microbiota de la muestra se conservaron fuertemente entre el inóculo y el liofilizado. Toda la similitud de Bray-Curtis osciló entre 0,89 y 0,92.

25

Por último, los productos se encapsularon en las cápsulas de acuerdo con el Ejemplo 2 mediante el uso de un sistema de encapsulación semimanual tipo Optimatic 300 (Farmalabor, ITALIA). Las cápsulas llenas se colocaron en empaques protectores (tubos de PE/vidrio con tapón desecante o bolsillo de aluminio con cremallera o blíster).

30

Ejemplo 2: Recubrimiento de la cápsula

Las cápsulas de hipromelosa de tamaño 0 están recubiertas con un polímero sensible al pH.

35

La composición del polímero se describe en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición de polímero sensible al pH

40

Componente	Relación general	Relación preferida
EUDRAGIT® FS 30 D (polímero seco)	60-70 %	62-66 %
EUDRAGIT® L 30 D-55 (polímero seco)	14-18 %	15-16 %
Monoestearato de glicerol 40-55	4-8 %	5-7 %
Citrato de trietilo	4-8 %	5-6 %
Polisorbato 80 (Tween®80)	6-10 %	7-9 %

45

50

Los componentes se mezclan y el polímero se filtra (250 µm).

La cabeza y el cuerpo de la cápsula se recubren por separado mediante el uso de un equipo de lecho fluidizado por aire (Glatt GPCG-5), ya sea mediante pulverización inferior, pulverización superior o pulverización tangencial. El equipo se opera generalmente bajo las siguientes condiciones:

55

- Régimen de flujo de aire: 250 a 350 m³/h
- Temperatura de flujo del aire: 35 a 40 °C
- Temperatura del producto: 25 a 28 °C
- Velocidad de pulverización: 15 a 25 g/minuto
- Polímero aplicado: 4,0 a 6,0 mg/cm²

60

Ejemplo 3: Pruebas de disolución en cápsulas llenas de cafeína del Ejemplo 2

65

Se determinaron los perfiles de disolución de cápsulas de hipromelosa que se recubrieron de acuerdo con el Ejemplo 2 y se rellenaron con cafeína.

(a) Pruebas de disolución USP 2

Se expusieron tres cápsulas a pH 1,2 durante 2 horas, luego a pH 6,8 durante 1 hora y finalmente a pH 7,2 durante 2 horas. Las pruebas de disolución USP 2 se realizaron mediante el uso del aparato de paletas ERWEKA DT 700, ajustado a 37 °C y 75 RPM. En cada punto de tiempo, se determinó el deterioro de la cápsula mediante el uso de la detección de cafeína en el medio con HPLC-UV. La HPLC-UV se realizó en 10 µl del medio, en una serie Agilent 1100er mediante el uso de los siguientes parámetros de ejecución:

- Columna: Géminis 2 µm C18 100 mm x 4,6 mm
- Fase móvil: mezcla de Metanol Licrosolv y Agua Purificada (relación 3/7)
- Régimen de flujo: 1 ml/min
- Tiempo de ejecución: 8 minutos
- Longitud de onda del detector: 273 nm

Los resultados se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 1a:

Tabla 2: Resultados del perfil de disolución de acuerdo con el método USP 2

Medio	Tiempo [min]	Cápsula 1	Cápsula 2	Cápsula 3
pH 1,2	0	0,07	0,00	0,00
pH 1,2	60	0,00	0,00	0,06
pH 1,2	120	0,00	0,00	0,06
pH 6,8	150	0,00	0,00	0,22
pH 6,8	180	0,04	0,10	1,07
pH 7,2	190	0,53	0,38	48,22
pH 7,2	200	97,40	86,45	69,18
pH 7,2	210	99,35	97,33	98,81
pH 7,2	225	99,89	100,07	99,89
pH 7,2	240	99,97	99,99	100,09
pH 7,2	300	99,99	99,88	100,19

La Figura 1a muestra el perfil de disolución de la cápsula para el método USP 2. No se observa una disolución significativa (< 1 %) a pH 1,2 y 6,8. La liberación comienza rápidamente a pH 7,2.

(b) Pruebas de disolución USP 2 adaptadas: El método USP 2 adaptado discrimina más específicamente el yeyuno (pH 6,8) y el íleon (pH 7,2).

Las pruebas de disolución USP 2 adaptadas se realizaron mediante el uso del aparato de paletas ERWEKA DT 700, ajustado a 37 °C y 75 RPM. Las cápsulas se expusieron a solución de HCl 0,1 N pH 1,2 (estómago en ayunas) durante 2 horas, luego tampón fosfato pH 6,8 (yeyuno) durante 1 hora y finalmente tampón fosfato pH 7,2 (íleon) durante 2 horas. En cada punto de tiempo, se determinó el deterioro de la cápsula mediante el uso de la detección de cafeína en el medio con HPLC-UV.

La cromatografía de HPLC-UV se realizó en 10 µl del medio, en un instrumento de la serie Agilent 1100er mediante el uso de los siguientes parámetros de ejecución: - Columna: Géminis 2 µm C18 100 mm x 4,6 mm- Fase móvil: mezcla de Metanol Licrosolv y Agua Purificada (relación 3/7) - Régimen de flujo: 1 ml/min- Tiempo de ejecución: 8 minutos- Longitud de onda del detector: 273 nm

Tabla 3: Perfil de disolución con método USP 2 adaptado

Medio	Tiempo [min]	Cápsula 1	Cápsula 2	Cápsula 3
pH 1,2	0	0,09	0,00	0,00
pH 1,2	60	0,08	0,00	0,53
pH 1,2	120	0,13	0,00	0,00

(continuación)

	pH 6,8	150	0,21	0,00	0,00
	pH 6,8	180	0,44	0,13	0,00
5	pH 7,2	190	0,90	0,45	0,00
	pH 7,2	200	4,45	1,47	0,00
	pH 7,2	210	10,17	4,51	1,92
10	pH 7,2	225	27,79	74,12	25,11
	pH 7,2	240	68,37	99,07	47,44
	pH 7,2	300	100,65	99,31	99,53

La Tabla 3 y la Figura 1b muestran el perfil de disolución de la cápsula para una prueba USP2 adaptada.

El perfil demuestra la funcionalidad de administración ileocólica, sin una disolución significativa (< 1 %) a pH 1,2 y 6,8. La liberación es rápida a pH 7,2.

(c) TIM

El sistema TIM-1 es un equipo preclínico que imita el tracto gastrointestinal. Está compuesto por 4 compartimentos, es decir, el estómago y el duodeno, yeyuno e íleon.

Cada compartimento se compone de unidades de vidrio con una membrana interior flexible y se rellena con medio al pH correspondiente. Se lanzaron cuatro ensayos en el sistema TIM-1: MP01 (Ensayo 1), MP02, MP03 (Ensayo 2) y MP04 (Ensayo 3).

MP02 se suspendió debido a una fuga en el sistema operativo TIM.

Para el Ensayo 1 (MP01): La observación visual y el recuento en placa confirman la resistencia del estómago. La liberación comienza al final del yeyuno y se confirma en el íleon a pesar de la ausencia de observación visual de una disolución clara.

Para el Ensayo 2 (MP03): La observación visual y el recuento de placas confirman la funcionalidad deseada, se detecta disolución en el íleon.

Para el Ensayo 3 (MP04): La observación visual y el recuento de placas confirman la funcionalidad deseada, se detecta disolución en el íleon.

Como muestran los experimentos USP2, USP2 adaptado y TIM, se confirma la funcionalidad de la cápsula.

Los experimentos muestran que, para todas las cápsulas, la liberación comenzará al final del yeyuno y se completará al final del yeyuno o continuará en el colon, incluso si el pH disminuye.

Para todas las cápsulas abiertas, la salida no fue total al final del yeyuno, sin embargo, una vez abierta la cápsula, la salida puede continuar en todo el colon incluso si el pH disminuye.

Ejemplo 4: Se fabricaron varios lotes de cápsulas.

Las cápsulas de hipromelosa de tamaño 0 están recubiertas con un polímero sensible al pH. La composición del polímero se describe en la Tabla 4a. La relación de mezcla polimérica usada y las condiciones de recubrimiento se describen en la Tabla 4b.

Tabla 4a: Composición de polímero sensible al pH

Componente	Relación general	Relación preferida
EUDRAGIT® FS 30 D (polímero seco)	50-70 %	55-65 %
EUDRAGIT® L 30 D-55 (polímero seco)	10-30 %	15-25 %
Monoestearato de glicerol 40-55	4-8 %	5-7 %
Citrato de trietilo	4-8	5-6 %
Polisorbato 80 (Tween®80)	6-10 %	7-9 %

ES 2 947 578 T3

Tabla 4b: Composición de polímero sensible al pH y condiciones de recubrimiento

Número de lote	Tamaño del lote	Aplicación total de polímeros	Relación		Método de recubrimiento
			EUDRAGIT® FS 30 D		
			EUDRAGIT® L 30 D-55		
#14	1000	3,5 mg/cm ²	62-66 % de EUDRAGIT® FS 30 D		Tambor
			15-16 % de EUDRAGIT® L 30 D-55		
		0,5 mg/cm ²			
		PEG 6000			
# 02/04	3000	5,5 mg/cm ²	62-66 % de EUDRAGIT® FS 30 D		Lecho fluido
			15-16 % de EUDRAGIT® L 30 D-55		
		0,5 mg/cm ²			
		PEG 6000			
# 06/08	3000	5,5 mg/cm ²	54-58 % de EUDRAGIT® FS 30 D		Lecho fluido
			22-25 % de EUDRAGIT® L 30 D-55		
		0,5 mg/cm ²			
		PEG 6000			
# 10/12	10,000	5,5 mg/cm ²	62-66 % de EUDRAGIT® FS 30 D		Lecho fluido
			15-16 % de EUDRAGIT® L 30 D-55		
		0,5 mg/cm ²			
		PEG 6000			
# 20A	3000	4,0 mg/cm ²	62-66 % de EUDRAGIT® FS 30 D		Tambor
			15-16 % de EUDRAGIT® L 30 D-55		
# 20B	3000	4,5 mg/cm ²	62-66 % de EUDRAGIT® FS 30 D		Tambor
			15-16 % de EUDRAGIT® L 30 D-55		
		0,5 mg/cm ²			
		PEG 6000			

Los componentes se mezclan y el polímero se filtra (250 µm). Para estos lotes, se usan métodos de recubrimiento de tambor y lecho fluido.

Para el recubrimiento en lecho fluido, se usan las mismas condiciones que las descritas para el Ejemplo 2. En el Ejemplo 4, el Lote #14 (1000 cápsulas) se produjo mediante el uso de un tambor de recubrimiento de tamaño mediano (30 cm de diámetro) y aplicando 3,5 mg/cm² de polímero. Para el Lote #20B, se produjeron 3000 cápsulas mediante el uso del mismo equipo, pero con un tambor más grande (36 cm de diámetro) y la aplicación de 4,5 mg/cm² de polímero. Las condiciones para la fase de pulverización se indican más abajo:

Tambor de 30 cm Tambor de 36 cm

ES 2 947 578 T3

	Tambor de 30 cm	Tambor de 36 cm
- Volumen de aire de entrada m ³ /hora:	59 a 61	79 a 87
- Temperatura de flujo del aire °C:	30 a 40	32 a 38
- Temperatura del lecho del producto °C:	26 a 30	26 a 30
- Velocidad de pulverización/minutos:	1 a 3,5	2,5 a 6,5
- Polímero aplicado mg/cm ²	3,5 a 6,0	3,5 a 6,0

Ejemplo 5: Pruebas de disolución en cápsulas llenas de cafeína del Ejemplo 4

Se determinaron los perfiles de disolución de cápsulas de hipromelosa recubiertas de acuerdo con el Ejemplo 4 que se rellenaron con cafeína. Las pruebas se llevaron a cabo de la misma manera que los del Ejemplo 3. Los resultados se muestran en la Figura 2 y en la Tabla 5 más abajo.

No se observa una disolución significativa (< 1 %) a pH 1,2 y 6,8. La liberación comienza rápidamente a pH 7,2. Los resultados se muestran en la Figura 2. El Lote #14 corresponde a una cápsula recubierta con 3,5 mg/cm² de polímero, mientras que corresponde a una cápsula recubierta con 5,5 mg/cm². Ambos se recubren mediante el uso de un recubrimiento de tambor. Notamos que el Lote #20B publica su contenido un poco más tarde (aproximadamente 30 minutos más tarde) que el lote #14. Ambos lotes (así como también todos los lotes probados) tienen perfiles de disolución adecuados para su uso en el FMT.

Tabla 5: Resultados del perfil de disolución de acuerdo con el método USP 2 para las cápsulas de acuerdo con el Ejemplo 5

		20517/02-04		20517/06-08		20517/10-12		20517/14		20517/20B	
Medio	Tiempo	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
pH 1,2	0	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00
pH 1,2	60	0,02	0,03	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01	0,01
pH 1,2	120	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02	0,03	0,03	0,00	0,03
pH 6,8	150	0,06	0,06	0,35	0,15	0,05	0,05	0,79	0,19	0,18	0,12
pH 6,8	180	0,76	0,37	4,16	2,92	1,18	0,40	4,65	1,87	1,35	0,34
pH 7,2	190	1,50	0,61	7,88	6,34	2,85	1,23	8,95	4,32	2,24	0,54
pH 7,2	200	3,14	0,94	22,95	27,81	6,77	2,24	35,39	33,09	3,64	1,62
pH 7,2	210	7,04	3,27	28,86	30,13	13,53	5,13	57,12	37,15	5,60	2,93
pH 7,2	225	18,78	9,30	43,23	29,38	37,19	17,89	80,03	20,17	29,49	4,02
pH 7,2	240	49,29	36,35	60,53	26,45	63,62	19,06	95,03	4,93	59,75	5,28
pH 7,2	300	96,70	3,05	99,24	0,54	99,56	0,79	99,33	0,23	100,24	0,06
Homogeneizar	303	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación oral farmacéutica de una mezcla encapsulada de al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal, en donde las cápsulas están recubiertas de una composición polimérica sensible al pH que comprende:
- 10 a. 50-70 % de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 en peso de polímero seco,
 b. 10-30 % de poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 en peso de polímero seco,
 c. 5 a 10 % en peso de al menos un éster de mono-, di- o triglicérido de ácido graso, o mezclas de los mismos,
 d. 5 a 8 % en peso de al menos un plastificante,
 e. 6 a 9 % en peso de al menos un emulsionante no iónico.
- 15 2. Una formulación oral farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las cápsulas están recubiertas de una composición polimérica sensible al pH que comprende:
- 20 a. 60-70 % de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 en peso de polímero seco,
 b. 10-20 % de poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 en peso de polímero seco,
 c. 5 a 10 % en peso de al menos un éster de mono-, di- o triglicérido de ácido graso, o mezclas de los mismos,
 d. 5 a 8 % en peso de al menos un plastificante,
 e. 6 a 9 % en peso de al menos un emulsionante no iónico.
- 25 3. La formulación oral farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la cápsula se fabrica de hidroxipropilmetilcelulosa.
- 30 4. La formulación oral farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, en donde la composición polimérica sensible al pH comprende:
- 35 a. 50-70 % de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 en peso de polímero seco,
 b. 10-30 % de poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 en peso de polímero seco,
 c. 5 a 10 % en peso de monoestearato de glicerol,
 d. 5 a 8 % en peso de citrato de trietilo,
 e. 6 a 9 % en peso de al menos un emulsionante no iónico, preferentemente, que tiene un HLB entre 12 y 16.
- 40 5. La formulación oral farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4, en donde la composición polimérica sensible al pH comprende:
- 45 a. 60-70 % de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 en peso de polímero seco,
 b. 10-20 % de poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 en peso de polímero seco,
 c. 5 a 10 % en peso de monoestearato de glicerol,
 d. 5 a 8 % en peso de citrato de trietilo,
 e. 6 a 9 % en peso de al menos un emulsionante no iónico, preferentemente, que tiene un HLB entre 12 y 16.
- 50 6. La formulación oral farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la composición polimérica sensible al pH comprende:
- 55 a. 62 a 66 % de poli(acrilato de metilo-co-metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) 7:3:1 en peso de polímero seco,
 b. 14 a 18 % de poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etilo) 1:1 en peso de polímero seco,
 c. 5 a 8 % en peso de monoestearato de glicerol,
 d. 5 a 8 % en peso de citrato de trietilo,
 e. 6 a 9 % en peso de polisorbato 80.
- 60 7. La formulación oral farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la mezcla encapsulada de al menos dos bacterias derivadas de la microbiota fecal comprende la microbiota fecal completa de uno o más donantes.
- 65 8. La formulación oral farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la mezcla está presente en forma de liofilizado.

9. La formulación oral farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el liofilizado se ha producido mediante las siguientes etapas:
- 5 A) Mezclar una muestra de microbiota de origen fecal con un diluyente elegido entre un poliol, un di-, tri- o polisacárido o mezclas de los mismos y un agente de relleno, en una relación de entre 1:1 y 1:10,
 B) Congelar la mezcla obtenida en A) y luego liofilizarla.
10. La formulación oral farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la formulación comprende una mezcla de al menos dos, o tres, o cuatro, o cinco, o seis, o siete, u ocho, o nueve o diez bacterias derivadas de la microbiota fecal.
11. La formulación oral farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la formulación comprende una microbiota fecal completa o una microbiota fecal modificada.
- 15 12. La formulación oral farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, para su uso en el trasplante de microbiota fecal autóloga o alogénica, o para su uso en el trasplante de microbiota fecal modificada autóloga o alogénica.
- 20 13. La formulación oral farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el tratamiento o prevención de disbiosis intestinal y patologías asociadas.
- 25 14. La formulación oral farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para uso en la prevención o tratamiento de disbiosis intestinal iatrogénica y patologías y complicaciones asociadas que incluyen, sepsis, choque séptico y trastornos gastrointestinales, que incluyen diarrea, mucositis, dolor abdominal, sangrado gastrointestinal.
- 30 15. La formulación oral farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en donde las patologías asociadas se eligen entre infección y diarrea asociada a *Clostridium difficile* (CDI), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), síndrome del intestino irritable (ISB), estreñimiento idiopático, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, diabetes tipo II, alergias alimentarias, cáncer, que incluye leucemia, enfermedad refractaria de injerto contra hospederero, obesidad y obesidad mórbida, autismo, esclerosis, diarrea del viajero, infección vaginal crónica (que incluye cistitis, micosis), infecciones de huesos y articulaciones, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia y trastornos bipolares y disbiosis intestinal asociada con quimioterapia o inmunoterapia contra el cáncer.
- 35 16. La formulación oral farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), en donde la formulación comprende una mezcla de *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides fragilis*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia hominis*.
- 40 17. La formulación oral farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el tratamiento o prevención de la obesidad y la diabetes, en donde la formulación comprende una mezcla de *Akkermansia muciniphila* y *Christensenella sp.*
- 45 18. La formulación oral farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el tratamiento o prevención de disbiosis intestinal asociada con quimioterapia o inmunoterapia contra el cáncer, en donde la formulación comprende *Akkermansia muciniphila*, *Enterococcus spp.*, y *Bacteroides fragilis*.

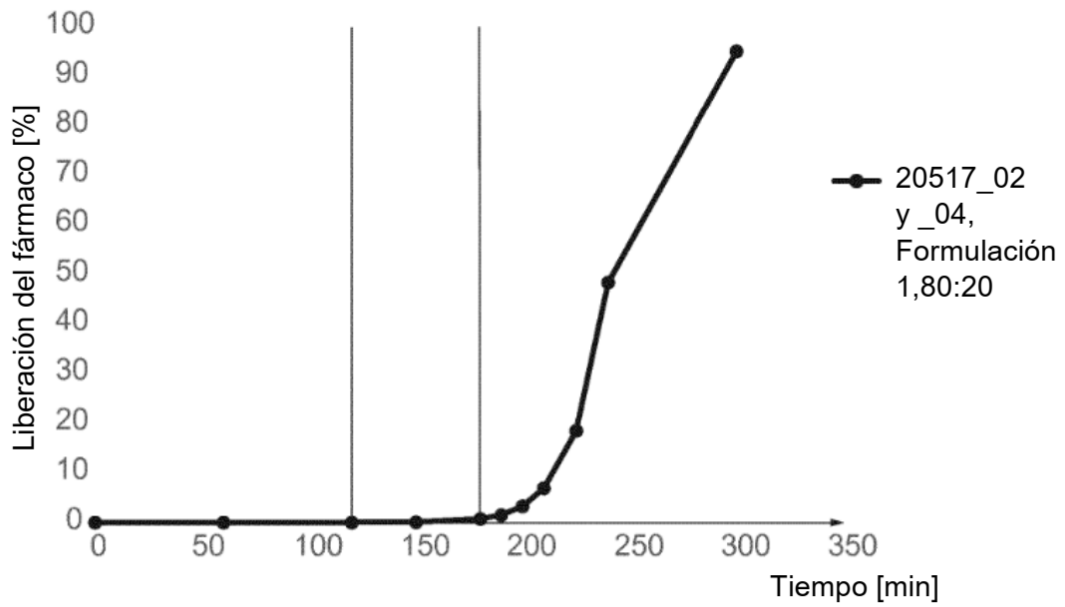


Figura 1a

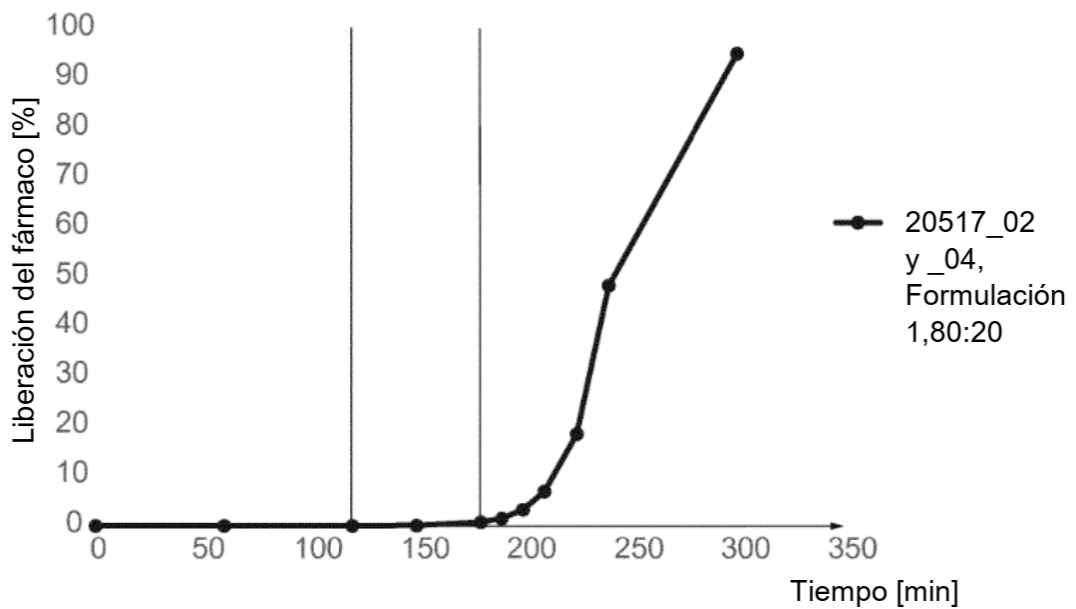


Figura 1b

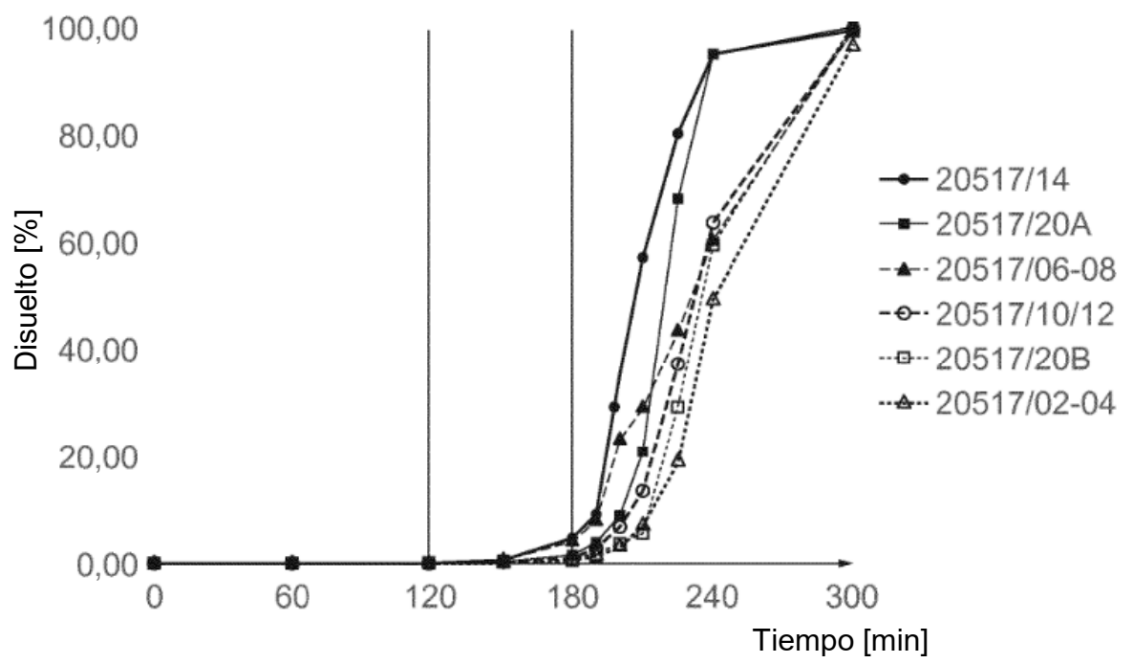


Figura 2