

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 979**

51 Int. Cl.:

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2010** **PCT/GB2010/000035**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.07.2010** **WO10079343**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2010** **E 10700756 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017** **EP 2384190**

54 Título: **Formulaciones de células viables para administración oral**

30 Prioridad:

09.01.2009 GB 0900350

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

07.11.2017

73 Titular/es:

CAMBRIDGE ENTERPRISE LIMITED (50.0%)
The Old Schools Trinity Lane
CambridgeCambridgeshire CB2 1TN, GB y
PROKARIUM LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

EDWARDS, ALEXANDER y
SLATER, NIGEL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 640 979 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

Formulaciones de células viables para administración oral

- 5 La presente invención se refiere a formulaciones para la administración oral de células de vacunas bacterianas viables.

10 Actualmente, la administración oral de bacterias vivas se utiliza en dos tipos principales de aplicación terapéutica. En primer lugar, las cepas de bacterias entéricas sin modificar identificadas a partir de aislados del contenido intestinal tienen interés terapéutico en la re-colonización del intestino tras el tratamiento con antibiótico [1], para aliviar los síntomas de quienes padecen enfermedad intestinal inflamatoria [2] y también, en formas obtenidas por ingeniería genética, para la administración de terapias biológicas (p.ej., IL-10 [3]. En segundo lugar, las bacterias vivas son un atractivo candidato como vacuna. Actualmente, se está desarrollando una serie de pruebas clínicas humanas para analizar diversas cepas de bacterias vivas atenuadas de protección contra enfermedades como cólera, *E. coli* enterotóxico y fiebre tifoidea ([4]). Las vacunas bacterianas vivas tienen la ventaja con respecto a las vacunas convencionales de poderse administrar por vía oral, evitando el uso de inyecciones y agujas. Las vacunas bacterianas vivas obtenidas por ingeniería genética también pueden llevar ADN heterólogo o antígenos de patógenos o tumores para estimular o cebar una respuesta inmune contra patógenos o células tumorales.

20 Para la administración de bacterias vivas éstas se suelen secar por razones de estabilidad. La alternativa a la formulación seca para administrar bacterias vivas es un formato "húmedo", p.ej., un producto alimentario como yogur. La bacteria viva presenta problemas de estabilidad significativos en formas líquidas, incluso con la refrigeración.

25 Se ha propuesto una serie de sistemas de micro-encapsulación para administración oral de bacterias [5], pero todos ellos adolecen del mismo problema de degradación de la bacteria durante el almacenamiento de las bacterias y la necesidad de una costosa refrigeración para reducir su degradación.

30 Se conocen diversas técnicas para producir bacterias secadas dentro de la técnica. La más extendida es el liofilizado convencional. Por otra parte, últimamente se está poniendo el punto de mira en el uso de disacáridos como trehalosa y sacarosa, que estabilizan las biomoléculas y hacen más estables las bacterias secadas a temperatura ambiente [6], [7]. Las bacterias secadas estabilizadas con disacáridos, por ejemplo, pueden almacenarse adecuadamente a temperatura ambiente.

35 Actualmente, se están administrando las bacterias vivas secadas por vía oral en dos formatos habituales: cápsulas entéricas de bacterias liofilizadas y sobrecitos de bacterias liofilizadas para su re-suspensión en tampón bicarbonato. Frecuentemente, se administran dosis muy altas de bacterias y son necesarias varias dosis para obtener tan solo un efecto moderado. Curiosamente, los datos clínicos indican que la formulación de la cápsula entérica es significativamente menos eficaz que el sistema de tampón bicarbonato [8][15], si bien se desconoce en gran medida el motivo por el que las cápsulas entéricas son relativamente ineficaces.

40 Se desconoce en gran medida el mecanismo de acción del sistema de tampón de bicarbonato. Probablemente la cantidad de tampón bicarbonato tragada no absorba el ácido segregado en el estómago, de manera que parece probable que las bacterias administradas de esta forma encuentren cierta acidez. A pesar de estas posibles limitaciones, la co-administración con tampón bicarbonato o un tampón similar que neutralice el ácido es el modo de administración convencional hoy en día en las pruebas clínicas humanas de cepas de vacunas en desarrollo contra enfermedades como el cólera [9] y *E. coli* enterotóxico [10].

50 El estómago tiene la capacidad de segregar ácido clorhídrico y reducir el contenido a un pH por debajo de 1. Son pocas las bacterias que pueden sobrevivir a este pH [11] y se ha demostrado que las bacterias vivas secadas son incluso más sensibles que las bacterias de cultivos frescos [12]. Se puede utilizar un revestimiento "entérico" para evitar la inactivación de las formulaciones de bacterias vivas en ácido gástrico. Un revestimiento entérico es una capa de polímero que no se disuelve en condiciones ácidas, pero sí se disuelve en el intestino tras la evacuación del estómago liberando las bacterias secas hacia intestino delgado superior. Tal como se ha señalado, las cápsulas entéricas de una vacuna bacteriana viva que existen son relativamente ineficaces pese a su capacidad para proteger las bacterias del ácido del estómago [8].

60 El intestino contiene una mezcla compleja de enzimas y otros agentes microbicidas. La bilis es segregada al duodeno desde la vejiga biliar. La bilis comprende generalmente al menos un 50 % de ácidos biliares que actúan como detergentes para disolver y digerir los componentes de alimentos grasos. Los ácidos biliares son también potentes para eliminar bacterias. Las cepas bacterianas que residen normalmente en emplazamientos intestinales, como *Salmonella* spp., han desarrollado mecanismos de resistencia a detergentes como sales biliares, dando cabida a su supervivencia y crecimiento en el intestino.

65 Por lo general, las bacterias pierden su resistencia a los ácidos biliares tras el secado o congelado. Las bacterias secadas que se liberan al intestino desde una formulación entérica son sensibles a los ácidos biliares y no

sobreviven en el entorno intestinal [12].

Se ha notificado el uso de formulaciones que comprenden un primer inmunógeno y uno o más segundos inmunógenos para administrar el primer inmunógeno en emplazamientos en particular dentro del tracto gastrointestinal [18].

La presente invención se refiere al hallazgo de que la incorporación de cantidades reducidas de un agente de unión a la bilis en las formulaciones de células viables secadas aumenta de forma significativa la supervivencia de las células en el tracto intestinal. De acuerdo con la invención, el agente de unión a la bilis es colestiramina, y las células viables secadas viables son células para vacuna bacteriana viables secadas. Esto se aplica para el resto de la memoria descriptiva, siempre que se haga referencia a la invención. Estas formulaciones, por tanto, pueden ser útiles para la administración oral de células de vacuna bacteriana vivas al intestino. Un primer aspecto de la invención proporciona una formulación sólida que comprende células de vacuna bacteriana viables secadas y un agente de unión a bilis que es colestiramina para su uso en un método de inmunoterapia, tal como se expone en la reivindicación 1. Un segundo aspecto de la invención proporciona un método para producir la formulación sólida para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo dicho método las etapas de acuerdo con la reivindicación 12.

El agente de unión a bilis permite que los líquidos acuosos impregnen la formulación pero absorbe los ácidos biliares y retarda su permeación a través de la formulación. Esto protege a las células viables secadas de la toxicidad del ácido biliar hasta que se rehidratan con el líquido acuoso permeante y recuperan su tolerancia a la bilis. Esto puede aumentar la eficacia de administración de las células en el intestino, por ejemplo. Las células viables secadas pueden ser células microbianas. Las bacterias entéricas son muy conocidas dentro de la técnica e incluyen patógenos y especies que no son patógenos, como por ejemplo, Enterobacteriaceae como *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* spp, y también *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Campylobacter* y *Streptococcus* spp.

La administración de células bacterianas entéricas al intestino puede ser útil, por ejemplo, para restaurar la flora intestinal de un paciente, p.ej., tras un tratamiento con antibióticos, y para aliviar los síntomas de pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria. Las células microbianas viables secadas pueden ser células eucariotas, como por ejemplo, células de levadura o de hongos, como *Saccharomyces*, *Aspergillus* spp o *Candida* spp. La administración de células microbianas con propiedades enzimáticas específicas u otras propiedades en el intestino puede ser útil por ejemplo, en la descomposición o metabolismo de compuestos o toxinas asociados a enfermedad, como oxalato, que constituye un factor de riesgo para la formación de cálculos renales, o para reducir los niveles de colesterol, al influir en la absorción intestinal. Las células microbianas pueden expresar un factor terapéutico, como proteína recombinante. Los polipéptidos recombinantes adecuados pueden ser exógenos a la célula bacteriana (es decir, un polipéptido expresado de forma no natural por la célula bacteriana, como por ejemplo un polipéptido humano) y pueden tener un efecto terapéutico sobre el paciente. Entre los polipéptidos recombinantes adecuados se incluyen citoquinas, incluyendo interleuquinas como IL-10; quimioquinas; y anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o moléculas de unión relacionadas que se unen a mediadores de la respuesta inmune, tales como citoquinas (p.ej., para neutralizar FNT-alfa en enfermedades inflamatorias intestinales).

Entre las células microbianas adecuadas para la expresión de polipéptidos recombinantes se incluyen células de especies bacterianas de ácido láctico, p.ej., *Lactococci* como *L. lactis* (European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics (2005) 60:349), *Enterobacteriaceae* y otras bacterias entéricas como las descritas anteriormente y otras células microbianas como levaduras y hongos, como por ejemplo *Saccharomyces* o *Candida* spp.

En la invención, las células viables secadas son células de una vacuna bacteriana viva. Las vacunas bacterianas vivas son por lo general células bacterianas cuya virulencia ha sido atenuada, por ejemplo, por inactivación de uno o más genes de virulencia. Dentro de la técnica, se conocen muchos ejemplos de células bacterianas atenuadas para su uso en vacunas.

Una vacuna bacteriana puede ser una célula atenuada de un patógeno bacteriano. La expresión de antígenos endógenos nativos del patógeno mediante la vacuna atenuada puede estimular o cebar una respuesta inmuno protectora contra cepas del patógeno virulentas que no son vacunas. Entre las vacunas bacterianas adecuadas se incluyen células atenuadas de células de *Vibrio cholerae*, cepas enterotóxicas de *E. coli*, como 0157:H7, 0121 y 0104:H21, especie *Shigella*, como *S. dysenteriae*, *S. sonnei*, *S. boydii* y *S. flexneri*, la especie *Campylobacter* como *C. jejuni*, y la especie *Salmonella* como *Salmonella enterica* (especialmente, serovar *Typhi*).

Las vacunas de bacterias vivas para su uso en tratamiento terapéutico o profiláctico de tifoideas son muy conocidos dentro de la técnica e incluyen las cepas *Salmonella typhi* Ty21a (Vivotif™), Ty800, CVD908, CVD908-htr, CVD915, y ZH9.

Las vacunas de bacterias vivas para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico contra el cólera son muy conocidas dentro de la técnica e incluyen JBK-70, CVD 101, CVD 102, CVD104, CVD 105,395N1, JJM43, TCP2, CVD 103, CVD103-RM, CVD 103-HgR (Mutachol®), CVD110, Bahrain-3, Peru-3, Peru-5 y Peru-15.

Las vacunas de bacterias vivas para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de shigelosis y disentería bacteriana son también muy conocidas en la técnica e incluyen cepas de vacunas atenuadas de *Shigella* atenuada, como CVD 1204 y WRSS1.

- 5 Las vacunas de bacterias vivas para su uso en el tratamiento terapéutico y profiláctico contra la diarrea son también muy conocidas dentro de la técnica e incluyen células de *E. coli* enterotóxico atenuado como PTL002 y PTL003.

Las vacunas de bacterias vivas para su uso en el tratamiento terapéutico y profiláctico de listeriosis son también muy conocidas dentro de la técnica e incluyen cepas atenuadas de *Listeria monocytogenes*, como Lmdd.

- 10 Una vacuna bacteriana puede comprender un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno exógeno, es decir, un antígeno que no es expresado de forma natural por la célula de la vacuna (por ejemplo un antígeno humano o viral o un antígeno de especies bacterianas diferentes). La vacuna bacteriana puede estimular o cebar una respuesta inmune protectora contra el antígeno exógeno, por ejemplo, cuando se despliega el antígeno sobre la superficie de un patógeno o una célula enferma, como por ejemplo una célula cancerosa o una célula infectada por un virus.

- 15 El término "heterólogo" indica que una secuencia de ácidos nucleicos es una secuencia recombinante que ha sido introducida en una construcción, un vector o una célula artificialmente empleando medios de ingeniería genética o recombinantes, es decir, por intervención humana. Las secuencias de nucleótidos que son heterólogas no se dan juntas en la naturaleza. Las secuencias de nucleótidos o aminoácidos que son heterólogas para una célula, no se dan de forma natural en células de ese tipo, variedad o especie (es decir, exógenas o extrañas). Una secuencia de ácidos nucleicos que es heteróloga para una célula puede codificar una secuencia de aminoácidos heteróloga, es decir, una secuencia de aminoácidos que es exógena o extraña para la célula.

- 25 En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo puede ser expresado por una célula microbiana para producir un antígeno exógeno. El antígeno exógeno puede segregarse desde la célula microbiana, desplegarse sobre la superficie de la célula microbiana o permanecer intracelular dentro de la célula microbiana.

- 30 En otras realizaciones, es posible que el ácido nucleico heterólogo no sea expresado por la célula microbiana. Por ejemplo, se puede transferir el ácido nucleico heterólogo a una célula huésped del individuo tras su administración al intestino y expresarse en la célula huésped. El ácido nucleico heterólogo puede expresarse para producir el antígeno exógeno, por ejemplo, en un método de vacunación de ADN o transferencia de ADN, o puede expresarse para producir una molécula de ARN codificante o no codificante, por ejemplo, en un método de interferencia de ARN.

- 35 Los antígenos exógenos adecuados que se pueden codificar a través de un ácido nucleico hexógeno incluyen antígenos relacionados con enfermedad, como antígenos tumorales, y antígenos de patógenos virales, bacterianos y otros, como por ejemplo antígenos derivados de *Streptococcus mutans*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, VIH, virus de la gripe, virus de la hepatitis, virus del papiloma, *Plasmodium falciparum*, *Francisella tularensis*, y *Schistosoma mansoni*, o antígenos derivados de tumores, tales como Her2/neu o antígeno específico de próstata (AEP).

- 45 Otros antígenos exógenos adecuados incluyen moléculas del individuo, tales como idiotipos de anticuerpo, como por ejemplo, para la generación de una respuesta inmune anti-idiotípica.

- Opcionalmente, la vacuna bacteriana puede co-expresar también un polipéptido inmunomodulador heterólogo recombinante, como por ejemplo, una citoquina, como FNT-alfa, GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, IFN-alfa, IFN-gamma, una quimioquina como CCL-25, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo u otro polipéptido de unión que inhibe citoquinas (p.ej. IL-10, FCT-beta) u otros mediadores de la respuesta inmune o células inmunes (como linfocitos T reguladores o supresores). Esto puede ser útil para aumentar la respuesta inmune al antígeno exógeno.

- 55 Entre las vacunas bacterianas adecuadas para la expresión de antígenos exógenos se incluyen cepas de vacuna bacteriana vivas, tales como bacterias patógenas atenuadas, como *Salmonella enteric*, *Vibrio cholerae*, *E. coli* enterotóxico, *Shigella*, y *Campylobacter jejuni* y células bacterianas no patógenas, incluyedo bacterias entéricas como *Enterobacteriaceae*, y otras bacterias como *Bacillus subtilis* y especies de bacterias de ácido láctico, p.ej., *Lactococci* spp., como *L. lactis* (Nature Reviews Microbiology (2008) 6:349).

- 60 Las células viables secadas en la formulación sólida pueden constituir una población homogénea del mismo tipo de células (por ejemplo, células de la misma cepa de microorganismo). Alternativamente, las células viables secadas en la formulación sólida pueden constituir una población heteróloga que contiene una mezcla de diferentes tipos de células. Por ejemplo, la formulación puede comprender células de dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más tipos diferentes. Los diferentes tipos de células pueden incluir células de diferentes cepas o especies de microorganismos y/o células con diferentes modificaciones genéticas.

65

Las formulaciones descritas en el presente documento se pueden administrar a cualquier individuo adecuado. Por ejemplo, el individuo puede ser un ser humano o un animal no humano, como un roedor (p.ej. una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), murino (p.ej. un ratón), canino (p.ej. un perro), felino (p.ej., un gato), equino (p.ej., un caballo), porcino (p.ej., un cerdo), un primate, simio (p.ej., un mono), un mono (p.ej., tití, mandril), un simio (p. ej., gorila, chimpancé, orangután, gibbon), un ave (p.ej., pollo) o un pez (p.ej., salmón, trucha).

Por ejemplo, las formulaciones descritas en el presente documento que comprenden células de *salmonella* viables secadas pueden ser útiles como vacunas en el tratamiento veterinario de animales no humanos, como cerdos y caballos.

Se puede seleccionar o identificar a los individuos adecuados en la medida en que necesiten el tratamiento.

La formulación comprende preferentemente una cantidad terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz de células viables secadas.

Las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad profilácticamente eficaz", tal como se utilizan en el presente documento conciernen a la cantidad de células viables secadas que son eficaces para producir algún efecto terapéutico o profiláctico deseado, respectivamente, acorde a una relación beneficio/riesgo razonable.

Una formulación descrita en el presente documento puede comprender por ejemplo 10^3 o más, 10^4 o más, 10^5 o más, 10^6 o más, 10^7 o más, 10^8 o más, 10^9 o más o 10^{10} o más células viables secadas.

Las células viables secadas de las formulaciones descritas en el presente documento retienen al menos al menos 0,1 %, al menos 1 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 40 % o al menos 60 % de la viabilidad tras la rehidratación. Por tanto, un significativo número de células dentro de la formulación es capaz de tener actividad metabólica y de división celular tras la rehidratación. Los métodos para valorar la viabilidad de las células son muy conocidos dentro de la técnica e incluyen por ejemplo ensayos de placa para unidades de formación de colona (UFC).

Preferentemente, las células viables secadas en las formulaciones descritas en el presente documento retienen la viabilidad, tal como se ha expuesto anteriormente, cuando se almacena la formulación a temperatura ambiente durante períodos de tiempo prolongados (p.ej., 15 °C a 30 °C durante 24 meses o más).

Las células secadas tienen un contenido de humedad menor que las células sin secar. Por ejemplo, las células secadas pueden contener 10 % o menos, 5 % o menos, 4 % o menos, 3 % o menos o 1% o menos de humedad residual con respecto a las mismas células antes del secado.

Las células adecuadas para su uso, tal como se describe en el presente documento, pueden secarse a través de cualquier método adecuado que no afecte significativamente a la viabilidad de la célula. Dentro de la técnica, se conoce una gama de métodos adecuados, entre los que se incluyen liofilizado, secado a temperatura ambiente, secado por pulverización, secado de lecho fluidizado, secado con espuma, secado directo durante el granulado para formación de comprimidos y congelado con crioprotectores (Potts (2004) Micro Rev 58:755-805; Crowe et al (1990) Cryobiol. 27:219-231; Lievense et al (1994) Adv Biochem Eng Biotechnol. 51 45-89). Opcionalmente, se puede llevar a cabo el secado en presencia de un agente estabilizante, por ejemplo, un disacárido y/o un excipiente farmacéutico, como por ejemplo, un polímero como hidroxipropil metil celulosa.

En algunas realizaciones, se puede liofilizar las células por liofilizado. El liofilizado implica la eliminación del agua de un material congelado por sublimación y desabsorción a presión reducida. Las técnicas de liofilizado adecuadas son muy conocidas dentro de la técnica. (F. Franks European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 1997 (45)221-229; Fundamentals of freeze-drying JD Mellor Academic Press 1978). Opcionalmente, es posible liofilizar las células en presencia de un agente estabilizante, como por ejemplo un disacárido como trehalosa (Israeli et al (1993) Cryobiol 30 519-523; Leslie et al (1995) Appl. Env. Microbiol. 61 3592-3597) y/o un excipiente farmacéutico u otros componentes de la formulación.

En algunas realizaciones, se puede someter las células a secado estabilizado con disacárido. Éste puede comprender el aumento del nivel intracelular de un disacárido, como por ejemplo trehalosa, en las células y, a continuación, el secado de las células en presencia de un agente estabilizante hidrato de carbono, como por ejemplo, por evaporación y a presión reducida y temperaturas no congelante. Entre los agentes estabilizantes de hidratos de carbono se incluyen disacáridos como trehalosa, maltitol, lactitol, palatinit, GPS (alfa-D-glucopiranosil-1->6-sorbitol), GPM (alfa-D-glucopiranosil-1->6-manitol), maltooligosacáridos y maltooligosacáridos hidrogenados. Los métodos de secado estabilizado con disacárido son muy conocidos dentro de la técnica y se describen por ejemplo en Crowe JH et al Annu Rev Physiol 1998; 60:73-103. Bullifent HL, et al. Vaccine 2000 dic 8; 19(9-10):1239-45; García De Castro A, et al Appl Environ Microbiol 2000 Sep; 66(9):4142-4; US6468782 y US6610531.

Los ácidos biliares son ácidos esteroides que se producen en el hígado por oxidación del colesterol y se segregan al intestino como componentes de la bilis. Los ácidos biliares incluyen ácido cólico, ácido desoxicólico y ácido quenodesoxicólico.

- 5 Un agente de unión a ácido biliar o secuestrante es un compuesto que se une, absorbe o secuestra ácidos biliares. Entre los agentes de unión a bilis se incluyen polímeros con carga positiva que se unen al grupo principal de ácido carboxílico con carga negativa de los ácidos biliares. Los polímeros con carga positiva que se unen a ácidos biliares incluyen resinas de intercambio aniónico, como colestiramina (p.ej. Questran™ o Dowex 1X2™), colestilan, colestimida, colextran clorhidrato, colesevelam HCl, colestipol, DEAE-dextrano, celulosa aminada, DEAE-celulosa, 10 TEAE-celulosa, Q sepharosa, QAE Sephadex, hidroxietil celulosa etoxilato cuaternizada y quitosano aminado.

Los polímeros con carga positiva adecuados son conocidos en la técnica para su uso como agentes de reducción del colesterol y se describen por ejemplo en los documentos US4557930, US3308020, US3383281, US3499960, US3780171, WO2005023305 y GB929.391.

- 15 Otros agentes de unión a bilis adecuados incluyen polímeros hidrófobos que se unen a la cola de colesterol hidrófoba de los ácidos biliares. Entre los polímeros hidrófobos adecuados se incluyen polímeros relacionados con poliestireno.

- 20 Otros agentes adecuados pueden incluir también agentes de origen natural, como fibra de la dieta, carbón activo y carbonizado de hueso. En la invención, el agente de unión a bilis es colestiramina.

El agente de unión a bilis puede adoptar cualquier forma o configuración dentro de la formulación, por ejemplo, granulado, polvo, perlas, membranas o monolitos porosos.

- 25 Los datos que se exponen en el presente documento demuestran que una pequeña cantidad de agente de unión a bilis es suficiente para proteger las células viables secadas de la toxicidad del ácido biliar. La cantidad de agente de unión a bilis en la formulación descrita en el presente documento será por lo general significativamente menor que la cantidad requerida para unir todos los ácidos biliares a los que se expone la formulación en el intestino de un individuo.

Una formulación sólida puede presentarse una forma de dosis unitaria y puede comprender 5 g o menos, 2 g o menos, 1 g o menos o 0,5 g o menos de material sólido.

- 35 Una formulación sólida, tal como se describe en el presente documento, puede comprender menos de 95 % (p/p), menos de 90 % (p/p), menos de 80 % (p/p), menos de 70 % (p/p), menos de 60 % (p/p), menos de 50 % (p/p), menos de 40 % (p/p), menos de 30 % (p/p), menos de 20 % (p/p), menos de 10 % (p/p), menos de 1 % (p/p) o menos de 0,1 % (p/p) de dicho agente de unión a bilis.

- 40 Una formulación sólida, tal como se describe en el presente documento, puede comprender más de 5 % (p/p), más de 10 % (p/p) o más de 20 % (p/p), más de 30 % (p/p), más de 40 % (p/p), más de 50 % (p/p), más de 60 % (p/p), más de 70 % (p/p), más de 80 % (p/p), más de 90 % (p/p) o más de 95 % (p/p) de dicho agente de unión a bilis.

- 45 La relación en peso entre las células y el agente de unión a bilis en la formulación puede ser 5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,1 o menos, 0,01 o menos, 0,001 o menos o 0,0001 o menos.

La relación en peso entre el agente de unión a bilis y las células en la formulación puede ser 0,2 o más, 1 o más, 10 o más, 100 o más, 1000 o más o 10000 o más.

- 50 En algunas realizaciones preferentes, las células viables secadas, el agente de unión a bilis y otros componentes de la formulación pueden ir encapsulados en una cubierta polimérica.

La cubierta polimérica puede ser útil para aumentar aún más la resistencia a la bilis de la formulación.

- 55 Preferentemente, la cubierta polimérica comprende un polímero hidrófobo-hidrófilo anfifílico, como por ejemplo hidroxipropil metil celulosa (HPMC). En el mercado hay disponibles cubiertas poliméricas adecuadas.

En algunas realizaciones preferentes, la formulación sólida descrita en el presente documento puede estar cubierta con un revestimiento entérico.

- 60 Un revestimiento entérico es una capa exterior impermeable que protege las células viables secadas de los daños del ácido cuando la formulación pasa a través del estómago y luego permite la liberación de las células cuando la formulación llega al intestino. El uso de revestimientos entéricos es muy conocido dentro de la técnica.

Los revestimientos entéricos pueden ser sensibles al pH. Por ejemplo, es posible que un revestimiento entérico no presente inestabilidad en las condiciones ácidas dentro del estómago (p.ej., pH de 1 a 3), pero puede ser inestable a un pH más alto, dentro del intestino (p.ej. pH por encima de 5,5).

5 Los materiales poliméricos adecuados para su uso en lo revestimientos entéricos son muy conocidos en la técnica y entre ellos se incluyen por ejemplo ácidos grasos, ceras, shellac™, ftalato acetato de celulosa (CAP), copolímeros de ácido metacrílico, copolímeros de acrilato de metilo-ácido metacrílico, acetato succinato de metil celulosa, ftalato de hidroxipropil metil celulosa, ftalato de acetato de polivinilo (PVAP), trimelitato de acetato de celulosa, carboximetil etil celulosa y copolímeros de metacrilato de metilo-ácido metacrílico.

10 Una formulación sólida, tal como se describe en el presente documento puede comprender además uno o más componentes adicionales, como por ejemplo, para modificar o ajustar las propiedades de la formulación para aplicaciones específicas.

15 Por ejemplo, una formulación puede comprender además un agente de liberación retardada que controla la liberación de las células desde la formulación al intestino, tras la disolución del revestimiento entérico, por ejemplo, formando una capa gelatinosa estable que se erosiona lentamente para liberar las células.

20 Entre los agentes de liberación retardada adecuados se incluyen hidroxipropil metil celulosa (HPMC), hidroxietil celulosa y otras celulosas modificada, gomas naturales, como goma guar, polióxido de etileno, polialcohol vinílico y poli(ácido láctico-co-glicólico).

25 Las células viables secadas pueden ser sensibles a otras toxinas en el intestino distintas a los ácidos biliares, como por ejemplo, lisozima; péptidos anti-microbianos como defensinas; y enzimas digestivas, tales como pepsina, tripsina y lipasa. Una formulación puede comprender además agentes para proteger las células de dichas toxinas. Por ejemplo, una formulación puede comprender una resina de intercambio catiónico para unirse a las células viables secadas y protegerlas de las enzimas de carga positiva, como lisozima.

30 Entre las resinas de intercambio de cationes adecuadas se incluyen resinas de intercambio iónico, tales como resina Dowex 50wX1, sulfonato sódico de poliestireno o polímeros como carboximetil celulosa o ácido algínico.

Una formulación puede comprender además estabilizantes para mantener la viabilidad de las células secadas. Entre los ejemplos de estabilizantes adecuados se incluyen hidratos de carbono como los antes descritos.

35 Una formulación puede comprender además uno o más vehículos, adyuvantes, excipientes, aglutinantes, disgregantes, agentes de volumen, deslizantes, diluyentes, cargas, tampones, estabilizantes, conservantes, lubricantes y otros materiales farmacéuticamente aceptables conocidos entre las personas especializadas en la técnica y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos o profilácticos. En algunas realizaciones, una formulación puede comprender además uno o más mucoadhesivos que retienen la formulación en el intestino durante la liberación de las bacterias. Entre los mucoadhesivos adecuados se incluyen polivinil pirrolidona, poliacrilatos, quitosano, metil celulosa, carboxi metil celulosa, hidroxi propil celulosa y otros derivados de celulosa.

45 La expresión "farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en el presente documento concierne a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosis que, dentro del marco de un criterio médico sólido, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (p.ej., un ser humano), sin una excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde a una relación beneficio/riesgo razonable. Cada excipiente, vehículo, etc., debe ser asimismo "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación. En los textos convencionales, como Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 2005; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5ª edición, 2006, Pharmaceutical Press, London, se pueden encontrar vehículos, excipientes, etc., adecuados. La formulación de la invención se produce por secado de células bacterianas viables y mezclándolas después las células viables secadas con un agente de unión a bilis y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable para producir una formulación sólida. Alternativamente, se puede producir la formulación por mezclado de las células bacterianas viables con el agente de unión a bilis y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable para producir una mezcla y, a continuación, se puede secar la mezcla para producir una formulación sólida; en los casos en los que el agente de unión a bilis es colestiramina, las células bacterianas viables son células de vacuna bacteriana. A continuación, se describen métodos adecuados de secado.

60 Las células viables secadas y el agente de unión a bilis pueden mezclarse con otros vehículos, adyuvantes, excipientes y/u otras materiales antes descritos farmacéuticamente aceptables; comprimirse, moldearse o tratarse de otra forma para preparar una formulación adecuada para administración oral; y/o cubrirse con un revestimiento entérico para producir la formulación.

65 La resistencia de las células en la formulación a la exposición de bilis puede determinarse. La cantidad de células y/o agente de unión a bilis en la formulación puede alterarse para optimizar la resistencia de las células a bilis. Por

ejemplo, si puede recuperarse un menor número de células viables de la formulación tras la exposición a bilis, en relación con los controles, entonces puede aumentarse la cantidad de agente de unión a bilis en la formulación.

Las formulaciones sólidas adecuadas para administración oral pueden consistir en una o más unidades discretas, como comprimidos, aglomerados, píldoras, o cápsulas. En algunas realizaciones, una unidad discreta como una píldora o una cápsula puede comprender múltiples sub-unidades, tales como gránulos o polvos.

Las formulaciones sólidas para administración oral pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitarias y puede prepararse a través de cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Dichos métodos pueden incluir la etapa de asociación de las células viables secadas y el agente de unión a bilis con el vehículo que constituye uno o más de los ingredientes adicionales. En general, las formulaciones se preparan asociando uniformemente e íntimamente la mezcla de células viables secadas y el agente de unión a bilis con los vehículos sólidos finamente divididos y, a continuación, si es necesario, dando forma al producto.

Las formulaciones adecuadas para administración oral (p.ej., por ingestión) pueden presentarse como unidades diferenciadas, como cápsulas, obleas o comprimidos, conteniendo cada una de ellas una cantidad predeterminada de las células viables secadas y el agente de unión a bilis; por ejemplo, en forma de polvo o gránulos.

Se puede fabricar un comprimido a través de medios convencionales, p.ej., compresión, moldeo, granulación húmeda o granulación seca, opcionalmente, con uno o más componentes adicionales, como aglutinantes (p.ej., povidona, gelatina, acacia, sorbitol, tragacanto, hidroxipropil metil celulosa), cargas o diluyente (p.ej. lactosa, celulosa microcristalina, hidrogen fosfato cálcico); lubricantes (p.ej. estearato de magnesio, talco, sílice); disgregantes (p.ej., glicolato de almidón sódico, povidona reticulada, carboximetil celulosa sódica reticulada), agentes tensioactivos, de dispersión o de humectación (p.ej., lauril sulfato sódico); y conservantes (p.ej., p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, ácido sórbico). Por ejemplo, pueden prepararse comprimidos comprimiendo en una máquina adecuada el compuesto activo en una forma fluida, como por ejemplo, gránulos o polvos, mezclados opcionalmente con uno o más componentes adicionales. Los comprimidos moldeados pueden obtenerse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Opcionalmente, los comprimidos pueden revestirse o ranurarse y pueden formularse para que proporcionen una liberación lenta o controlada del compuesto activo que contienen utilizando por ejemplo, hidroxí propil metil celulosa u otro agente de liberación retardada variando las proporciones para proporcionar el perfil de liberación deseado. Tal como se ha descrito, es posible proporcionar un revestimiento entérico sobre los comprimidos, aglomerados, píldoras, cápsulas y otras formulaciones sólidas para dar lugar a su liberación en partes del intestino que no sean el estómago.

Las cápsulas que comprenden las células secadas y el agente de unión a bilis en la forma de polvos o gránulos encapsulados en una cubierta polimérica pueden fabricarse a través de los medios convencionales.

Los componentes pueden disponerse en diversas maneras dentro de las formulaciones descritas en el presente documento, y la disposición precisa de los componentes dependerá de las propiedades específicas que se requieran para una aplicación determinada. Por ejemplo, una formulación puede ser homogénea, es decir, las células viables secadas y los agentes de unión a bilis pueden estar distribuidos homogéneamente dentro de la formulación, o puede ser heterogénea, es decir, las células viables secadas y los agentes de unión a bilis pueden estar distribuidos heterogéneamente dentro de la formulación.

En la figura 6, se muestran ejemplos de diferentes disposiciones de los componentes en las formulaciones descritas en el presente documento.

En algunas realizaciones, una formulación puede comprender un núcleo, que comprende una bacteria secada viva y un agente de unión a bilis, y un revestimiento, preferentemente, un revestimiento entérico, que rodea el núcleo. Opcionalmente, el revestimiento puede ser una cubierta polimérica que encapsula el núcleo.

Alternativamente, la formulación puede comprender un núcleo de un excipiente farmacéuticamente aceptable que comprende gránulos de bacterias viables secadas y gránulos del agente de unión a bilis seco. Opcionalmente, el núcleo puede comprender gránulos de material de liberación retardada. Opcionalmente, el núcleo puede encapsularse en una cubierta polimérica. Opcionalmente, la formulación puede comprender además un revestimiento entérico que rodea el núcleo.

Alternativamente, una formulación puede comprender un núcleo de bacterias secas viables que está rodeado de una capa de agente de unión a bilis.

Opcionalmente, la capa de agente de unión a bilis puede comprender además un material de liberación retardada. Opcionalmente, el núcleo y la capa de agente de unión a bilis pueden estar encapsulados en una cubierta polimérica. Opcionalmente, la formulación puede comprender además un revestimiento entérico que rodea la capa de agente de unión a bilis.

Las formulaciones, tal como se describen en el presente documento son estables a temperatura ambiente, es decir, las células se mantienen viables tras un período de almacenamiento prolongado a temperatura ambiente (p.ej., de 15 °C a 30 °C).

- 5 Las combinaciones de agente de unión a bilis y las células viables secadas, p.ej., en una formulación como la descrita, son útiles para administrar células vivas al intestino de un individuo.

Las formulaciones, tal como se describen en el presente documento pueden ser útiles para aplicaciones medicinales, terapéuticas o profilácticas. Por ejemplo, una combinación del agente de unión a bilis y células viables secadas, p.ej., en una formulación como la descrita, pueden ser útiles en el tratamiento terapéutico o profiláctico del organismo humano o animal.

La expresión "tratamiento terapéutico", tal como se utiliza en el presente documento en el contexto de un tratamiento a un individuo de una afección, concierne generalmente al tratamiento y la terapia, ya sea a un ser humano o a un animal no humano (p.ej., en aplicaciones veterinarias), con los que se consigue cierto efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición del avance de una afección e incluye una reducción de la velocidad de avance, un cese de la velocidad de avance, la mejora de la afección o uno o más síntomas de la misma y la curación de la afección.

La expresión "tratamiento profiláctico", tal como se utiliza en el presente documento, en el contexto del tratamiento de un individuo de una afección, concierne generalmente al tratamiento que previene o reduce el riesgo de que una enfermedad o uno o más síntomas de la misma aparezca o sea recurrente. El tratamiento profiláctico puede llevarse a cabo por ejemplo en un individuo (p.ej., un ser humano o un animal no humano) que en el momento del tratamiento no padece la afección y no presenta síntomas de la afección.

En particular, una combinación de un agente de unión a bilis y células viables secadas puede ser útil en el tratamiento terapéutico o profiláctico de infección por patógenos en un individuo. Un método de tratamiento de una infección por patógenos en un individuo puede comprender la administración oral de una combinación de agente de unión a bilis y células viables secadas a un individuo que lo necesita.

Las infecciones por patógenos incluyen infecciones como cólera (*V. cholerae*), tifoideas (*S. typhi*), disentería (*Shigella* spp), ántrax (*Bacillus anthracis*), peste septicémica (*Yersinia pestis*), tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*), lepra (*Mycobacterium leprae*), campilobacteriosis (*Campylobacter* spp) y gastroenteritis (*E. coli* enterotóxico y *Salmonella* spp); infecciones virales como gripe, VIH-SIDA, viruela y SRAS e infecciones parasitarias, como malaria (*Plasmodium* spp), esquistosomiasis (*Schistosoma* spp).

Una combinación de agente de unión a bilis y células viables secadas puede ser útil también en métodos de inmunización y/o inmunoterapia, como por ejemplo, por estimulación o cebado de una respuesta inmune a un antígeno relacionado con enfermedad, codificado y preferentemente expresado por las células. Un método de tratamiento de un individuo por inmunización o inmunoterapia puede comprender la administración oral de una combinación de agente de unión a bilis y células viables secadas a un individuo que lo necesita.

Tal como se ha descrito, el antígeno relacionado con enfermedad puede ser expresado de forma natural por las células (p.ej., en una vacuna bacteriana atenuada) o el antígeno relacionado con enfermedad puede ser un antígeno exógeno que está expresado en la célula desde el ácido nucleico heterólogo.

Las células pueden comprender además ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido inmuno modulador como por ejemplo, una citoquina como FNT-alfa, GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-12, IFN-alfa o IFN-gamma; una quimioquina como CCL-25, o un anticuerpo u otra molécula de unión que inhibe las citoquinas (p.ej. IL-10, FCT-beta) u otros mediadores o células de la respuesta inmune (como por ejemplo linfocitos T reguladores o supresores) que llevan a la potenciación de la respuesta inmune.

Los antígenos relacionados con la enfermedad incluyen antígenos de tumor y antígenos de patógenos virales, bacterianos y otros, tal como se ha descrito. Por ejemplo, las células pueden expresar un antígeno de un patógeno como *Streptococcus mutans*, *Shigella sonnei*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, VIH, virus de la gripe, virus de la hepatitis, *Plasmodium falciparum*, *Francisella tularensis* o *Schistosoma mansoni*, o un antígeno a partir de un tumor como Her2/neu o antígeno específico de próstata (AEP) para provocar o cebar una respuesta inmune al patógeno o tumor. Las formulaciones, tal como se describen en el presente documento, pueden ser útiles por tanto en el tratamiento terapéutico y profiláctico de infección por patógenos y cáncer.

Una combinación de un agente de unión y células viables secadas pueden ser útiles para administrar células viables al intestino, por ejemplo, para restaurar la flora microbiana del intestino de un individuo. Esto puede ser útil por ejemplo tras un tratamiento con antibióticos. Un método de restauración de la flora microbiana del intestino puede comprender la administración oral de una combinación de agente de unión a bilis y células viables secadas a un individuo que lo necesita, p.ej., tras el tratamiento con antibióticos.

Una combinación de agente de unión a bilis y células viables secadas puede ser útil también en el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedad inflamatoria intestinal o uno o más síntomas de la misma en un individuo. Un método de tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal o uno o más síntomas de la misma puede comprender la administración oral de una combinación de un agente de unión a bilis y células viables secadas a un individuo que lo necesita.

Una combinación de agente de unión a bilis y células viables secadas también puede ser útil en el tratamiento terapéutico y profiláctico de formación de cálculos renales en un individuo. Un método de tratamiento de la formulación de cálculos renales puede comprender la administración oral de una combinación de un agente de unión a bilis y células viables secadas a un individuo que lo necesita.

Una combinación de agente de unión a bilis y células viables secadas también puede ser útil para reducir los niveles de colesterol en un individuo. Un método para reducir los niveles de colesterol puede comprender la administración oral de una combinación de un agente de unión a bilis y células viables secadas a un individuo que lo necesita.

Un agente de unión a bilis y células secadas viables puede ser útil en la fabricación de un medicamento para su uso en aplicaciones terapéuticas y profilácticas y los tratamientos que se han descrito.

Las formulaciones adecuadas, los agentes de unión a bilis y las células bacterianas secadas viables se han descrito con más detalle anteriormente.

Los métodos descritos en el presente documento pueden ser útiles por ejemplo para mejorar la eficacia de un agente terapéutico que comprende células viables secadas, tales como una vacuna bacteriana. Un método para mejorar la eficacia de dicho agente puede comprender la formulación del agente con un agente de unión a bilis, tal como se describe en el presente documento.

Los métodos descritos en el presente documento pueden ser útiles también por ejemplo para mejorar la supervivencia de células viables secadas en el intestino de un individuo. Un método para aumentar la supervivencia en el intestino de células de bacterias viables secadas puede comprender una formulación de células con un agente de unión a bilis, tal como se describe en el presente documento.

La divulgación proporciona asimismo el uso de un agente de unión a bilis, tal como se describe en el presente documento, en un método como el descrito en el presente documento, por ejemplo, un método para producir una formulación sólida que comprende células viables secadas para administración oral; aumentar la supervivencia de células bacterianas viables secadas en el intestino de un individuo o mejorar la eficacia de un agente terapéutico que comprende células viables secadas.

En los casos en los que se utiliza "y/o" en el presente documento, debe interpretarse como una divulgación específica de cada una de las dos características o cada uno de los componentes específicos con o sin el otro. Por ejemplo "A y/o B" debe interpretarse como una divulgación específica de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si se indicara cada uno de ellos individualmente en el presente documento.

A continuación, se ilustrará ciertos aspectos y realizaciones de la invención mediante ejemplos y haciendo referencia a las figuras que se describen a continuación.

La Figura 1 demuestra la rápida recuperación de tolerancia a bilis tras la rehidratación.

La Figura 2 demuestra que la eliminación de ácidos biliares de soluciones de bilis utilizando resina fijadora de ácido biliar (BAR por sus siglas en inglés) previene la toxicidad de las soluciones biliares para bacterias secas.

La Figura 3 demuestra que colestiramina evita la toxicidad biliar.

La Figura 4 demuestra que la adición de resina fijadora de ácido biliar (BAR) a un excipiente de secado antes del secado de las bacterias proporciona una significativa protección contra la toxicidad cuando se vuelven a suspender las células secadas en soluciones de bilis.

La Figura 5 demuestra que la adición de BAR a comprimidos de matriz comprimida proporciona una significativa protección contra la toxicidad de una solución de bilis al 1 %.

La Figura 6 presenta tres ejemplos de posibles formulaciones para formas de dosis oral.

La Figura 7 presenta la validación de una formulación optimizada para proteger las células de una vacuna bacteriana viva seca de la bilis.

La Figura 8 presenta la protección de una vacuna de *Salmonella* viva secada contra ácido y bilis utilizando una cápsula de revestimiento entérico y BAR colestiramina.

La Figura 9 presenta la protección de una bacteria de ácido láctico secada contra soluciones biliares en cápsulas utilizando BAR colestiramina. Estos resultados no son de acuerdo con la invención.

Experimentos

Los autores de la invención utilizaron la cepa de vacuna bacteriana viva SLDAPD pUC18I como modelo para la administración bacteriana oral [13]. Se cultivaron las bacterias durante toda la noche en medio M9 (con aminoácidos esenciales y nutrientes) más 250 mM NaCl, a continuación, se secaron muestras de 10 microlitros en solución salina tamponada con fosfato (PBS) más 40 % trehalosa y 1,5 % PVP en un desecador, tal como se describe en ([14]). Se mantuvieron las muestras replicadas secas o se rehidrataron con 200 microlitros de PBS o agua y se dejaron durante 1, 5 o 20 minutos tal como se indica. A continuación, se sometieron a ensayo las muestras secas o recuperadas o células de control desde caldos de cultivo enriquecidos por incubación durante 1 hora diluidos generosamente en ácido o solución de bilis y tampón de control, tal como se indica, seguido de dilución, colocación en placas agar y recuento de las colonias formadas durante toda la noche. Se corrigieron los recuentos bacterianos para la dilución durante la recuperación y el ensayo y se expresaron como ufc/ml en relación con el volumen de muestra de 10 μ l original.

Se observó que las bacterias secadas recuperaban muy rápidamente la tolerancia a la bilis cuando se rehidrataron en agua o tampón antes de su exposición a bilis. Una preparación secada de bacterias que perdió 50 x viabilidad cuando se rehidrató en bilis, ganó una supervivencia 5 x mejor a los 5 minutos de la rehidratación y una supervivencia 20 x mejor al cabo de 20 minutos (fig. 1).

Se obtuvieron resultados similares por rehidratación en tampón y agua. Al cabo de 1 hora de rehidratación, el comportamiento de las bacterias no se distinguió del de las células de control de cultivos líquidos.

Se cultivó durante toda la noche la cepa de vacuna bacteriana viva SLDAPD pUC18I [13] y la cepa *E. coli* K12 DH5a (Invitrogen) en medio M9 más 250 mM NaCl, a continuación, se secaron las muestras de 10 μ l en PBS/40 % trehalosa /1,5 % PVP en un desecador, tal como se describe [12]. Se mezcló una solución al 5% p/v de bilis (Sigma, bilis de buey) en PBS con y sin 10 % p/v de colestiramina (Dowex 1x2, Sigma, Poole RU) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó la colestiramina por centrifugación seguido de filtración (0,2 micrómetros, miliporo). La medida de las sales biliares aplicando un ensayo enzimático (Randox Total Bile Acid Assay, Randox labs, Co. Antrim) demostró que la concentración de las sales biliares se reducía de 130 mM a 0,8 mM con el tratamiento con colestiramina. Se añadieron las soluciones resultantes para replicar muestras de bacterias secadas y se cultivaron durante 1 hora, seguido de dilución, colocación en placa, recuento de las colonias de toda la noche y cálculo de ufc/ml relativas.

Se observó que la eliminación de los ácidos biliares mediante BAR previene eficazmente la toxicidad de soluciones de bilis contra bacterias secadas (fig. 2). La Figura 2 demuestra también la alta toxicidad de bilis contra muestras secadas de diferentes cepas de bacterias, *E. coli* K12, y demuestra que el pretratamiento con colestiramina protege a estas células secadas también. Se secaron muestras secas de 10 μ l de SLDAPD pUC18I (que contenían gen de resistencia a ampicilina) en tubos de ensayo de 6 ml. Para replicar las muestras, se añadieron o bien nada o bien 150 mg de colestiramina sobre la parte superior de las células secadas. A continuación, se añadieron 2 ml de una solución al 2% de bilis en PBS o PBS de control sobre la colestiramina, seguido de incubación durante 1 hora, a 37 grados. Tras la incubación, se tomaron las muestras, se diluyeron, se colocaron en placa y se hizo el recuento de las colonias de toda la noche sobre placas de agar con o sin ampicilina y se hizo el cálculo de las ufc/ml relativas. Se esterilizó colestiramina antes de añadirla a las muestras de bacterias por pretratamiento con 70 % de etanol y un extenso secado. Asimismo, se observó el mismo número de colonias con y sin ampicilina, lo que indicó que solamente la cepa de bacterias de ensayo estaba presente y no se había producido contaminación.

Se observó que la adición de BAR sobre la parte superior de las bacterias secadas seguida de la adición de solución de bilis bloquea la toxicidad de la solución de bilis. Esto demuestra que la eliminación secuencial de la bilis seguida de la administración de líquido en el que se ha eliminado el ácido biliar para secar las bacterias no es necesaria para proteger las bacterias, y demuestra que los ácidos biliares que forman complejo con BAR no tienen toxicidad contra las bacterias secadas (figura 3).

Se suspendieron muestras de 10 μ l replicadas de SLDAPD pUC18I en excipiente de control (40 % trehalosa, 1,5 % PVP en PBS) o excipiente con contenido de BAR (40 % trehalosa, 1,5 % PVP más 5 o 10 % colestiramina en PBS) y se secaron en tubos de ensayo de 6 ml. Para replicar las muestras, se añadieron 2 ml de soluciones de bilis al 2 % o 0,4 % o tampón de control y se incubaron los tubos durante 1 hora a 37 grados, seguido de la obtención de muestras, dilución y colocación sobre placas de agar. Se observó que la inclusión de BAR en el excipiente de secado proporcionaba una protección eficaz de las bacterias secadas de la bilis, incluso en cantidades imposibles de unirse a la cantidad total de ácido biliar presente en la solución de ensayo (fig. 4).

Fundamentalmente, se observó que el simple secado de las bacterias añadiendo pequeñas cantidades de colestiramina al excipiente de secado proporciona una significativa protección en condiciones en las que cabría esperar protección si se uniera BAR y secuestrara los ácidos biliares simplemente. En la figura 4, la cantidad de

colestiramina presente es bastante más reducida que la cantidad total de ácidos biliares presentes en el medio de ensayo. La colestiramina tiene una capacidad de 1,2 mg de sales biliares por 1 mg (el valor típico, el valor exacto depende del ácido biliar a que se une [14]). Por lo tanto, en la muestra de bacterias secadas de 10 µl hay 1 mg de colestiramina con capacidad para 1,2 mg de ácidos biliares, no obstante, en 2 ml de solución de bilis al 2 % está presente un total de 20 mg de ácidos biliares (normalmente, la bilis de buey utilizada contiene un exceso de ácidos biliares de 50 % en peso), más de 15 veces más de ácidos biliares.

Se secaron células SLDAPD pUC18I en excipiente normal (40 % trehalosa, 1,5 % PVP en PBS), después se trituraron en un mortero para obtener un polvo. Se mezclaron las bacterias secadas en polvo en las siguientes proporciones cuidadosamente pesadas:

Comprimidos de control - carga de sacarosa: 9 % bacterias secadas en polvo/91 % sacarosa en polvo
Comprimidos de control- carga de MCC: 8 % bacterias secadas en polvo /92 % celulosa microcristalina (MCC, Avicel PH101)
Comprimidos BAR - Colestiramina: 8% bacterias secadas en polvo /33 % colestiramina/58 % carga de MCC
Comprimidos BAR - Dowex 1X2: 6 % bacterias secadas en polvo / 63% Dowex 1X2 resina de 400 mallas /32 % carga de MCC

A continuación, se prensaron muestras de 70-90 mg de la mezcla en polvo en un troquel de 7 mm en una prensa (Port-A-Press de International Crystal Laboratories, distribuida por Crystan Ltd, con un torque de 10 newton metros) para obtener comprimidos de matriz comprimida de aproximadamente 1 mm de espesor. A continuación, se sometieron a ensayo los comprimidos en condiciones simuladas del intestino del siguiente modo: se pesaron los comprimidos y se añadieron individualmente a porciones de 17 ml de fluido intestinal simulado de la Farmacopea Internacional, es decir tampón fosfato sódico/potásico pH 7,0 en solitario o en combinación con 1 % de solución de bilis de buey y se incubó durante 45 minutos a 37 °C. Se tomaron muestras, se diluyeron, se colocaron en placa durante toda la noche y se hizo el recuento de ufc vivas. El recuento de las bacterias recuperadas se expresó en lo que se refiere al peso de las bacterias secas originales, es decir, en ufc/mg de bacterias secadas, y cada barra representa un solo comprimido, representando la barra de error múltiples recuentos de bacterias para este comprimido.

Se observó que el prototipo de comprimidos para ser humano que contenían BAR además de bacterias secadas ofrece una significativa protección contra la bilis en un modelo de liberación intestinal simulado (figura 5). Los autores de la invención sometieron a ensayo los comprimidos que contenían bacterias secadas vivas con o sin la adición de la BAR colestiramina o la resina de intercambio iónico equivalente Dowex 1x2, por disolución en tampón frente a las soluciones de bilis. Con los comprimidos de control que contenían las bacterias secadas diluidas en sacarosa como carga, se recuperaron 1228 veces menos células tras la disolución en 1 % de solución de bilis en comparación con la disolución en tampón solamente, lo que indica una significativa toxicidad de bilis. De manera similar, con los comprimidos fabricados con MCC como carga, se recuperaron 638 veces menos células tras la disolución en 1 % de solución de bilis en comparación con el tampón en solitario. En cambio, con los comprimidos que contenían colestiramina o resina Dowex 1x2 además de las bacterias secadas y la carga de MCC, la disolución en bilis tan solo dio una reducción de 2,5 a 3,1 veces más en la recuperación de células vivas. Esto representa una mejora de 208 a 254 veces más de células vivas con el comprimido con BAR en comparación con los comprimidos de control. Cabe destacar que los comprimidos de colestiramina contienen un máximo de 24 mg de colestiramina que tiene capacidad de unir un máximo de 29 mg de ácidos biliares, pero 17 ml de solución biliar al 1 % contiene aproximadamente 85 mg de ácidos biliares, por tanto, la colestiramina no secuestra simplemente el total de ácidos biliares que están en exceso en la solución de ensayo.

Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, la formulación puede funcionar del siguiente modo: la colestiramina en el excipiente se une a los ácidos biliares presentes en un volumen limitado del tampón que es absorbido en la muestra seca y, de esta forma, las bacterias secadas se rehidratan en agua "limpia" dando cabida a la rápida recuperación, tal como se muestra en la figura 1. Posteriormente, cuando se disgrega la muestra rehidratada y se dispersa en la solución biliar, las bacterias han recuperado ya una resistencia a la bilis significativa.

Incluso con una simple formulación experimental que consiste en la adición de BAR a excipiente de secado, se recuperaron 50 veces más de bacterias vivas con la formulación con BAR (10 % de colestiramina) que con la formulación de control, cuando se suspendieron en una solución de bilis al 2 %, lo que representa una significativa mejora. Esto representa una reducción de 5 veces más de recuperación de células vivas con la formulación cuando se vuelve a suspender en bilis al 2 %, en comparación con la reducción de 270 veces más de recuperación de células vivas con la formulación de control convencional, con excipiente de secado convencional. De manera similar, con la formulación de comprimido de matriz comprimida que consiste en BAR mezclada con bacterias secadas antes de la compresión del comprimido, se recuperaron de 208 a 254 veces más de bacterias vivas con la formulación de comprimido que contenía BAR que con la formulación de control cuando se volvió a suspender en una solución de bilis al 2 %, lo que representa una significativa mejora. Esto representa una reducción de 2,5 a 3,1 veces más de recuperación de células cuando se diluyó en bilis al 1 % en comparación con una reducción de 1228 a 638 veces más en la recuperación de la célula viva con la formulación de comprimido de control convencional.

Se sometió a ensayo la capacidad de una formulación óptima para proteger de la bilis la vacuna de bacterias viva secada.

En estos experimentos, se utilizó la cepa de vacuna de peste septicémica de ratones SL3261/pAHL [17]; se obtuvieron resultados similares utilizando la cepa de mantenimiento de plásmido sin antibiótico SLDAPD/pUC18I [12, 16, 13]. Se hizo el recuento de las bacterias utilizando placas de agar LB que contenían o bien ampicilina para SLDAPD/pUC18I o bien canamicina para SL3261/pAHL para asegurar que solamente se hacía el recuento de las bacterias de la vacuna. Se dejaron en cultivo las bacterias y se secaron tal como se describe en [12, 16] y, a continuación, se agruparon varias preparaciones secadas replicadas y se trituraron con un mortero hasta obtener un polvo homogéneo y se mezclaron con MCC seco para obtener un polvo fluido para formular y cargar en cápsulas. El contenido normal del polvo fue 2.5×10^6 ufc/mg y se almacenó en un desecador de vacío a temperatura ambiente hasta la realización del ensayo; la preparación presentó una pérdida de menos de 10 % de la viabilidad al cabo de un período de 2 meses.

Se mezcló este polvo con carga de MCC más BAR a 25 %, a continuación, o bien se pesó directamente para introducirlo en los tubos de ensayo, o bien se cargó en cápsulas de tamaño 00 del material de cubierta indicado y se pesaron para introducirlos en los tubos de ensayo. Se añadieron entre 20 -30 mg de bacterias por cada 1 g del total de polvo para asegurar que se incluían entre 6 y 10 mg de bacterias secadas en polvo por cápsula. Se cargó manualmente la mezcla en polvo en cápsulas de tamaño 00 del material de cubierta indicado utilizando un Cap-MQuick (Value Healthcare Company, Sheffield RU); se añadió a la cápsula un soporte de bolas de acero de 6,4 mm de diámetro para que se hundiera durante la disolución.

Se añadieron 25 ml de tampón o 1 % o 4 % de bilis de buey y se incubó a 37 °C durante 50 minutos y, a continuación, se mezcló a fondo dentro de tubos y se tomaron muestras, se diluyeron, se colocaron sobre placas de agar con canamicina y se incubaron durante toda la noche. Se hizo el recuento de las colonias y se utilizaron para determinar el número de células vivas, expresado como UFC por mg en el polvo para vacuna secada inicial. Se emplearon células estabilizadas secadas de la cepa de vacuna de peste septicémica de ratón SL3261/pAHL; se observó una protección similar en experimentos por separado utilizando células secadas en la cepa de vacuna SLDAPD/pUC18I.

Se estudió el efecto de diferentes tipos de BAR en la protección contra la bilis dentro de una cubierta de cápsula de HPMC de liberación rápida. Las cápsulas de HPMC de liberación rápida son cápsulas de HPMC modificadas diseñadas para producir una liberación más rápida que la de las cápsulas de HPMC convencionales. Los estudios con imágenes predijeron que la protección proporcionada por Dowex 1x2 de 400 mallas podía mejorarse significativamente simplemente eliminando la humedad para generar un polvo no agregado y fluido y, de hecho, cuando se añadió Dowex 1x2 de 400 mallas secado a 25 % a LBV secado y una carga de MCC, se observó una diferencia impresionante, ya que Dowex 1x2 de 400 mallas proporcionó una protección 92 veces mayor en comparación con el polvo sin cápsulas. En cambio, la preparación húmeda de Dowex 1x2 de 400 mallas no proporcionó una protección significativa (fig. 7a). Por otra parte, colestiramina proporcionó una protección incluso mejor que la de Dowex 1x2 de 400 mallas secado, con una protección 120 mayor, en comparación con el polvo sin cápsulas, y no presentó ninguna pérdida significativa de bacterias en 1 % de bilis en comparación con el tampón (fig. 7a).

A continuación, se sometió a ensayo una formulación optimizada aumentando la concentración de bilis. Esta formulación incorporó las características de protección previstas según el estudio de imágenes y un trabajo teórico - 25 % de colestiramina, una mayor dosis de y la geometría de la cápsula- y se sometió a ensayo también utilizando cápsulas de HPMC convencionales.

La adición de 25 % de BAR colestiramina tuvo como resultado una recuperación del 100 % de células viables en cápsulas de HPMC en condiciones de 4 % de bilis, sin diferencia en la recuperación de células entre la bilis y el tampón (figura 7). Asimismo, no se detectó ninguna pérdida significativa de bacterias en 4% de bilis en comparación con el tampón cuando se cargaron también cápsulas de HPMC de liberación rápida con 25% de colestiramina y LBV secado (fig. 7b). Por tanto, la simple adición de 25 % de colestiramina en preparaciones de LBV secado puede proporcionar una protección 4200 veces mayor contra bilis al 4 %. La composición de bilis de cerdo es más parecida a la de los humanos [8] y también se observó un alto grado de protección similar con bilis de cerdo al 1 %, 4 % y 8% lo que confirma que esta formulación optimizada puede proteger las bacterias de la vacuna secadas de concentraciones en exceso de ácidos biliares.

La inclusión de BAR en comprimidos proporciona protección contra una solución de bilis que contiene una cantidad de ácidos biliares que excede la capacidad máxima de la BAR dentro del comprimido [16]. De manera similar, en los experimentos con cápsulas, la cantidad total de colestiramina fue 75 mg (25 % de 300 mg de polvo), que puede unir un máximo de 218-292 μ moles de ácidos biliares [4]. Se añadió a 25 ml de una solución de bilis al 4% que contenía un total de 2500 μ moles de ácidos biliares, que representa un exceso de 8-11 más de ácidos biliares con respecto a la capacidad de BAR, lo que indica que, al igual que con los comprimidos, las cápsulas con contenido de BAR proporcionan una protección temporal, mientras las bacterias secas recuperan la tolerancia a la bilis, en lugar de simplemente secuestrar todos los ácidos biliares dentro de la muestra de ensayo.

Se sometió a ensayo la capacidad de una cápsula con revestimiento entérico y la BAR colestiramina para proteger de ácido y bilis la vacuna de *Salmonella* secada viva.

Se cultivaron bacterias SL3261/pAHL y se secaron de la misma manera que en los experimentos anteriores. Se mezclaron bacterias secadas en polvo con celulosa microcristalina y colestiramina en una relación de 1:75:25 células: MCC: colestiramina. Se cargó este polvo en cápsulas HPMC normales de tamaño 00, aproximadamente 300 mg por cápsula, con un soporte de bolas para sumergirlas durante la prueba de disolución. Se descubrieron las cápsulas o se sumergieron dos veces desde cada extremo en una solución 10% p/v de polímero entérico, copolímero de ácido metacrílico: acrilato de etilo (Kollicoat MAE 100 P, BASF, Mannheim Alemania) disuelto en una mezcla 3:2 v/v de metanol y diclorometano, y después se secó durante toda la noche.

Se sumergieron individualmente 5 cápsulas con revestimiento entérico durante 40 minutos en 20 ml 0,1M HCl a 37 °C para simular el ácido gástrico en el estómago; según lo esperado, el revestimiento entérico impidió la disolución o bien la penetración del ácido en la cubierta de la cápsula. A continuación, se transfirieron estas 5 cápsulas a bilis de buey al 2 % disuelto en tampón fosfato, pH 7,0. Al mismo tiempo, se añadieron individualmente 2 cápsulas revestidas y 3 cápsulas sin revestir a 20 ml de tampón fosfato, pH 7,0 (tampón); al mismo tiempo, se añadieron individualmente 2 cápsulas sin revestir a 20 ml de HCl 0,1M. A continuación, se incubaron todas las cápsulas a 37 °C durante 1 hora, después se mezclaron a fondo. Las cápsulas sin revestir se disolvieron completamente en el ácido al cabo de 1 hora. Al cabo de 1 hora más (2 horas en total de incubación), se tomaron las muestras, se diluyeron y se colocaron sobre placas agar que contenían canamicina y se incubaron después durante toda la noche. Se hizo un recuento de las colonias y se calculó la recuperación de células vivas y se expresó como unidades de formación de colona por ml; cada barra representa 1 cápsula y las barras de error indican 1 desviación típica.

Se observó que las cápsulas sin revestir liberaban un alto número de células viables al tampón, pero no se recuperó ninguna célula viva en ácido. En cambio, se recuperó un número similar de células viables en tampón y en bilis después de la inversión en ácido con las cápsulas con revestimiento entérico (véase Figura 8). Esto demuestra que la dosis sólida con revestimiento entérico que contiene la BAR colestiramina protege las células de una vacuna bacteriana de antígeno heterólogo secada contra los ácidos gástricos seguido de bilis intestinal.

Se sometió a ensayo la capacidad de las cápsulas que contienen la BAR colestiramina para proteger las bacterias de ácido láctico secadas de soluciones de bilis. Estos ensayos no son de acuerdo con la invención. Las bacterias de ácido láctico vivas fueron de fabricación comercial en forma de polvo a través de un proceso de fermentación y liofilizado. El fabricante sometió a ensayo el cultivo para *Salmonella* y otros patógenos y lo suministró como suplemento alimentario que es adecuado para el consumo humano.

Se mezcló el polvo de bacterias de ácido láctico secadas que contenía *Lactobacillus casei* con carga de celulosa microcristalina (MCC) con y sin 50 % p/p de la BAR colestiramina y después se cargó en cápsulas HPMC que contenían un soporte de bolas de 1 g para hundir las cápsulas. Entre 13 y 15 % p/p del contenido de la cápsula fue bacterias, que se corresponde con 39 – 45 mg de una cápsula de 300 mg, es decir, en el intervalo de $9,8 \times 10^9$ - 11×10^9 UFC/cápsula. Se añadieron cápsulas individuales a tubos de 50 ml que contenían 25 ml de tampón fosfato de control, pH 7,0, o las concentraciones indicadas de bilis de buey o bilis de cerdo en tampón fosfato durante 1 hora a 37 °C. Se tomaron las muestras, se diluyeron y se colocaron porciones sobre placas e cultivo con agar, se incubaron durante 72 horas a 37° C, tras lo cual, se hizo el recuento de las colonias y se calculó las unidades de formación de colonia (UFC) para indicar el número de células vivas en relación con el peso original del polvo de ácido láctico secado añadido a las cápsulas. Cada barra representa la media de 4 cápsulas sometidas a ensayo individualmente.

Cuando se dispersaron en el tampón de control, se observó que las cápsulas de control contenían células mezcladas con carga de MCC en solitario liberaban según lo esperado el alto número de células *L. casei* vivas; en cambio, las dosis crecientes de bilis proporcionaron reducciones en la recuperación de células vivas, de modo que de bilis de buey al 4 % dio más de 30 veces más eliminación. Cuando se añadió colestiramina en la cápsula mezclada con las bacterias y los polvos de carga, se observó una pérdida 3 veces menor con de bilis de buey al 4 %, dando una protección 10 veces mayor contra la dosis alta de bilis. Se observaron resultados similares con la bilis de cerdo (Figura 9). Esto demuestra que la preparación de tipo alimenticio liofilizada comercial de bacteria de ácido láctico puede protegerse de la bilis mediante el uso de la BAR colestiramina.

Los datos experimentales expuestos demuestran que las bacterias secadas sensibles a la bilis recuperan rápidamente la tolerancia a la bilis si se rehidratan antes de su exposición a la bilis y el pretratamiento de soluciones de bilis con un secuestrante de ácido biliar previene la toxicidad de la bilis para la bacteria secada. Por otra parte, se ha demostrado que la adición del secuestrante de ácido biliar sobre la parte superior de las bacterias secadas previene la toxicidad de la bilis y la adición de un secuestrante de ácido biliar al excipiente antes del secado también proporciona una significativa protección contra la toxicidad de la bilis en comparación con las bacterias secadas en un excipiente convencional. Los comprimidos de matriz y las cápsulas que contienen el secuestrante de ácido biliar también presentan una mayor liberación de bacterias viables cuando se añaden a soluciones de bilis, en comparación con los comprimidos o cápsulas de control sin secuestrante de ácido biliar.

Tras la rehidratación sin ácidos biliares, se observó que las bacterias secadas recuperaban muy rápidamente la resistencia a la bilis. Esto demuestra que se puede permitir que las bacterias se recuperen en una forma de administración oral en el intestino a través de la rehidratación con protección contra la bilis.

- 5 Las BAR se utilizan convencionalmente para secuestrar ácidos biliares y bloquear la reabsorción, pero no se había demostrado anteriormente que modularan el efecto de los ácidos biliares en el intestino.

10 Los datos expuestos también demuestran que si están presentes en combinación bacterias secas y agentes de unión a ácido biliar, se bloquea la toxicidad de los ácidos biliares, es decir, los ácidos biliares no pueden eliminar las bacterias secadas en presencia de ácidos de unión a ácido biliar. Esto demuestra que las bacterias secadas pueden protegerse *in vivo* de la toxicidad de ácidos biliares.

15 Los datos expuestos también demuestran que si se secan las bacterias en presencia de agentes de unión a bilis, se proporciona suficiente protección contra la toxicidad de la bilis incluso en una situación en la que el total de la cantidad de ácido biliar en el tubo de ensayo excede la capacidad total de los agentes de unión a bilis presentes en la formulación de bacterias secadas.

20 Por tanto, es posible incorporar los secuestrantes de ácido biliar en formulaciones de dosis para aumentar la eficacia de la administración de las bacterias vivas al intestino. Cuando se liberan en el intestino a través de un sistema de administración entérica convencional, el secuestrante de ácido bilis protegerá las bacterias vivas de los ácidos biliares dando tiempo las bacterias para rehidratarse sin la toxicidad del ácido biliares, permitiendo de este modo la recuperación de la tolerancia a la bilis y mejorando la administración de bacterias vivas al intestino. Por ejemplo, se protege una vacuna bacteriana (cepa SL3261/pAHL) que contiene un antígeno recombinante (antígeno de peste septicémica F1 en un plásmido) (de acuerdo con la invención) y una preparación secada comercial de bacteria de ácido láctico *Lactococcus casei* (no de acuerdo con la invención) de la bilis con las formulaciones descritas en el presente documento. Asimismo la presencia de un revestimiento entérico, así como un secuestrante de ácido biliar protegen las formulaciones de dosis de la exposición secuencial a ácido seguida de soluciones biliares (ingestión simulada).

30 Referencias

- [1] Bergogne-Berezin E. Int J Antimicrob Agents 2000 Dic; 16(4):521-6.
 [2] Bohm SK, Kruis W. Ann N Y Acad Sci 2006 Ago; 1072:339-50.
 [3] Huyghebaert N et al Eur J Pharm Biopharm 2005 Ago; 60(3):349-59.
 35 [4] Levine MM. Vaccine 2006 Mayo 1; 24(18):3865-73.
 [5] Prakash S et al Appl Biochem Biotechnol 2006 Ene; 128(1):1-22.
 [6] Crowe JH, et al Annu Rev Physiol 1998; 60:73-103.
 [7] Bullifent HL et al. Vaccine 2000 Dic 8; 19(9-10):1239-45.
 [8] Fraser A et al Vaccine 2007 Nov. 7; 25(45):7848-57.
 40 [9] Sack DA et al Infect Immun 1997 Jun; 65(6):2107-11.
 [10] McKenzie R et al. Vaccine 2008 Ago. 26; 26(36):4731-9.
 [11] Foster JW. Nat Rev Microbiol 2004 Nov; 2(11):898-907.
 [12] Edwards AD, Slater NK. Vaccine 2008 Ago. 30; 26 (45): 5675-8. 21 22
 [13] Garmory HS et al. Infect Immun 2005 Abril; 73(4):2005-11.
 45 [14] Honda Y, Nakano M. Chem Pharm Bull (Tokio) 2000 Jul; 48(7):978-81.
 [15] Levine MM, et al Lancet 1990 Oct 13; 336(8720): 891-4.
 [16] A.D. Edwards, N.K. Slater Vaccine 27(29) (2009) 3897-3903.
 [17] H.L. Bullifent et al Vaccine 19(9-10) (2000) 1239-1245.
 50 [18] WO2007/112747

REIVINDICACIONES

1. Una formulación sólida que comprende células bacterianas viables secadas y un agente de unión a bilis para su uso en un método de inmunoterapia que comprende la administración oral de dicha formulación a un individuo que lo necesita, en la que el agente de unión a bilis es colestiramina y las células bacterianas viables son células de vacuna bacteriana.
2. Una formulación sólida para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la que las células viables se secan aumentando el nivel intracelular de disacárido en las células y secando las células en presencia de un agente de estabilización de hidrato de carbono.
3. Una formulación sólida para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende cualquiera entre
 - (i) un núcleo que comprende gránulos de células bacterianas viables secadas y gránulos de agente de unión a bilis seco; o
 - (ii) un núcleo que comprende células bacterianas secadas viables, estando rodeado dicho núcleo de una capa que comprende el agente de unión a bilis.
4. Una formulación sólida para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células viables secadas son sensibles a lisozima.
5. Una formulación sólida para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además una resina de intercambio de cationes.
6. Una formulación sólida para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células viables secadas comprenden ácido nucleico heterólogo.
7. Una formulación sólida para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el ácido nucleico heterólogo codifica un antígeno exógeno.
8. Una formulación sólida para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células viables secadas de la vacuna bacteriana y el agente de unión a bilis están encapsulados en una cubierta polimérica.
9. Una formulación sólida para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la cubierta polimérica comprende hidroxipropil metil celulosa.
10. Una formulación sólida para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que está recubierta de un revestimiento entérico.
11. Una formulación sólida para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la formulación comprende: un núcleo que comprende células bacterianas viables secadas y un agente de unión a bilis, opcionalmente en la que el núcleo está encapsulado en una cubierta polimérica, y un revestimiento entérico que rodea el núcleo y la cubierta polimérica opcional.
12. Un método para producir una formulación sólida para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende: secado de células bacterianas viables, y mezclado de las células viables secadas con un agente de unión a bilis y, opcionalmente, un excipiente farmacéuticamente aceptable para producir una formulación sólida; o mezclado de células bacterianas viables con un agente de unión a bilis y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable para producir una mezcla y un secado de la mezcla para producir una formulación sólida; en donde el agente de unión a bilis es colestiramina y las células bacterianas viables son células de vacuna bacteriana.

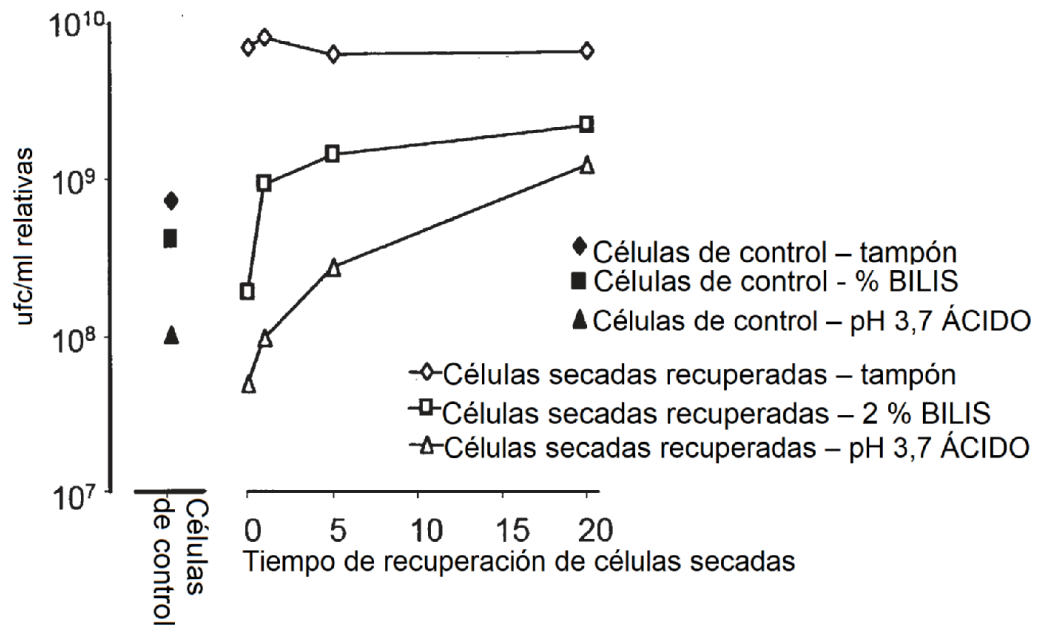


Figura 1

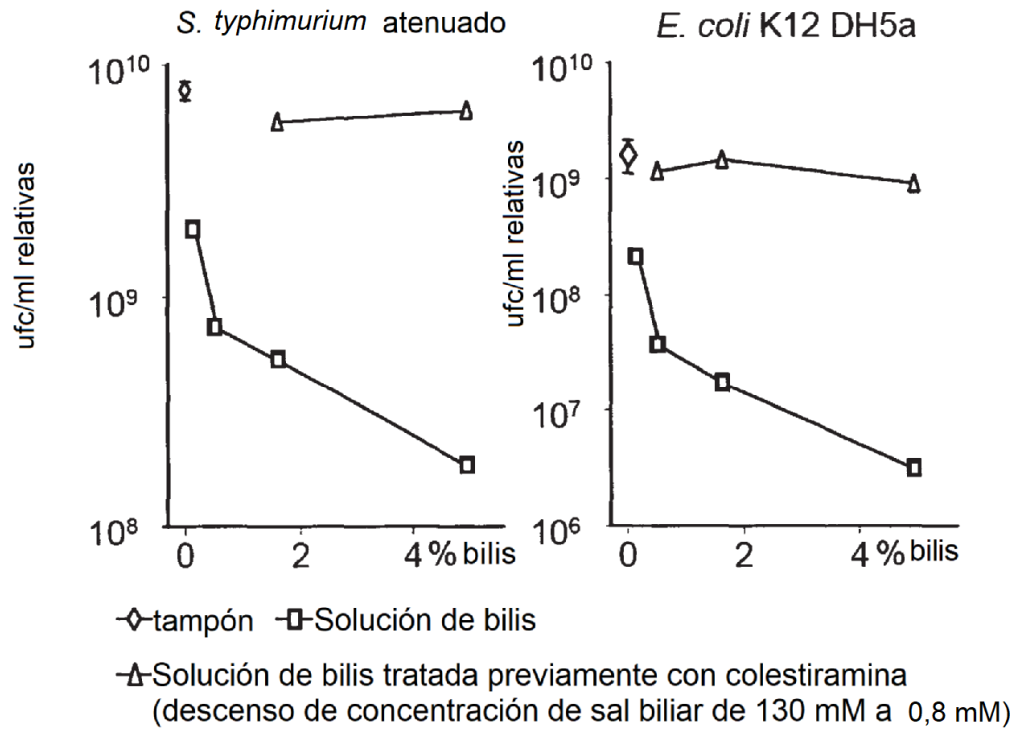


Figura 2

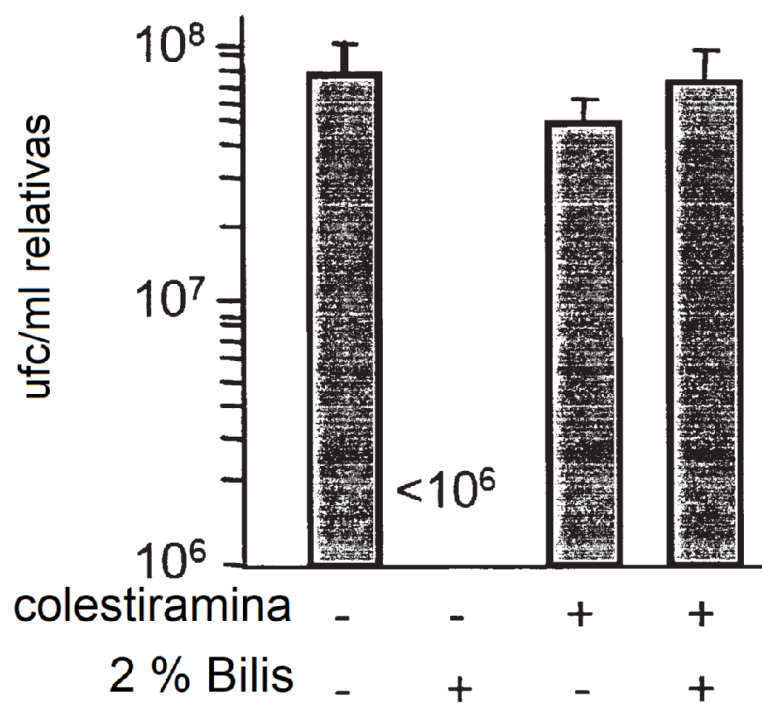


Figura 3

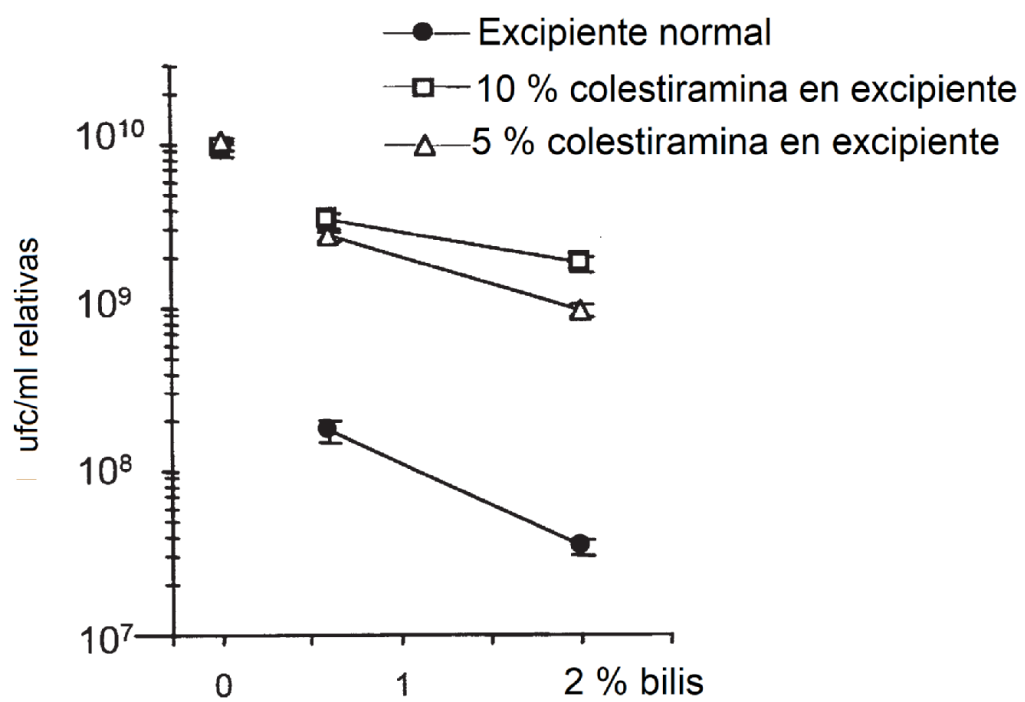


Figura 4

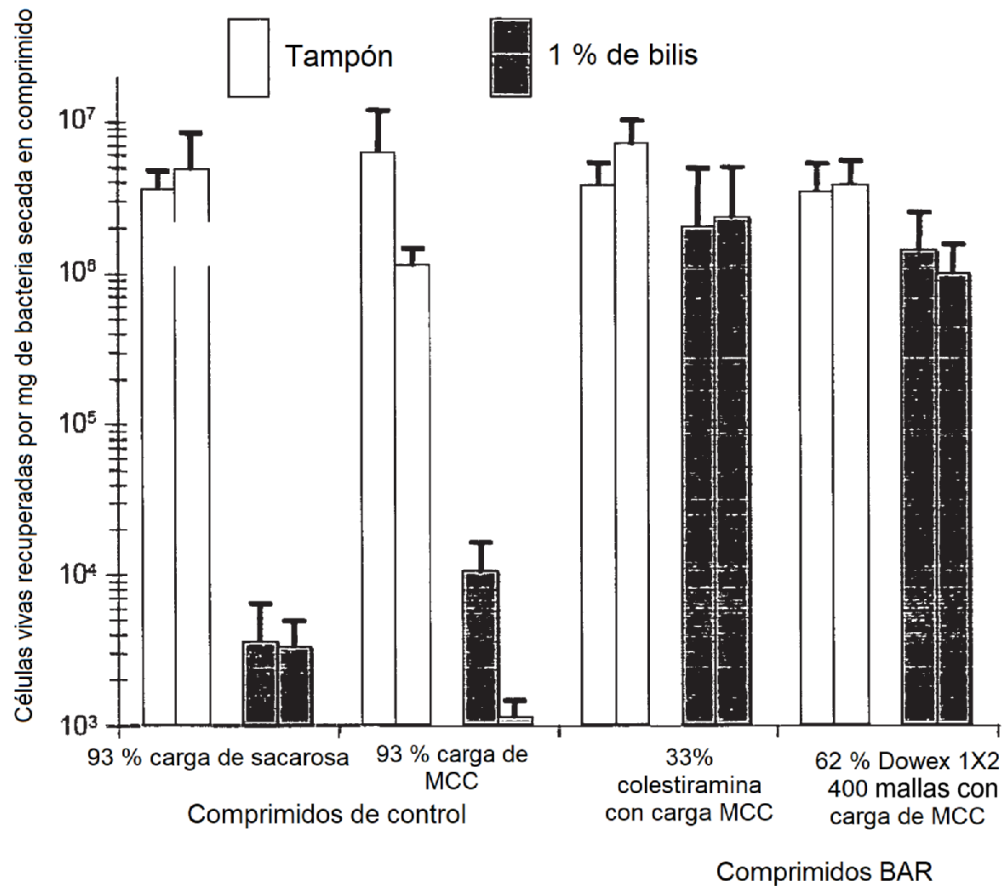


Figura 5

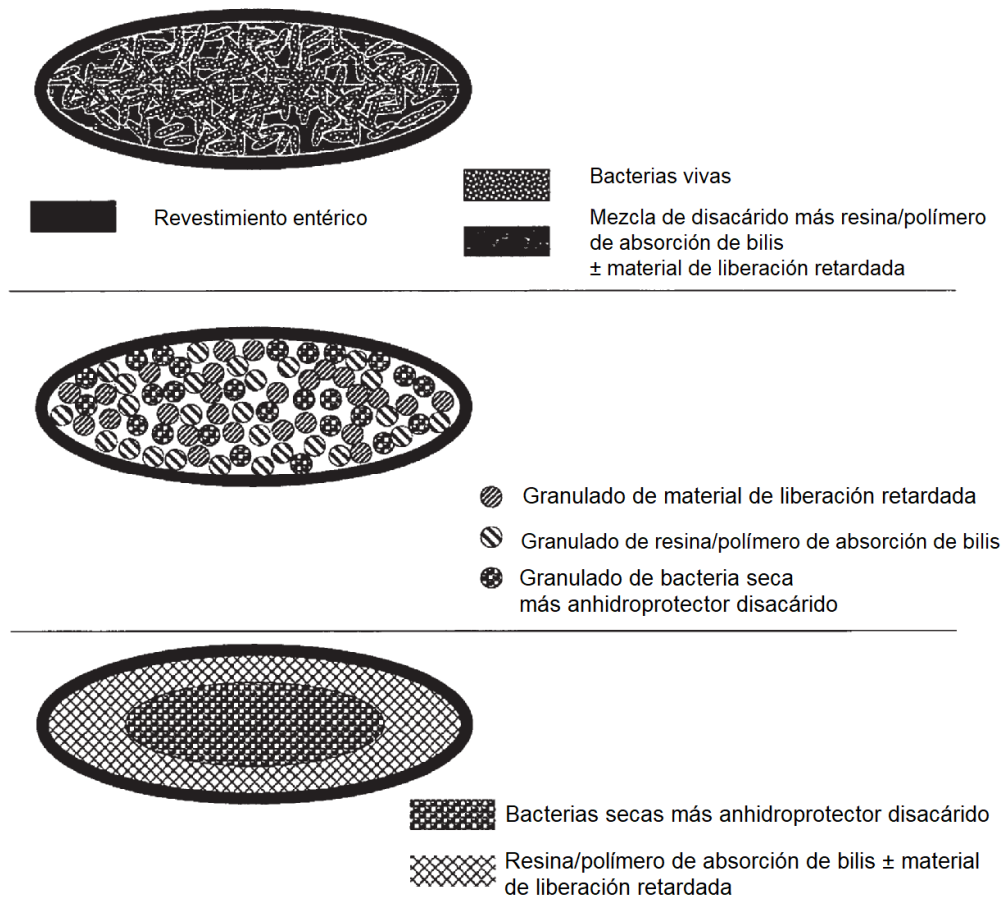


Figura 6

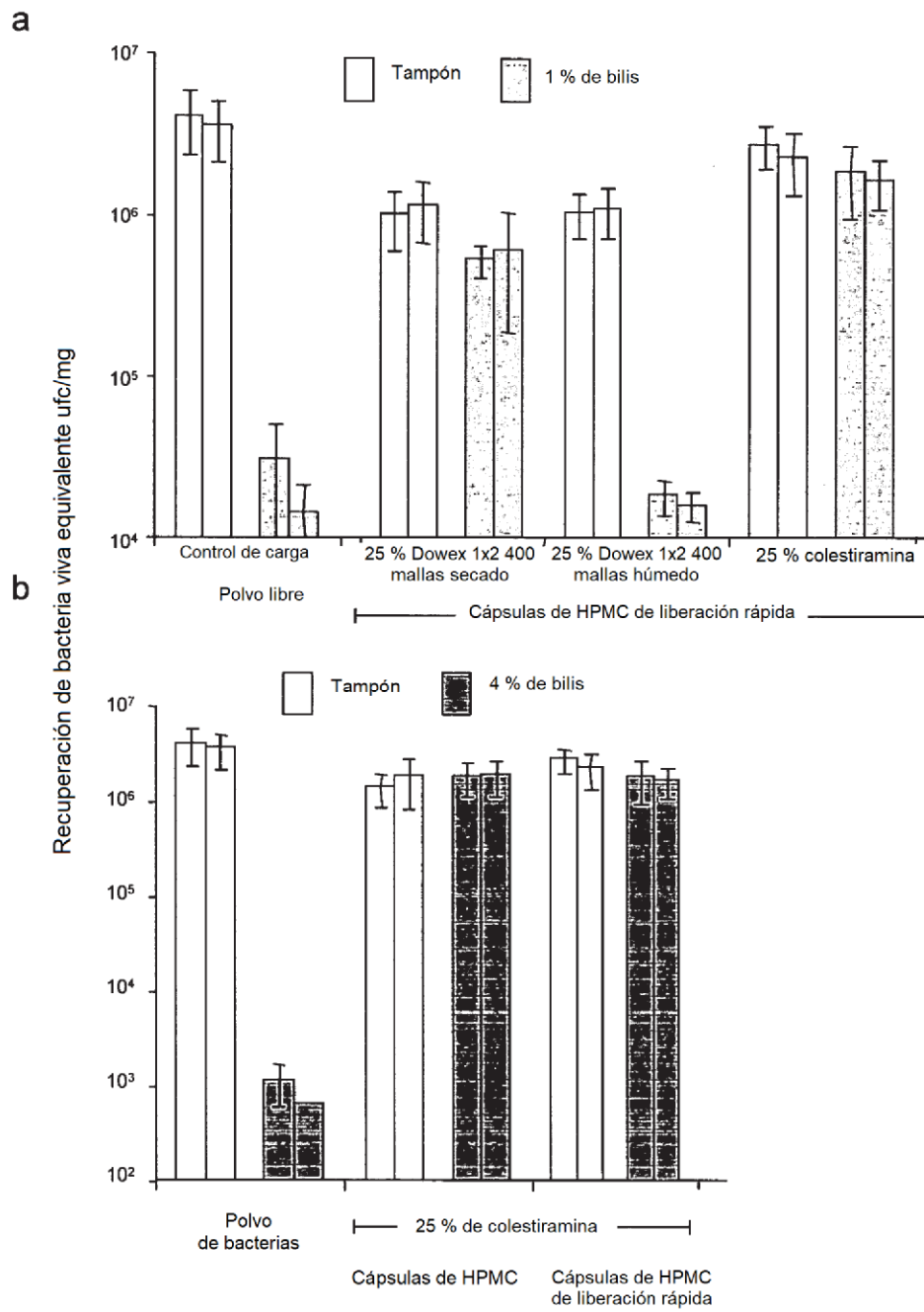


Figura 7

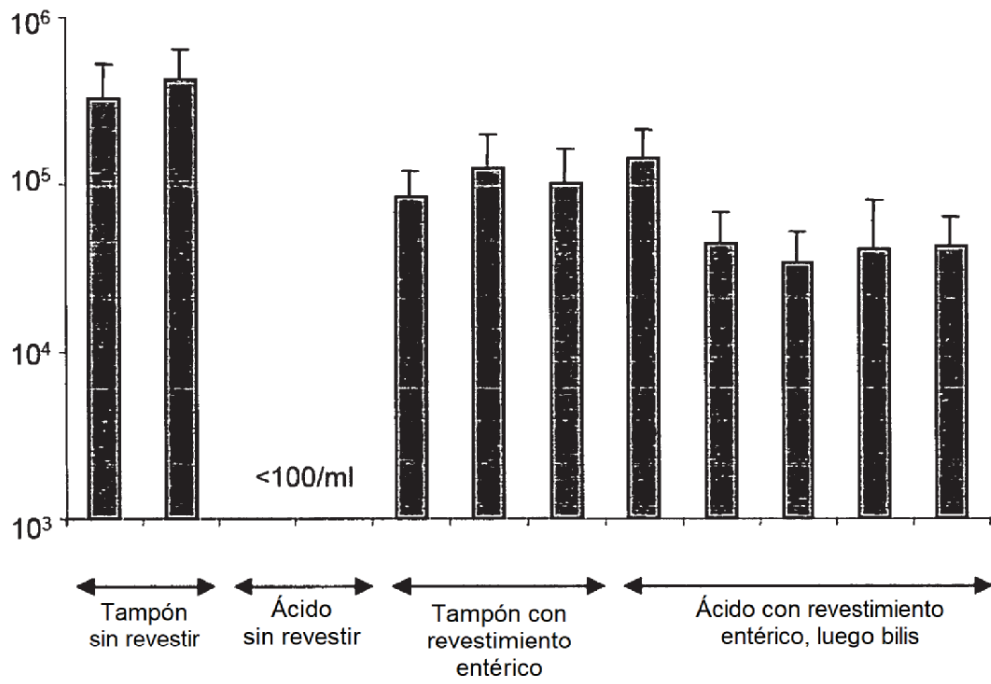


Figura 8

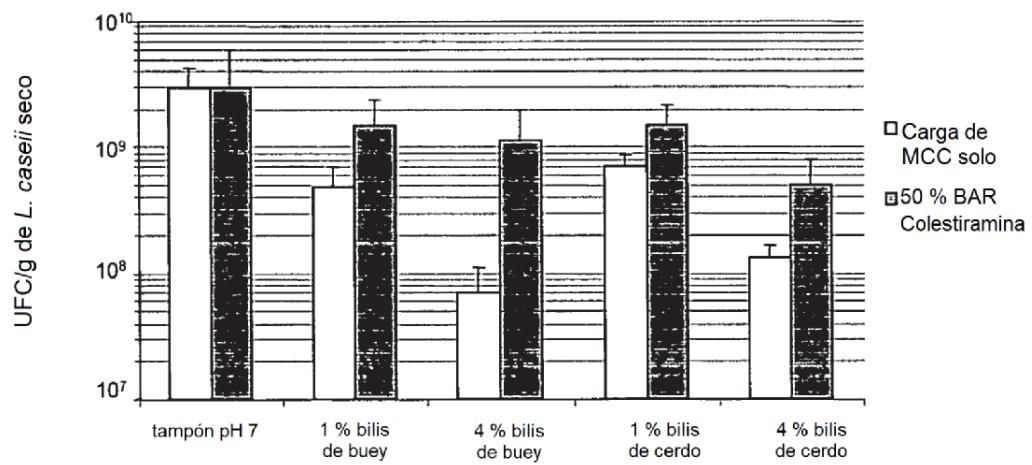


Figura 9