

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 854**

51 Int. Cl.:

A61K 35/38 (2015.01)
A61K 35/741 (2015.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2016** **PCT/FR2016/050958**
87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016** **WO16170285**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2016** **E 16723433 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020** **EP 3285784**

54 Título: **Procedimiento de preparación de una muestra de microbiota fecal**

30 Prioridad:

24.04.2015 FR 1553716

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2021

73 Titular/es:

MAAT PHARMA (50.0%)
317 Avenue Jean Jaurès
69007 Lyon, FR y
INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR
L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET
L'ENVIRONNEMENT (50.0%)

72 Inventor/es:

AFFAGARD, HERVÉ;
SCHWINTNER, CAROLE;
JUSTE, CATHERINE;
DORE, JOËL;
LEPAGE, PATRICIA;
MAILLET, CHRISTEL;
RABOT, SYLVIE;
FONSECA, FERNANDA y
BLOTTIERE, HERVÉ

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 812 854 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

Procedimiento de preparación de una muestra de microbiota fecal

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de una muestra de microbiota fecal. La invención también se refiere al uso de dicha muestra en el trasplante de microbiota fecal, preferentemente para tratar las disbiosis intestinales, especialmente las infecciones por *Clostridium difficile*.

10 La microbiota intestinal humana es el conjunto de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) que se encuentran en el sistema gastrointestinal humano (estómago, intestino y colon). La diversidad microbiana se estima actualmente en aproximadamente de 10^3 especies bacterianas que componen la microbiota intestinal dominante de un individuo adulto, con una abundancia de 10^{14} bacterias, lo que representa un metagenoma bacteriano de 200.000 a 800.000 genes en cada individuo, es decir, de 10 a 50 veces el número de genes del genoma humano.

15 Estéril mientras se encuentra dentro del útero, el intestino se coloniza desde los primeros días de vida hasta evolucionar hacia una microbiota individual única. Cada persona tiene bacterias relativamente cercanas en términos de especies, pero la composición exacta de su microbiota (especies, proporciones) es, en gran medida (más de $\frac{2}{3}$ especies) específicas del hospedador. De este modo, la microbiota intestinal humana es un ecosistema muy diverso, complejo y específico de cada individuo.

20 Para la salud de un individuo, es fundamental mantener una microbiota estable que pueda al mismo tiempo volver su estado original después de un cambio y ser resistente a la invasión. Mantener una gran diversidad de la microbiota fomenta su estabilidad. Sin embargo, ciertas patologías o tratamientos desequilibran la microbiota: los antibióticos por ejemplo, así como enfermedades de componente inflamatorio, tales como las enfermedades inflamatorias crónicas del intestino (EII), pueden limitar la diversidad de la microbiota en el intestino. Los tratamientos con antibióticos (o antibioterapia), especialmente, dan como resultado alteraciones en la microbiota, lo que puede fomentar la proliferación de organismos patógenos como *Clostridium difficile*.

30 Las infecciones por *Clostridium difficile* son responsables de la diarrea hospitalaria; esta bacteria es resistente a la antibioterapia convencional (de amplio espectro, tales como vancomicina o metronidazol). Para restaurar la microbiota intestinal y combatir las infecciones del tipo *Clostridium difficile*, y restaurar así la homeostasia (es decir, la simbiosis), se ha considerado y autorizado el trasplante de microbiota fecal. Consiste en la introducción de las heces de un sujeto donante sano en el tracto digestivo de un paciente receptor, para reequilibrar la microbiota intestinal alterada del hospedador. Este trasplante de microbiota fecal puede ser alogénico (es decir, de un donante sano a un paciente) o autólogo (es decir, de un individuo a sí mismo). Los resultados obtenidos en las infecciones de tipo *Clostridium difficile* son alentadores y algunos pacientes se han tratado con éxito (Tauxe et al, Lab Medicine, Invierno 2015, volumen 46, Número 1).

40 Sin embargo, el método actual de trasplante es empírico y no toma precauciones particulares para preservar mejor la viabilidad de las bacterias anaerobias, componentes principales de la microbiota intestinal. Además, la eficacia del trasplante de microbiota fecal es variable y puede requerir más de un tratamiento. Por otro lado, el trasplante alogénico requiere analizar las heces del donante para garantizar que no se trasplante ningún germen patógeno al receptor, si suponga un riesgo para el personal que lo manipula durante la intervención.

45 Por lo tanto, existe la necesidad de disponer de un procedimiento para el trasplante de microbiota fecal que sea seguro, eficaz y fácil de realizar, especialmente a escala industrial. Además, existe la necesidad de un procedimiento de trasplante de microbiota fecal en el que se conserve la viabilidad de las bacterias.

50 La presente invención posibilita satisfacer estas necesidades.

Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante, que comprende las siguientes etapas:

- a) la toma de al menos una muestra de microbiota fecal del sujeto donante,
- 55 b) en un plazo inferior a 5 minutos después de la toma de muestra, introducir dicha muestra obtenida en a) en un dispositivo de recogida hermético al oxígeno,
- c) mezclar la muestra obtenida en b) con al menos una solución acuosa salina que comprende al menos un crioprotector y un agente de carga,
- d) opcionalmente, filtración de la mezcla obtenida en c), en particular con un filtro que comprende poros de diámetro inferior o igual a 0,7 mm, preferentemente, inferior o igual a 0,5 mm, y
- 60 e) almacenar la mezcla obtenida en c) o d) mediante congelación a una temperatura comprendida entre -15 °C y -100 °C, preferentemente entre -60 °C y -90 °C,

realizándose las etapas b) a e) anaeróbicamente.

65 Dicho procedimiento de trasplante de microbiota fecal es de hecho fácil de implementar, y su eficacia se puede estimar

comparando la población microbiana obtenida después del procedimiento, en comparación con la muestra inicial. Se pueden utilizar diferentes índices para evaluar esta eficacia, y se pueden obtener los siguientes resultados:

Índices	Disimilitud de Bray-Curtis	Distancia de Canberra	Índice de Jaccard	Divergencia de Jensen-Shannon	Índice de Morisita	Coefficiente de correlación de Pearson
Familia	<0,4	<0,7	<0,6	<0,4	<0,5	>0,7
Género	<0,5	<0,7	<0,7	<0,4	<0,6	>0,5
OTU	<0,7	<0,9	<0,8	<0,4	<0,7	>0,3

- 5 La presente invención también se refiere al uso de una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante que puede obtenerse según el método de acuerdo con la invención, en estado descongelado, en el trasplante de microbiota fecal autólogo o alogénico.

10 La presente invención también se refiere al uso de una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante que puede obtenerse según el método de acuerdo con la invención, en estado descongelado, para tratar las disbiosis intestinales, incluidas las infecciones por *Clostridium difficile*, las disbiosis inducidas por tratamientos farmacológicos, por tratamientos físicos (especialmente radiación), por intervenciones quirúrgicas (especialmente intestinales), o por aportes nutricionales. La presente invención también se refiere al uso de una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante que puede obtenerse según el método de acuerdo con la invención, en estado descongelado, para tratar una

15 patología seleccionada entre las enfermedades inflamatorias crónicas del intestino (MICI), trastornos intestinales funcionales, obesidad, enfermedades metabólicas (diabetes tipo 2, especialmente síndrome metabólico) y enfermedades autoinmunitarias (diabetes tipo 1, especialmente), alergias, enfermedades hepáticas (esteatosis, especialmente cirrosis), ciertas enfermedades neurológicas (especialmente autismo) y ciertos tipos de cáncer (especialmente cáncer colorrectal).

20 Por disbiosis intestinal, se entiende cualquier desequilibrio continuado de la microbiota intestinal. Por desequilibrio continuado de la microbiota intestinal, se entiende cualquier pérdida de microorganismos beneficiosos, y/o cualquier pérdida de diversidad de microorganismos, y/o cualquier expansión o desarrollo de microorganismos agresivos entre comensales (patobiontes), y/o cualquier proliferación de microorganismos patógenos (especialmente *C. difficile*). Cualquier alteración continuada de la microbiota intestinal humana puede producir un estado patológico.

25 Especialmente, la reducción de la diversidad dentro de la microbiota es característica de las enfermedades asociadas a disbiosis (obesidad, enfermedad de Crohn, especialmente diabetes o alergia) (Sansonetti, Collège de France, 22 de enero de 2014).

Preferentemente, la patología a tratar es una disbiosis intestinal.

30 Por enfermedades inflamatorias crónicas del intestino (EII), se entiende especialmente la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa.

Por trastornos intestinales funcionales, se entiende especialmente el síndrome del intestino irritable, colitis espasmódica.

35 El procedimiento de preparación de una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante de acuerdo con la invención comprende, por lo tanto, una etapa a) de obtención de al menos una muestra de microbiota fecal del sujeto donante. Esta etapa se realiza preferentemente tomando una muestra de heces del sujeto donante. En efecto, la muestra de heces contiene microbiota fecal del sujeto donante. De este modo, el procedimiento según la invención comprende una etapa a) de obtención de al menos una muestra de heces, que comprende la microbiota fecal, del sujeto donante. Preferentemente, según la invención, el sujeto donante es un sujeto humano sano. Por sujeto "sano", se entiende un

40 sujeto no afectado por un desequilibrio de la microbiota intestinal o una patología diagnosticada/reconocida por la profesión médica.

Preferentemente, la muestra de heces tiene una masa de al menos 20 g.

45 Después de esta etapa de toma de muestra, y muy poco tiempo después, es decir, menos de 5 minutos después de la toma de muestra, preferentemente menos de 3 minutos, más preferentemente menos de 1 minuto, la muestra obtenida en a) se introduce en un dispositivo de recogida hermético al oxígeno: este es la etapa b).

El resto del procedimiento se realiza a partir de este momento anaeróbicamente (es decir, en una atmósfera anaerobia).

50 Preferentemente, el dispositivo hermético de recogida tiene la forma de un tipo que comprende:

- un recipiente que comprende un cuerpo que tiene un espacio interior adaptado para recibir la muestra de microbiota fecal del sujeto donante, y un cuello que delimita una abertura de acceso al espacio interior del cuerpo, y
 - una tapa adaptada para montarse de manera desmontable y estanca sobre el cuello del recipiente para cerrar la
- 55 abertura de acceso al cuello y cerrar el espacio interior del cuerpo,

en el que el cuerpo del recipiente consiste en una bolsa flexible, y en el que al menos uno entre el recipiente y la tapa está provisto de un elemento de extracción de gases adaptado para extraer al menos parte de los gases contenidos en el espacio interior del cuerpo del recipiente.

60 Preferentemente, el elemento de extracción de gases del dispositivo comprende un paso formado a través de uno de

entre el recipiente y la tapa, y un elemento para cerrar el etapa para evitar que la entrada de fluidos externos en el espacio interior del cuerpo del recipiente. Preferentemente, el elemento de extracción de gases del dispositivo comprende además una membrana de filtración microporosa dispuesta en el paso.

De forma alternativa, el dispositivo hermético de recogida tiene la forma de un tipo que comprende:

- un recipiente que comprende un cuerpo que tiene un espacio interior adaptado para recibir la muestra de microbiota fecal del sujeto donante, y un cuello que delimita una abertura de acceso al espacio interior del cuerpo, y
- una tapa adaptada para montarse de manera desmontable y estanca sobre el cuello del recipiente para cerrar la abertura de acceso al cuello y cerrar el espacio interior del cuerpo,

en el que el espacio interior del cuerpo del recipiente incluye opcionalmente un dispositivo químico neutralizador de oxígeno.

Preferentemente, el dispositivo de recogida hermético se usa en las etapas a) y b): la toma de muestra de la etapa a) se realiza directamente en dicho dispositivo, especialmente en el recipiente, y el cierre del dispositivo, especialmente debido a la tapa, pone la muestra en una atmósfera exenta de oxígeno (etapa b).

Según el procedimiento de la invención, las etapas b) a e) se llevan a cabo en una atmósfera exenta de oxígeno. En condiciones anaerobias, se preserva por lo tanto la viabilidad de las bacterias que constituyen la microbiota fecal y están presentes en la muestra.

En particular, el dispositivo utilizado en la etapa b), anteriormente mencionado, posibilita que todas las etapas b) a e) se realicen anaeróbicamente.

Una vez que la muestra (obtenida en a) se introduce en un dispositivo de recogida hermético al oxígeno, se puede, de manera opcional, incubar a una temperatura comprendida entre 33 °C y 40 °C durante un máximo de 75 h. Preferentemente, esta etapa de incubación se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 35 °C y 38 °C, durante un periodo comprendido entre 24 h y 73 h. Idealmente, esta etapa se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 37 °C durante 72 h. Alternativamente, la muestra se puede, de manera opcional, incubar a una temperatura comprendida entre 2 °C y 10 °C durante un máximo de 75 h. Preferentemente, esta etapa de incubación se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 4 °C y 8 °C, durante un periodo comprendido entre 24 h y 72 h. Al finalizar esta etapa, se puede realizar una comprobación visual, para evaluar la calidad de la muestra obtenida en esta etapa del procedimiento. Si esta comprobación es correcta, de manera opcional, puede tener lugar, por lo tanto, una etapa de transporte. Esta etapa de transporte permite que la muestra se traiga desde el lugar de recogida al laboratorio, para su posterior procesamiento y análisis. La comprobación visual anteriormente mencionada también se puede realizar después del transporte.

De este modo, preferentemente, la muestra introducida en el dispositivo de recogida de la etapa b) se somete a un etapa de transporte antes de la etapa c).

Preferentemente también, la muestra introducida en el dispositivo de recogida de la etapa b) se incuba a una temperatura comprendida entre 33 °C y 40 °C, preferentemente entre 35 °C y 38 °C, durante un plazo máximo de 75 h, preferentemente entre 24 h y 73 h, entre las etapas b) y c). Preferentemente, la incubación se produce antes y durante la etapa de transporte.

Después se aplica la etapa c): esta etapa comprende mezclar la muestra obtenida en b) con al menos una solución acuosa salina que comprende al menos un crioprotector y un agente de carga.

Si se produce una etapa de transporte y, opcionalmente, una etapa de incubación, entonces la etapa c) evidentemente comprende mezclar la muestra obtenida en b), después del transporte y/o incubación, con al menos una solución acuosa salina que comprende al menos un crioprotector y un agente de carga.

Normalmente, la solución acuosa salina según la invención comprende agua y sales fisiológicamente aceptables. Normalmente, las sales son sales de calcio, sodio, potasio o magnesio, con iones de cloruro, gluconato, acetato o hidrogenocarbonato.

La solución acuosa salina según la invención también puede comprender opcionalmente al menos un antioxidante. El antioxidante se selecciona especialmente entre ácido ascórbico y sus sales (ascorbato), tocoferoles (en particular α -tocoferol), cisteína y sus formas salificadas (especialmente clorhidrato) y sus mezclas.

Preferentemente, la solución acuosa salina según la invención comprende:

- al menos una sal seleccionada entre cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, gluconato de sodio y acetato de sodio, y
- opcionalmente al menos un antioxidante, preferentemente seleccionado entre L-ascorbato de sodio, tocoferoles, clorhidrato de L-cisteína monohidrato y sus mezclas. Normalmente, la sal está presente en la solución acuosa salina en una concentración comprendida entre 5 y 20 g/l, preferentemente entre 7 y 10 g/l.

Normalmente, el antioxidante está presente en la solución acuosa salina en una cantidad comprendida entre 0,3 y 1 % en peso con respecto al volumen total de solución, preferentemente en una cantidad comprendida entre 0,4 y 0,6 %

en peso con respecto al volumen total de solución. Preferentemente, cuando el antioxidante es una mezcla de L-ascorbato de sodio y monohidrato de hidrocloreto de L-cisteína, el L-ascorbato de sodio está presente en una cantidad comprendida entre 0,4 y 0,6% en peso con respecto al volumen total de solución, y el monohidrato de hidrocloreto de L-cisteína está presente en una cantidad comprendida entre 0,01 y 0,1% en peso con respecto al volumen de solución total.

La solución acuosa salina según la invención también comprende al menos un crioprotector. Un crioprotector es una sustancia utilizada para proteger la muestra del daño causado por la congelación, especialmente debido a la formación de cristales de hielo.

El crioprotector se selecciona entre trehalosa y galactosa-lactosa y sus mezclas. Más preferentemente, el crioprotector es galactosa-lactosa o trehalosa.

La solución acuosa salina según la invención comprende al menos un agente de carga.

El agente de carga se selecciona preferentemente de hidrolizados parciales de almidón o de fécula. Los hidrolizados parciales de almidón, especialmente de trigo o maíz, así como los hidrolizados parciales de almidón, por ejemplo, de patata, incluyen una gran cantidad de maltodextrinas. Las maltodextrinas son el resultado de la hidrólisis parcial del almidón y están formadas por diferentes azúcares (glucosa, maltosa, maltotriosa, oligosacáridos y polisacáridos), cuyas proporciones varían según el grado de hidrólisis.

Preferentemente, el agente de carga presente en la solución acuosa salina es una mezcla de maltodextrinas, en el que la cantidad de maltodextrinas está comprendida entre 4 y 20 % en peso con respecto al volumen total de solución.

La solución acuosa salina según la invención comprende al mismo tiempo:

- al menos un crioprotector como se describe anteriormente, es decir, seleccionado entre trehalosa, galactosa-lactosa y sus mezclas, y
- al menos un agente de carga como se describe anteriormente, es decir, seleccionado entre hidrolizados parciales de almidón, preferentemente, el agente de carga consiste en maltodextrinas.

Preferentemente, en este caso, la cantidad de crioprotector está comprendida entre 3 y 30 % en peso con respecto al volumen total de solución, preferentemente entre 4 % y 20 % en peso con respecto al volumen total de solución; y la cantidad de agente de carga, preferentemente maltodextrinas, está comprendida entre 4 y 20 % en peso con respecto al volumen total de solución. La etapa c) de mezclar la muestra obtenida en b) con al menos una solución acuosa salina que comprende al menos un crioprotector puede llevarse a cabo especialmente mediante amasado, para obtener una mezcla homogénea.

Preferentemente, la muestra obtenida en b) se mezcla con dicha solución acuosa salina en una relación peso/volumen respectiva comprendido entre 0,5 pesos: 10 volúmenes y 2 pesos: 2 volúmenes. Una relación peso/volumen de muestra:solución igual a 0,5 pesos: 10 volúmenes significa que la muestra se mezcla a 0,5 pesos (por ejemplo, 0,5 g) por 10 volúmenes de solución (por ejemplo, 10 ml). Preferentemente, La relación peso/volumen de muestra:solución es igual a 1 peso de muestra por 4 volúmenes de solución (1 peso: 4 volúmenes).

Una vez que se completa esta etapa, se puede realizar un etapa opcional d). La etapa d) comprende la filtración de la mezcla obtenida en c), en particular con un filtro que comprende poros de diámetro inferior o igual a 0,7 mm, preferentemente menor o igual a 0,5 mm. Dicha filtración permite la retención de partículas gruesas y la recuperación de bacterias de interés (constitutivas de la microbiota fecal) en el filtrado.

Después, tras la etapa c) o d), cuando se realiza esta última, la mezcla obtenida se almacena por congelación a una temperatura comprendida entre -15 °C y -100 °C: se trata de la etapa e). Preferentemente, la temperatura de congelación (y por lo tanto de almacenamiento) está comprendida entre -60 °C y -90 °C; más preferentemente es de aproximadamente -80 °C o de aproximadamente -65 °C.

Para poderse congelar, después de la etapa c) o d), y antes de la etapa e), la mezcla se puede distribuir en alícuotas previamente, para garantizar muestras de volumen constante. Por ejemplo, la distribución en alícuotas se realiza para obtener muestras de volumen igual a 50 ml, 100 ml, 150 ml o 200 ml. Preferentemente, la distribución en alícuotas se realiza para obtener muestras de volumen igual a 100 ml.

Esta etapa de congelación y almacenamiento permite conservar las muestras tratadas durante un período de al menos 2 meses. Las muestras así almacenadas también presentan buena calidad, incluso después de descongelar.

Preferentemente, el procedimiento según la invención comprende una etapa f) de descongelación de la muestra congelada obtenida en e), en condiciones anaerobias, hasta temperatura ambiente. Esta etapa de descongelación f) puede llevarse a cabo introduciendo la muestra congelada en un baño de agua a una temperatura comprendida entre 35 °C y 40 °C, por ejemplo 37 °C, durante un período de varios minutos (generalmente de 2 a 10 minutos). La etapa de descongelación f) también puede llevarse a cabo introduciendo la muestra congelada en un baño de agua a una temperatura comprendida entre 2 °C y 10 °C, por ejemplo entre 4 °C y 8 °C, durante un período de 10 a 20 horas.

La muestra así descongelada, a temperatura ambiente, se puede administrar posteriormente al paciente receptor.

El paciente receptor puede ser diferente del donante, y el trasplante es alogénico en ese caso.

El paciente receptor también puede ser idéntico al sujeto donante, y el trasplante es autólogo en ese caso; este tipo de trasplante puede suceder cuando el sujeto, sano en su momento, proporciona una muestra antes de que se altere su microbiota. La muestra se congela en ese momento según las etapas descritas en la presente solicitud, después, se trasplanta al mismo sujeto (paciente receptor) si este último tiene especialmente una infección por *Clostridium difficile*. El trasplante de microbiota fecal autóloga tiene la ventaja de evitar la transmisión de patógenos de otro donante.

La presente invención también se refiere a una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante que puede obtenerse según el procedimiento de acuerdo con la invención, para su uso en el trasplante de microbiota fecal autóloga o alogénica.

La presente invención también se refiere a una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante que puede obtenerse según el procedimiento de acuerdo con la invención, para su uso en el tratamiento de infecciones por *Clostridium difficile*. La presente invención también se refiere a una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante que puede obtenerse según el procedimiento de acuerdo con la invención, para su uso para tratar una patología seleccionada entre las enfermedades inflamatorias crónicas del intestino (MICI), trastornos intestinales funcionales, obesidad, enfermedades metabólicas y enfermedades autoinmunitarias, alergias, enfermedades neurológicas y cánceres.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos, que no son limitativos.

Las leyendas de las figuras son las siguientes:

Figura 1: correlación de Pearson para perfiles filotranscriptómicos

- SB. Control de muestra fecal cruda (sin acondicionar)
- NaCl. Solución salina
- MDX. Solución salina con maltodextrinas 15 % (p/v) + trehalosa 5 % (p/v)
- TR. Solución salina con trehalosa 15 % (p/v) + maltodextrinas 5 % (p/v)
- AE (rojo). Aeróbico (exposición al aire)
- AN (azul). Anaeróbico (no expuesto al aire + antioxidantes)

Figura 2: resultados de los análisis metabolómicos

DM1 = MDX15

DM2 = TR15

Figura 3: correlaciones de Spearman de géneros bacterianos para los diferentes diluyentes probados después de una semana de almacenamiento, en comparación con el testigo "heces frescas"

DM1 = MDX15

DM2 = TR15

Figura 4: cinética de colonización de las poblaciones *Bacteroides* y *Faecalibacterium* en heces de ratón

Ejemplo 1: Preparación de una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante de acuerdo con la invención

Materiales y métodos:

Toma de muestras

Durante tres días consecutivos, se pidió a 3 participantes (uno por día) que proporcionaran una muestra fresca de heces, recogida por la mañana y puesta en condiciones anaerobias por adición de un catalizador tipo Anaerocult® IS (ref 116819 de Merck-Millipore) (etapa a) del procedimiento). Se realizaron la evaluación visual y la calificación de las heces según la tabla de Bristol. En las 2 horas posteriores a la recogida, las heces se homogenizaron durante 5 minutos en una atmósfera anaerobia, por mezcla manual en la bolsa de recogida (etapa b) del procedimiento). Alícuotas pequeñas (150-200 mg) de materia fecal cruda (SB, para heces crudas) se conservaron para realizar el perfil de ADN_r 16S y ARN 16S en heces crudas. Una alícuota (1 g) se diluyó en caldo cerebro-corazón enriquecido frío, centrifugado a 220.000xg, a 4 °C durante 1 h, y el sobrenadante se fraccionó en alícuotas de 1 ml para el perfil metabolómico de agua fecal cruda. Las de ADN, ARN y el perfil metabolómico se almacenaron a -80 °C. Una tercera alícuota (0,4 g) se diluyó en 1,6 ml de caldo de cultivo y se utilizó para inocular 3 tubos de cultivo Kimax (0,5 ml de inóculo por 9,5 ml de caldo, enriquecido de forma extemporánea con L-ascorbato de sodio y monohidrato de hidrócloruro de L-cisteína a una concentración final de 0,5% [p/v] y 0,05% [p/v], respectivamente) para el ensayo de actividad de referencia.

A continuación se transfieren ocho fracciones de heces a bolsas filtrantes Stomacher: 4 bolsas para acondicionamiento en los cuatro diluyentes en condiciones anaerobias, y cuatro bolsas para acondicionamiento en los mismos cuatro diluyentes en condiciones aerobias.

Acondicionamiento

Dos equipos llevan a cabo las etapas de acondicionamiento en paralelo para garantizar que todas las muestras se tratan de manera idéntica.

- 5 Las 4 fracciones bajo cada condición de atmósfera se resuspenden en 4 volúmenes de las siguientes soluciones acuosas (etapa c) del procedimiento):

- 9 g/l de solución salina (identificada como "NaCl"),
- DMSO al 6,25 % (v/v) en una solución salina de 9 g/l (identificada como "DMSO"),
- 10 - MDX (maltodextrinas) al 15 % (p/v) + TR (trehalosa) al 5 % (p/v) en una solución salina de 9 g/l (identificada como "MDX15"), y
- MDX al 5 % + TR al 15 % en una solución salina de 9 g/l (identificada como "TR15").

- 15 Las preparaciones MDX15 y TR15 realizadas bajo atmósfera anaerobia también se complementan con los dos agentes reductores, L-ascorbato de sodio y monohidrato de hidrócloruro de L-cisteína, a una concentración final de 0,5 % (p/v) y 0,1 % (p/v), respectivamente.

- 20 La resuspensión se garantiza con una mezcla manual durante 5 minutos a través de la bolsa. Esta mezcla garantiza la filtración al mismo tiempo, a través de una gasa (agujeros de 0,5 mm) presente en la bolsa (etapa d) del procedimiento). Después, 20 ml de cada filtrado se transfirieron con una pipeta a dos bolsas de congelación CryoMACS® Freezing Bags 50 (Ref Miltenyi Biotec SAS 200-074-400), dando un total de 16 CryoMACS® de cada donante (2 x NaCl-An, 2 X DMSO-An, 2 X MDX15-An, 2 X TR15-An, 2 x NaCl-Ae, 2 X DMSO-Ae, 2 X MDX15-Ae, 2 X TR15-Ae), que se almacenaron a -80 ° C (etapa e) del procedimiento).

- 25 Alícuotas de cada filtrado también se conservaron para determinación de ADNr 16S, ARNr 16S, perfiles metabolómicos y cultivos bacterianos. Para el ADNr 16S, ARN 16S y metabolómica, se centrifugaron 6 alícuotas de 1 ml de cada suspensión a 5000 xg, 4 °C durante 30 minutos; los sobrenadantes agrupados también se sometieron adicionalmente a ultracentrifugación (220.000 xg, 4 °C, 1 h) para metabolómica, mientras que el sedimento húmedo de X 5000 g se conserva para realizar el perfilado de ADNr 16S y ARN 16S. Se utilizaron tres alícuotas de 0,5 ml de cada filtrado para inocular 3 tubos de cultivo Kimax de caldo de cultivo, como se ha descrito anteriormente para las
- 30 heces crudas. Todo el proceso se repite 3 veces durante 3 días consecutivos para administrar 3 heces diferentes de tres donantes diferentes.

Reacondicionamiento

- 35 Para garantizar el mismo tiempo de almacenamiento para las muestras de los 3 donantes, las bolsas CryoMACS se descongelaron durante 3 días consecutivos a razón de una bolsa por persona y día. La descongelación se lleva a cabo según dos protocolos diferentes (etapa f) del procedimiento):

- durante la noche a 4 °C;
- 40 - durante 5 minutos a 37 °C en un baño de agua.

Después de descongelar, las muestras se cultivan en un caldo cerebro-corazón enriquecido y se evaluó la actividad metabólica. Las alícuotas de los filtrados descongelados antes del cultivo (filtrados descongelados no cultivado) también se almacenaron para determinar el ADNr 16S, ARNr 16S y perfil metabolómico.

- 45 *Cultivos microbianos*

- 50 En cada etapa crítica del procedimiento, se recoge una muestra y se usa para inocular tubos de cultivo por triplicado, conteniendo cada uno de los cuales 9,5 ml de caldo enriquecido de cerebro-corazón. Los tubos de cultivo ya se habían reducido en la cámara anaerobia para eliminar el oxígeno disuelto y permitir el crecimiento de bacterias anaerobias estrictas.

- 55 Después de la incubación durante 48 horas a 37 °C en condiciones anaerobias estrictas, se recogieron los cultivo por triplicado, se combinaron en tubos Falcon50 y centrifugados durante 30 minutos a 5000 xg, 4 °C. El sobrenadante también se ultracentrifugó durante 1 hora a 220.000 xg, 4 °C para perfiles metabolómicos (1 ml de sobrenadante de la fracción almacenada a -80 °C), mientras que el sedimento húmedo de 5000 X g se dividió en tres fracciones iguales en tubos Sarstedt para determinaciones e ADNr 16S y ARNr 16S, conservándose todas las alícuotas a -80 °C hasta su análisis.

- 60 *Análisis metabolómicos*

A continuación se realizaron los análisis metabolómicos, para obtener perfiles de LC-MS (Q-Exactive Thermofisher Scientific) en modos de ionización positiva y negativa.

- 65 *Perfil filogenético*

Se extrae el ADN total. Después se comprueba y se secuencian por pirosecuenciación.

Perfiles transcriptómicos

El ARN se extrajo usando el siguiente método: en resumen, las bacterias se lisan por tratamiento químico y mecánico; después, los lisados se precipitan y centrifugan; finalmente, el ARN se aísla y purifica en minicolumnas utilizando el kit de aislamiento de alta pureza (High Pure Isolation Kit, Roche). Se evalúa su integridad y luego se someten a una RT-PCR.

Los ADNc se secuencian por pirosecuenciación, después se sometieron al mismo análisis que para el ADN.

Resultados:

Perfil filogenético

El principal factor discriminante es el sujeto. Esto se esperaba, ya que la especificidad del hospedador de la flora microbiana está bien establecida. Esto significa independientemente del efecto de acondicionamiento de las heces, se respetará la especificidad del hospedador. Por lo tanto, las comparaciones realizadas serán fiables y los comportamientos retenidos para diferentes individuos serán más significativos.

Las correlaciones de Pearson y Spearman se utilizaron a continuación para evaluar el diluyente de acondicionamiento más eficaz. Se hicieron observaciones similares al comparar perfiles filogenéticos basados en ADN total y perfiles filotranscriptómicos basados en ARN. La siguiente ilustración (Figura 1) destaca los principales resultados obtenidos.

Impacto del procedimiento de reacondicionamiento sobre la integridad de la muestra

Las condiciones comparadas para el reacondicionamiento de preparaciones congeladas que se utilizarán para la nueva administración son:

- durante la noche a 4 °C; o
- durante 5 minutos a 37 °C.

Independientemente del diluyente (MDX15 o TR15), la descongelación rápida a 37 °C parece ser la más favorable para la reconstrucción de una microbiota próxima a las heces iniciales.

Perfiles transcriptómicos

Las correlaciones de Pearson entre perfiles filotranscriptómicos son discriminantes e informativas, mientras que no lo son entre perfiles filogenómicos.

La figura 1 presenta las correlaciones de Pearson entre los perfiles filotranscriptómicos obtenidos a partir de la distribución por familias bacterianas del ARN total de las diferentes fracciones preparadas. La referencia es el perfil obtenido de materias fecales crudas (SB por 'Heces crudas').

La figura indica que los diluyentes que contienen las mezclas de maltodextrina (MDX) y trehalosa (TR) permiten una mejor preservación de la integridad de la microbiota dominante en comparación con la solución salina (NaCl). Después, se han realizado observaciones similares para el ADN, lo que significa que el proceso permite preservar las poblaciones y su integridad funcional.

Análisis metabólicos

Los resultados de los análisis metabólicos se presentan en la Figura 2.

Los perfiles metabólicos de los cultivos de suspensiones fecales descongeladas en MDX15 o TR15 son los más similares a los cultivos de las suspensiones frescas correspondientes (flechas verdes), ya sea en condiciones aerobias (Ae) o anaerobias (An). Se obtuvieron correlaciones más débiles entre cultivos de suspensiones de NaCl congeladas y frescas (flechas rojas). El reacondicionamiento a 4 °C durante la noche o a 37 °C durante 5 minutos tiene poca influencia sobre el perfil metabólico. En su conjunto, basándose en la conservación de los perfiles metabólicos entre cultivos de materias fecales frescas, suspensiones de materias fecales frescas y las mismas suspensiones congeladas-descongeladas, **las maltodextrinas o la trehalosa son crioprotectores y agentes de carga muy eficaces para los trasplantes fecales.**

Ejemplo 2: Reconstrucción de microbiota en ratones axénicos

El procedimiento tiene como objetivo analizar el impacto del proceso de acondicionamiento de las heces humanas sobre la ecología intestinal reconstruida después de inoculación en ratones axénicos de la línea C3H/HeN. El enfoque normalizado incluye un grupo de control y varios grupos de ensayo. En comparación con el grupo de control que recibió una suspensión de heces recién recogidas, los grupos de ensayo recibieron preparaciones realizadas a partir de las

mismas heces:

- congeladas en NaCl,
- congeladas con maltodextrinas al 15 % y trehalosa al 5 % ("MDX15" como se describe en el Ejemplo 1); o
- congeladas con trehalosa al 15 % y maltodextrinas al 5 % ("TR15" como se describe en el Ejemplo 1). Estas diversas condiciones tienen como objetivo optimizar la preservación de la microbiota. Las fracciones congeladas se administran *in vivo* después de acondicionamiento y almacenamiento durante 1 y 7 semanas. Se preparó un testigo experimental con las heces crudas formuladas en NaCl, implantado inmediatamente después del acondicionamiento. Este procedimiento requiere el uso de ratones axénicos que reciban las diversas preparaciones de inóculo por boca, utilizando una sonda orogástrica (0,2 ml/ratón). La evaluación del éxito del procedimiento se basa en la caracterización de la microbiota en términos de composición y actividad, buscándose inicialmente la similitud máxima (%) con el control. Este procedimiento se implementa en 4 animales por condición para estudiar un conjunto de condiciones previamente validadas por análisis comparativos *in vitro*.

Toma de muestras y análisis: después de 2 días, 4 días y 15 días, se recogieron de 2 a 3 gránulos liberados reciente y espontáneamente de cada animal por la mañana para el análisis microbiológico. Además, se recogió una muestra de contenido cecal en sacrificio durante el sacrificio a los 15 días para análisis filogenómico y/o transcriptómico y metabolómico.

Resultados:

Estos análisis se llevaron a cabo en la primera serie de jaulas (1 semana de conservación frente al testigo). Los ADN se extrajeron y después se secuenciaron para ADNr 16S. Se identificaron y cuantificaron las unidades taxonómicas operativas (OTU). Una correlación estadística de Spearman permite a continuación comparar el contenido taxonómico de cada muestra analizada. Los resultados se presentan en la Figura 3.

Las correlaciones de Spearman calculadas entre las diferentes condiciones muestran que la colonización se lleva a cabo de manera eficaz con ventaja para las formulaciones DM1 y DM2 en comparación con NaCl al 0,9 % en solitario. En D+2, La formulación DM1 proporciona similitudes muy cercanas a los testigos, mientras que la formulación DM2 consigue un nivel de rendimiento equivalente a D+4. En D+4, la microbiota se estabiliza y se observa poca diferencia con el punto D+15.

Un análisis en profundidad entre los géneros bacterianos más alterados en estos ensayos, es decir los géneros *Bacteroides* y *Faecalibacterium*, se muestra en la Figura 4.

La evolución de D2 a D15 muestra claramente que el diluyente DM1 presenta rápidamente un perfil más cercano al de las heces frescas que el diluyente DM2. A los 15 días, sin embargo, ambos tienen perfiles similares. *Por el contrario*, NaCl fomenta una fuerte colonización de *Bacteroides*, bacterias proinflamatorias, a expensas en particular de *Faecalibacterium*, que apenas logra establecerse. Sin embargo, el tipo *Faecalibacterium* está bien estudiado porque tiene propiedades antiinflamatorias y contribuye a la eficacia de la barrera intestinal (Everard, 2013; Sokol, 2008). Su presencia en pequeñas cantidades en la microbiota humana también se correlaciona con diferentes patologías (enfermedad de Crohn, obesidad, enfermedades inflamatorias del intestino...).

Por lo tanto, el uso de NaCl no permite restaurar una flora de la misma calidad que las heces frescas originales, mientras que los diluyentes DM1 y DM2 sí lo consiguen, con un efecto algo más rápido para DM1, así como una menor variabilidad interindividual, representada por la altura de la caja.

La evolución de la distribución de las familias bacterianas sigue la misma tendencia entre el grupo testigo, el grupo que recibió la muestra con MDX15 (DM1) y el grupo que recibió la muestra con TR15 (DM2).

Se observa la misma tendencia en las muestras y análisis realizados después de 7 semanas de almacenamiento (resultados no mostrados).

Por lo tanto, parece que las maltodextrinas o la trehalosa permiten una recolonización eficaz del intestino sin alteración de la microbiota inicial.

Everard, A., 2013. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. Proc Natl Acad Sci U S A, págs. 110(22): 9066-71.

Sokol, H., 2008. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proc Natl Acad Sci U S A, págs. 105(43):16731-6.

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) la toma *ex vivo* al menos una muestra de la microbiota fecal del sujeto donante,
b) en un plazo inferior a 5 minutos después de la toma de muestra, introducir dicha muestra obtenida en a) en un dispositivo de recogida hermético al oxígeno,
c) mezclar la muestra obtenida en b) con al menos una solución acuosa salina que comprende al menos un crioprotector seleccionado entre trehalosa, galactosa-lactosa y sus mezclas y un agente de carga,
10 d) opcionalmente, filtración de la mezcla obtenida en c), en particular con un filtro que comprende poros de diámetro inferior o igual a 0,7 mm, preferentemente, inferior o igual a 0,5 mm, y
e) almacenar la mezcla obtenida en c) o d) mediante congelación a una temperatura comprendida entre -15 °C y -100 °C, preferentemente entre -60 °C y -90 °C, realizándose las etapas b) a e) anaeróticamente.

15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la muestra introducida en el dispositivo de recogida de la etapa b) se somete a un etapa de transporte antes de la etapa c).

20 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado porque** la muestra introducida en el dispositivo de recogida de la etapa b) se incuba a una temperatura comprendida entre 33 °C y 40 °C durante un plazo máximo de 75 h, entre las etapas b) y c).

25 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la cantidad total de crioprotector presente en la solución acuosa salina está comprendida entre el 3 y el 30 % en peso con respecto al volumen total de solución, preferentemente entre el 4 % y el 20 % en peso con respecto al volumen total de solución.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la solución acuosa salina comprende:

- 30 - al menos una sal seleccionada entre cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, gluconato de sodio y acetato de sodio, y
- opcionalmente al menos un antioxidante, preferentemente seleccionado entre L-ascorbato de sodio, tocoferoles, clorhidrato de L-cisteína monohidrato y sus mezclas.

35 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** el agente de carga es maltodextrinas.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** el agente de carga es una mezcla de maltodextrinas, en el que la cantidad de maltodextrinas está comprendida entre el 4 y el 20 % en peso con respecto al volumen total de solución.

40 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** comprende una etapa f) de descongelación de la muestra congelada obtenida en e), en condiciones anaerobias, hasta temperatura ambiente.

9. Muestra de microbiota fecal de un sujeto donante que puede obtenerse con el procedimiento según la reivindicación 8, para su uso en el trasplante de microbiota fecal autóloga o alogénica.

45 10. Muestra de microbiota fecal de un sujeto donante que puede obtenerse con el procedimiento según la reivindicación 8, para su uso para tratar disbiosis intestinales.

Figura 1

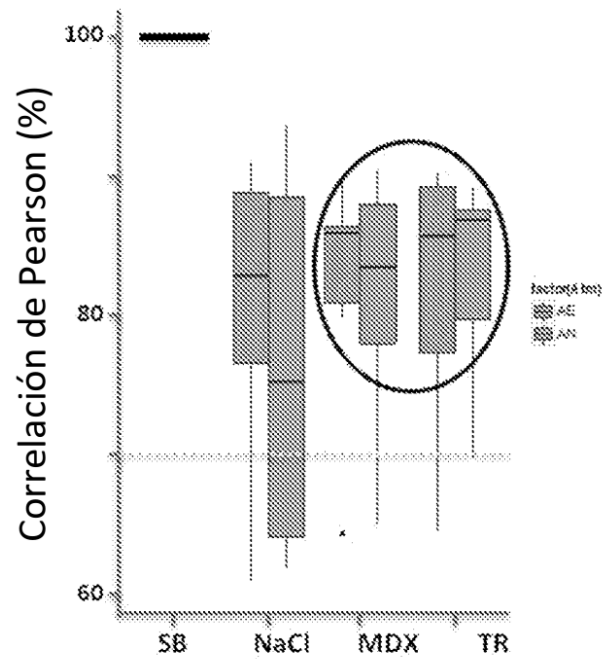


Figura 2

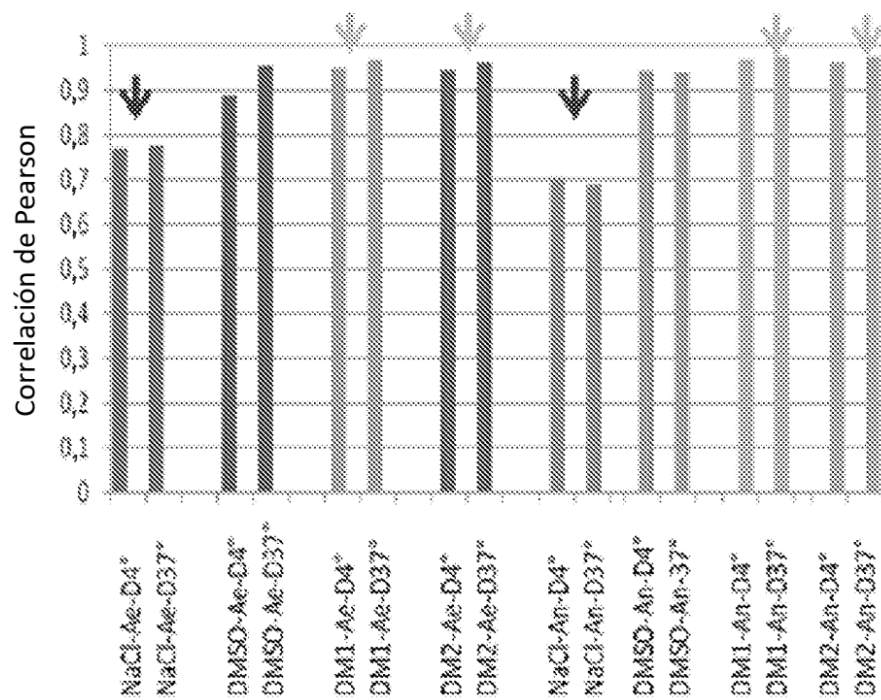


Figura 3

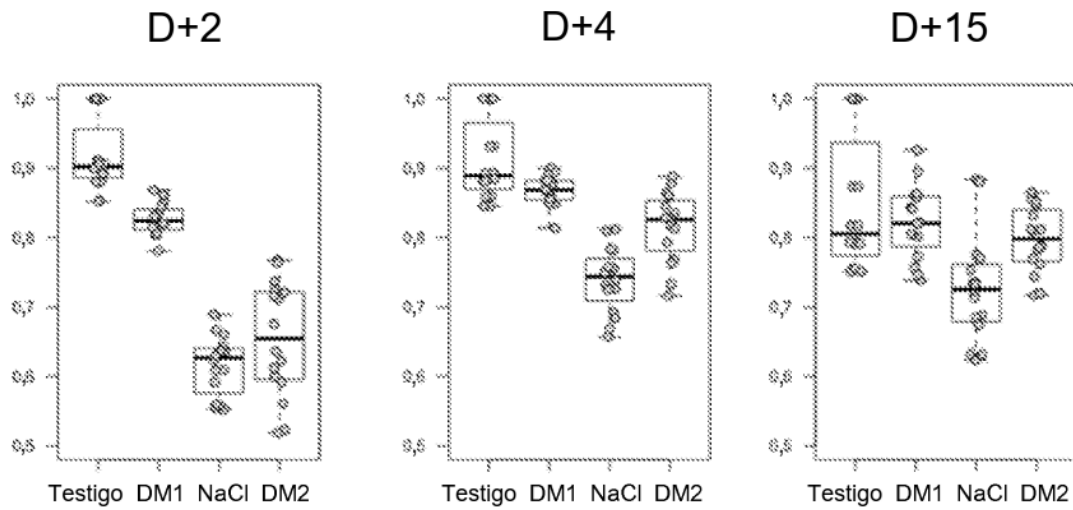


Figura 4

