

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 339**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2015.01)

**A01N 1/02** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

**A61P 1/00** (2006.01)

**A61P 1/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2019 PCT/FR2019/050522**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2019 WO19171012**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2019 E 19713110 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024 EP 3762001**

54 Título: **Procedimiento de recogida de heces y procedimiento de preparación de una muestra para trasplante de microbiota fecal**

30 Prioridad:  
**09.03.2018 FR 1852084**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.11.2024**

73 Titular/es:  
**MAAT PHARMA (100.0%)  
317 Avenue Jean Jaurès  
69007 Lyon, FR**

72 Inventor/es:  
**SCHWINTNER, CAROLE;  
LEROUX, ALICE;  
MADER, CLÉMENCE y  
AFFAGARD, HERVÉ**

74 Agente/Representante:  
**SÁEZ MAESO, Ana**

Observaciones:

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

ES 2 989 339 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 recogida de heces y procedimiento de preparación de una muestra para trasplante de microbiota fecal.

5

La presente invención se refiere a un procedimiento para recoger heces de múltiples donantes y a un procedimiento para preparar una muestra de microbiota fecal.

10

La invención también se refiere al uso de dicha muestra en el trasplante de microbiota fecal (TMF, también llamado transferencia de microbiota fecal), preferiblemente para tratar la disbiosis intestinal.

15

La microbiota intestinal humana, comúnmente denominada "flora intestinal", es el conjunto de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) que se encuentran en el sistema gastrointestinal humano (estómago, intestino y colon). La diversidad bacteriana se estima actualmente en alrededor de  $10^3$  especies bacterianas que constituyen la microbiota intestinal dominante de un individuo adulto, con una abundancia de  $10^{14}$  bacterias, que representan un metagenoma bacteriano de 200 000 a 800 000 genes en cada individuo, o de 10 a 50 veces el número de genes del genoma humano. Estéril *en el útero*, el intestino es colonizado desde los primeros días de vida hasta evolucionar hacia una microbiota individual única. Cada persona tiene bacterias que son relativamente parecidas en términos de especies, pero la composición exacta de su microbiota (especies, proporciones) es en gran medida (más de 2/3 de las especies) específica del huésped. Así, la microbiota intestinal humana es un ecosistema muy diverso, complejo y específico de cada individuo.

20

25

Mantener una alta diversidad de la microbiota promueve su estabilidad. Sin embargo, determinadas patologías o tratamientos desequilibran la microbiota: los antibióticos, por ejemplo, así como las enfermedades con un componente inflamatorio, como las enfermedades inflamatorias crónicas del intestino (EICI), pueden limitar la diversidad de la microbiota en el intestino. Los tratamientos con antibióticos (o terapia con antibióticos), en particular, provocan una alteración de la microbiota, que puede favorecer la proliferación de organismos patógenos como *Clostridium difficile*.

30

Un número de patologías están asociadas a una disbiosis intestinal, por ejemplo, la enfermedad del injerto contra el huésped (Graft-Versus-Host Disease - GvHD). El injerto o trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (alo-HSCT) es un tratamiento eficaz contra las neoplasias malignas hematopoyéticas y los trastornos hematopoyéticos hereditarios, y se considera la inmunoterapia tumoral más eficaz hasta la fecha [Sung, A.D. y Chao, N.J. (2013), Concise Review: Acute Graft-Versus-Host Disease: Immunobiology, Prevention, and Treatment, Stem Cells Transl. Med. 2: 25-32]. Sin embargo, las células T derivadas de células madre trasplantadas pueden atacar los tejidos receptores del huésped y provocar la GvHD, una complicación importante del alo-HSCT asociada con una mortalidad significativa (15 a 25 % de las muertes después del alo-HSCT). Los pacientes sometidos a alo-HSCT pueden estar expuestos simultáneamente a quimioterapia citotóxica, a irradiación corporal total, a inmunosupresores y a antibióticos de amplio espectro que pueden causar alteraciones significativas en la microbiota intestinal. De hecho, en pacientes después de un alo-HSCT a menudo se observa un enriquecimiento significativo de Enterococcaceae, así como un aumento de Lactobacillales y una disminución de Clostridiales. Como resultado, las bacterias dominantes que se encuentran comúnmente, como *Enterococcus* resistente a la vancomicina, *Streptococcus* del grupo viridans y diversas proteobacterias, pueden ingresar a la sangre y causar septicemia. Curiosamente, este cambio es particularmente prominente en pacientes que posteriormente desarrollan enfermedad refractaria del injerto contra el huésped (GvHD) Holler y otros (2014), Biol Blood Marrow Transplant. 20(5): 640-645, y Peled, J. (2017) 59.ª Reunión Anual de la Sociedad Estadounidense de Hematología, Atlanta, EE. UU., 9 al 11 de diciembre].

35

40

45

50

Para restaurar la microbiota intestinal y así restablecer la homeostasis (es decir, la simbiosis), se considera y se prueba el trasplante de microbiota fecal (TMF). Consiste en la introducción de heces de un donante sano en el tracto digestivo de un paciente receptor, con el fin de reequilibrar la microbiota intestinal alterada del huésped. Este trasplante de microbiota fecal puede ser alogénico (es decir, de un individuo donante sano a un paciente) o autólogo (es decir, de un individuo a sí mismo). Los resultados obtenidos en infecciones de tipo *Clostridium difficile* son alentadores y algunos pacientes han sido tratados con éxito (Tauxe y otros, Lab Medicine, Winter 2015, volumen 46, número 1). Estudios recientes también han demostrado que los pacientes con GvHD tratados con TMF tuvieron una mejoría en los síntomas gastrointestinales y una reducción o desaparición de la diarrea, asociada con una reconstrucción de la microbiota Kakhana y otros (2017) Transplantation 128: 2083-2089, y Spindelboeck y otros (2017) Hematológica 102: e210].

55

60

65

En el caso del trasplante alogénico, es importante que la muestra trasplantada tenga un perfil aceptable en términos de viabilidad y diversidad de bacterias, porque la suspensión de microbiota en su diluyente representa el principio activo (sustancia activa) del fármaco. Los métodos de trasplante actuales son a menudo empíricos y no toman precauciones particulares para garantizar la diversidad de bacterias presentes en las muestras de microbiota fecal utilizadas, ni para preservar mejor la viabilidad de las bacterias anaeróbicas, los componentes mayoritarios de la microbiota intestinal.

La solicitud de patente de Estados Unidos US 2017/239303 describe composiciones para restaurar la microbiota intestinal, así como sus métodos de fabricación y su administración. Este documento revela que las composiciones que comprenden muestras tienen un índice de diversidad de Shannon de aproximadamente 0,4-2,5 cuando los cálculos se realizan a nivel de la familia. Es del orden de 1 a 8 dependiendo del nivel de taxonomía (filos, especies, etc.) en función del cual se calcula la diversidad.

La publicación Paramsothy y otros [Paramsothy S., y otros (2017), Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial, *Lancet*, Mar 25; 389(10075): 1218-1228] describe la preparación de composiciones de microbiota fecal en el tratamiento de la colitis ulcerosa activa. Las composiciones se producen mezclando y homogeneizando heces de 3 a 7 donantes, luego se agrega una solución salina acuosa a la mezcla resultante (ver la página 122, columna de la izquierda, "Procedimientos"). La Figura 3 de la publicación de Paramsothy y otros (panel superior derecho) muestra la diversidad filogenética de las composiciones. Todavía existe una variación significativa entre los lotes producidos (indicados como "lotes de donantes" en la Figura), incluso después de combinar muestras de heces de donantes. Esta variación parece ser tan grande como la que existe entre donantes individuales (indicada como "Donantes individuales" en la Figura). Por tanto, existe una heterogeneidad significativa entre las muestras destinadas a tratar a los pacientes. Tal heterogeneidad no es deseable para una composición farmacéutica. De hecho, para garantizar que el paciente responda de la misma manera a cada dosis (o muestra) de microbiota fecal que recibe, es necesario que las dosis sean lo más homogéneas posible, y que los lotes también sean homogéneos.

Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar un procedimiento de trasplante de microbiota fecal que sea seguro, reproducible, eficaz y fácil de implementar, particularmente a escala industrial. Además, existe la necesidad de un procedimiento de trasplante de microbiota fecal en el que la diversidad bacteriana de los productos trasplantados sea lo más alta posible y en el que exista homogeneidad entre las diferentes dosis (muestras) de productos trasplantados a la misma persona. Así, es necesario que exista homogeneidad entre las diferentes dosis de un mismo lote de microbiota fecal (homogeneidad intra-lote) y entre los diferentes lotes producidos (homogeneidad inter-lote). La viabilidad de las bacterias debe mantenerse lo más posible durante el procedimiento y durante el almacenamiento.

Existe la necesidad de proporcionar muestras de microbiota fecal con diversidad y viabilidad bacteriana óptimas, para ser administradas para el tratamiento y la prevención de la disbiosis intestinal bacteriana (iatrogénica o no iatrogénica) y/o patologías asociadas. Existe la necesidad de proporcionar un procedimiento para preparar tales muestras. Las patologías en cuestión pueden ser la enfermedad refractaria del injerto contra el huésped (GvHD), la infección por *Clostridium difficile*, la colitis ulcerosa, la enfermedad inflamatoria intestinal, el síndrome del intestino irritable, la enfermedad de Crohn, la diabetes tipo II, las alergias alimentarias, el cáncer incluida la leucemia, la obesidad y la obesidad mórbida. Otras afecciones asociadas con la disbiosis incluyen autismo, esclerosis múltiple, diarrea del viajero, la disbiosis relacionada con cuidados intensivos hospitalarios, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, disbiosis intestinal asociada a quimioterapia contra el cáncer o una inmunoterapia, disbiosis relacionada con enfermedades hepáticas alcohólicas y no alcohólicas.

Existe la necesidad de proporcionar muestras de microbiota fecal para su uso en el tratamiento o prevención de la disbiosis intestinal iatrogénica y/o patologías y complicaciones asociadas que comprenden, entre otras, inflamación intestinal y diarrea.

La presente invención satisface las necesidades descritas anteriormente.

Por lo tanto, un objetivo de la invención es proporcionar muestras de microbiota fecal, que tengan una diversidad óptima y una viabilidad bacteriana suficiente, para su uso en la TMF (Transferencia de Microbiota Fecal), y que puedan producirse fácilmente de manera confiable y reproducible.

La invención se refiere a un método para preparar una mezcla homogénea de microbiota fecal procedente de al menos dos donantes preseleccionados que comprende las siguientes etapas:

- a. recoger al menos una muestra de microbiota fecal de dichos donantes preseleccionados,
- b. en un plazo inferior a 5 minutos tras la recogida, colocar la muestra obtenida en a) en un dispositivo de recogida hermético al oxígeno,
- c. controlar cualitativamente las muestras tomadas y excluir las muestras que no cumplan los criterios cualitativos,
- d. añadir a cada una de las muestras retenidas después de la etapa de control c) una solución salina acuosa que comprende al menos un agente crioprotector y/o un agente de carga,
- e. filtrar las muestras obtenidas al final de la etapa d) para formar una serie de inóculos,
- f. agrupar dichos inóculos para formar una mezcla de inóculos,
- g. homogeneizar dicha mezcla obtenida en la etapa f), en particular mediante agitación manual o utilizando un dispositivo de agitación, realizándose las etapas b) y d) a g) de forma anaeróbica.

Según una realización de la invención, los donantes se preseleccionan según los siguientes criterios de preselección:

- 5
- i. tener entre 18 y 60 años,
  - ii. tener un índice de masa corporal (IMC) entre 18 y 30,
  - iii. ausencia de antecedentes personales de enfermedades infecciosas graves, como SIDA, hepatitis, etc., trastornos metabólicos y neurológicos o depresión,
  - iv. ausencia de medicación reciente que pueda deteriorar la composición de la microbiota intestinal,
  - v. ausencia de síntomas recientes asociados con enfermedades gastrointestinales, como fiebre, diarrea,
  - 10 náuseas, vómitos, dolor abdominal, ictericia, ausencia de antecedentes de enfermedades infecciosas graves, en particular SIDA, hepatitis, etc.
  - vi. ausencia de viajes recientes a países tropicales,
  - vii. ausencia de conductas sexuales de riesgo,
  - viii. ausencia de lesión, perforación y/o tatuajes recientes (típicamente, dentro de los últimos tres meses),
  - 15 ix. ausencia de fatiga crónica reciente (típicamente, en los últimos tres meses),
  - x. ausencia de reacción alérgica reciente (típicamente, en los últimos tres meses),
  - xi. opcionalmente, tener una dieta diversa.

Según una realización de la invención, los criterios cualitativos de las muestras de la etapa c) incluyen:

- 20
- consistencia de la muestra entre 1 y 6 según la escala de Bristol,
  - ausencia de sangre y orina en la muestra.

Según una realización de la invención, los criterios cualitativos de las muestras de la etapa c) incluyen:

- 25
- ausencia de las siguientes bacterias: *Campylobacter*, *Clostridium difficile* (toxina A/B), *Salmonella* *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* sp., *E. coli* productora de toxina similar a Shigo (STEC) *stx1/stx2*, bacterias multirresistentes, bacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLSE) - Enterococos resistentes a la vancomicina y a los glicopéptidos (ERV, GRE), *Listeria monocytogenes*, y las bacterias
  - 30 *resistentes a los carbapenémicos*,
  - ausencia de los siguientes parásitos: *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora* sp., *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Blastocystis hominis*, *Helminths*, *Strongyloides stercoralis*, *Isospora* sp., *Microsporidia* y *Dientamoeba fragilis*,
  - ausencia de los siguientes virus: Adenovirus F40/41, Astrovirus, Norovirus, Rotavirus A, Sapovirus y Picornavirus (Aichivirus y enterovirus),
  - 35 - ausencia de las siguientes bacterias: *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) *lt/st*, *Shigella/E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *Plesiomonas shigelloides*.

Según una realización de la invención, el al menos un agente crioprotector y/o agente de carga de la etapa d) es un poliol, un di-, tri- o polisacárido o su mezcla y un agente de carga.

Según una realización de la invención, la solución salina acuosa de la etapa d) comprende maltodextrina y trehalosa.

Según una realización de la invención, la filtración en la etapa e) se realiza con un filtro que comprende poros con un diámetro inferior o igual a 0,5 mm, preferiblemente inferior o igual a 265 µm.

Según una realización de la invención, el tiempo entre la recogida de la muestra y el final de la etapa g) es inferior a 76 horas.

Según una realización de la invención, la etapa g) de homogeneización se lleva a cabo a una temperatura entre 2 °C y 25 °C, preferiblemente entre aproximadamente 2 y 6 °C, más preferiblemente a aproximadamente 4 °C.

Según una realización de la invención, el procedimiento comprende la siguiente etapa de transferencia:

55 h. la transferencia de la mezcla homogeneizada obtenida en la etapa g):

- 60
- i. en bolsas para almacenamiento a una temperatura de aproximadamente -50 °C a -80 °C, preferiblemente a -80 °C, o para almacenamiento a una temperatura entre aproximadamente 2 a 6 °C para uso de la mezcla dentro de 16 horas aproximadamente, o para almacenamiento a una temperatura entre 10 y 25 °C para uso de la mezcla en aproximadamente 4 horas,
  - ii. en un dispositivo de liofilización para liofilización.

Según una realización de la invención, la mezcla homogénea de microbiota fecal proviene de al menos cuatro donantes, preferiblemente de al menos cinco donantes.

65

Según otro aspecto, la invención se refiere al uso de la mezcla homogénea de microbiota fecal obtenible según el proceso de la invención para su uso en el tratamiento de la disbiosis intestinal y/o enfermedades asociadas a la disbiosis intestinal mediante trasplante de microbiota fecal (TMF) alogénica.

5 Según una realización de la invención, la mezcla homogénea de microbiota fecal proviene de al menos cuatro donantes y contiene los siguientes géneros bacterianos productores de butirato: *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Alistipes*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Odoribacter*, *Roseburia*, *Holdemanella*, *Anaerostipes*, *Oscillibacter*, *Subdoligranulum* y *Butyrivibrio*.

10 Según una realización de la invención, dicha mezcla homogénea de microbiota fecal tiene una alta diversidad, teniendo un inverso del índice de Simpson superior a 15, preferiblemente superior a 20.

La invención se refiere al uso de la mezcla homogénea de microbiota fecal obtenible según el procedimiento de la invención en el tratamiento de la disbiosis intestinal.

15

La invención se refiere al uso de la mezcla homogénea de microbiota fecal obtenible según el procedimiento de la invención en el tratamiento de la enfermedad del injerto contra huésped (GvHD).

20

La invención se refiere al uso de la mezcla homogénea de microbiota fecal obtenible según el procedimiento de la invención en el tratamiento de la disbiosis intestinal iatrogénica y/o patologías y complicaciones asociadas que incluyen inflamación intestinal y diarrea.

25

La invención se refiere al uso de la mezcla homogénea de microbiota fecal obtenible según el procedimiento de la invención en el tratamiento de la infección por *Clostridium difficile* y la diarrea asociada (CDI), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), síndrome del intestino irritable (IBS), estreñimiento idiopático, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, obesidad y obesidad mórbida, autismo, esclerosis múltiple, diarrea del viajero, enfermedad de Parkinson, diabetes tipo II, alergias alimentarias, cáncer, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia y trastornos bipolares, disbiosis intestinal asociada a quimioterapia contra el cáncer o una inmunoterapia y enfermedades hepáticas alcohólicas y no alcohólicas.

30

Descripción de las figuras

35

La Figura 1 es una representación esquemática del procedimiento para preparar una mezcla homogénea de microbiota fecal a partir de muestras de microbiota fecal de varios donantes para su uso en la TMF alogénica.

La Figura 2 es un histograma que representa el porcentaje de viabilidad de la microbiota del inóculo (inóculo 1, 4, 5, 6 y 2+8) y la mezcla de inóculo (sustancia activa) en las bolsas 1 a 15 de inóculo para almacenamiento.

40

La Figura 3 es un histograma que representa el porcentaje de viabilidad de la microbiota de inóculos individuales y mezclas de inóculos (inóculos agrupados) para cuatro lotes de productos. El lote n.º 4 es el mismo lote que el usado para el Ejemplo 1 (e ilustrado en la Figura 2).

Las Figuras 4a y 4b muestran la riqueza y diversidad bacteriana de los inóculos.

45

Figura 4a: La riqueza (número de especies bacterianas) medida para los inóculos individuales y también para la mezcla de inóculos para los lotes, del lote n.º 1 al lote n.º 4. Se evaluaron unidades taxonómicas operativas (en inglés operational taxonomic units (OTU)) en ARN ribosómico 16S (ARNr 16S). Para los donantes individuales, la riqueza está entre 100 y 350 especies.

Figura 4b: La similitud de Bray Curtis de inóculos individuales por lote ("Donantes"), inóculos comparados entre lotes ("Inter-lotes") e inóculos agrupados en bolsas en un mismo lote ("Intra-lote").

50

La Figura 5 es una representación esquemática de los experimentos comparativos del Ejemplo 3, en los que se usaron las mismas heces para la producción de los dos lotes de muestras, una fabricación según una realización de la invención ("Método Inv."), idéntica al método descrito para el Ejemplo 3, y la fabricación según el método descrito en Paramsothy y otros [Paramsothy S., y otros (2017), Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial, Lancet, Mar 25; 389(10075): 1218-1228] o "Método Ref".

55

La Figura 6 representa la diversidad medida según el inverso del índice de Simpson en los dos grupos de muestras del Ejemplo 3 en forma de diagramas de caja. La Figura 6a muestra la diversidad de cada muestra y la Figura 6b muestra la diversidad de los dos grupos de muestras.

60

La Figura 7 es un histograma apilado que representa la abundancia relativa de las 10 familias bacterianas más presentes en dos grupos de muestras del Ejemplo 3. El grupo de la derecha (muestras Inv-01 a Inv-10) se produce según una realización de la invención. El grupo de la izquierda, "Referencia" (muestras Ref-01-Ref-10), se produce según un método de la técnica anterior, Paramsothy y otros.

65

La Figura 8 muestra la abundancia relativa de los 15 géneros bacterianos productores de butirato, a saber, *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Alistipes*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Odoribacter*, *Roseburia*, *Holdemanella*, *Anaerostipes*, *Oscillibacter*, *Subdoligranulum* y *Butyrivibrio*, en las heces de los donantes (primer recuadro a la izquierda), y luego en los lotes de mezclas homogéneas obtenidas de las heces de 3, 4, 5 y 6 donantes respectivamente.

La Figura 9 muestra la riqueza de especies en los diferentes lotes de mezcla homogénea obtenida de las heces de 4, 5 y 6 donantes.

Descripción detallada

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para recoger y preparar una mezcla homogénea de microbiota fecal de varios donantes. La invención también se refiere a dicha mezcla homogénea obtenible según el proceso de la invención para su uso en el tratamiento de la disbiosis intestinal y/o enfermedades asociadas a la disbiosis intestinal mediante trasplante de microbiota fecal alogénica.

10 En general, según la invención, los donantes son sujetos humanos sanos. Por sujeto "sano" se entiende un sujeto que no está afectado por un desequilibrio de la microbiota intestinal o una patología diagnosticada/reconocida por la comunidad médica.

15 Así, para seleccionar a los posibles donantes se han definido una serie de criterios. Estos criterios son los siguientes:

- 20 i. tener entre 18 y 60 años,
- ii. tener un índice de masa corporal (IMC) entre 18 y 30,
- iii. ausencia de antecedentes personales de enfermedades infecciosas graves como SIDA o hepatitis viral, trastornos metabólicos y neurológicos o depresión,
- iv. ausencia de uso reciente (durante aproximadamente 3 meses antes de la donación) de medicamentos que podrían deteriorar la composición de la microbiota intestinal, como antibióticos,
- 25 v. ausencia de aparición reciente (durante aproximadamente 3 meses antes de la donación) de síntomas asociados con enfermedades gastrointestinales, como fiebre, diarrea, náuseas, vómitos, dolor abdominal, ictericia, ausencia de antecedentes de enfermedades infecciosas graves, en particular SIDA, hepatitis, etc.
- vi. ausencia de viajes recientes (durante aproximadamente los 3 meses anteriores a la donación) a países tropicales,
- vii. ausencia de conductas sexuales de riesgo,
- 30 viii. ausencia de contacto reciente (durante aproximadamente los 3 meses anteriores a la donación) con sangre humana, por ejemplo, a través de una lesión, perforación y/o tatuaje,
- ix. ausencia de fatiga crónica reciente (durante los aproximadamente 3 meses anteriores a la donación),
- x. ausencia de reacción alérgica reciente (durante aproximadamente 3 meses antes de la donación),
- 35 xi. opcionalmente, tener una dieta diversa.

Los criterios de selección de donantes se basan en los utilizados habitualmente en Europa para la donación de sangre, pero con criterios adicionales específicos de la donación de heces y el contexto del trasplante de microbiota fecal. Así, los criterios (i) a (xi) se definieron para seleccionar a los donantes.

40 El criterio opcional relacionado con una dieta diversa tiene como objetivo mejorar la posibilidad de tener una diversidad bacteriana significativa en la muestra de microbiota fecal. Por tanto, es preferible que el donante tenga una dieta variada.

45 Por "dieta variada" nos referimos a una dieta compuesta por verduras variadas y diferentes cereales (que proporcionarán un aporte regular de fibra), pero también frutas y carnes.

50 Por "diversidad bacteriana" nos referimos a la diversidad o variabilidad medida a nivel del género o la especie. La diversidad bacteriana se puede expresar con términos como "riqueza" (número de especies observadas en una muestra), "Índice de Shannon" e "Índice de Simpson". El índice de Shannon da una idea de la diversidad específica, es decir, del número de especies de la muestra (riqueza específica) y de la distribución de los individuos dentro de estas especies (equidad específica). El índice de Simpson se deriva de la riqueza y tiene en cuenta la abundancia relativa de cada especie. Este está comprendido entre 0 (baja diversidad) y 1 (alta diversidad). El inverso del índice de Simpson permite reflejar la diversidad (considerando la riqueza y abundancia relativa de especies como para el índice de Simpson) con un rango de valores que va desde 0 (baja diversidad) hasta el infinito (alta diversidad).

60 El procedimiento según la invención, típicamente, comprende una etapa a) de recogida de al menos una muestra de heces, que comprende la microbiota fecal del sujeto donante. De este modo, la etapa a) de recogida de al menos una muestra de heces puede ser realizada por el propio donante, por ejemplo, en su domicilio, o por un profesional sanitario.

65 La recogida de al menos una muestra de heces se realiza preferiblemente con un dispositivo de recogida diseñado para esta función de manera que la muestra de heces esté encerrada en un entorno anaeróbico. Así, se puede citar el dispositivo de recogida descrito en la solicitud de patente WO2016/170290. Así, típicamente, a los donantes seleccionados se les entrega un dispositivo de recolección de heces en el hogar con una guía de usuario. Preferiblemente, una muestra de heces tiene una masa de al menos 20 g.

Después de esta etapa de muestreo, y dentro de un corto período de tiempo, por ejemplo, menos de 5 minutos después del muestreo, preferiblemente menos de 3 minutos, más preferiblemente menos de 1 minuto, la muestra se coloca en un dispositivo de recolección hermético al oxígeno: esta es la etapa b).

5 Según una realización de la invención, la etapa de recogida de al menos una muestra de microbiota fecal se realiza depositando directamente una muestra de heces en un dispositivo de recogida, como el descrito en la solicitud de patente WO2016/170290.

10 A continuación, generalmente el proceso ahora se lleva a cabo de forma anaeróbica (en una atmósfera anaeróbica) o en confinamiento donde la exposición al aire es limitada. La etapa de control c) se puede llevar a cabo de forma anaeróbica o aeróbica o en confinamiento donde la exposición al aire es limitada. Según una realización de la invención, la recogida de la muestra para realizar las pruebas de control se realiza de forma aeróbica. Según una realización de la invención, las etapas b) y d) a g) del procedimiento se llevan a cabo de forma anaeróbica o en confinamiento donde la exposición al aire es limitada. Al limitar la exposición al aire, se preserva así la viabilidad de las bacterias que constituyen la microbiota fecal y presentes en la muestra.

15 Preferiblemente, el dispositivo de recogida hermético al aire tiene una forma del tipo que comprende:

- 20 - 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
- 25 - una cubierta adaptada para montarse de forma desmontable y estanca en el cuello del recipiente para cerrar la abertura de acceso del cuello y cerrar el espacio interior del cuerpo, en la que el cuerpo del recipiente está formado por una bolsa flexible, y en el que al menos uno del contenedor y la tapa está provisto de un elemento de evacuación adaptado para evacuar al menos parte de los gases contenidos en el espacio interior del cuerpo del contenedor.

30 Preferiblemente, el elemento de evacuación del dispositivo comprende un pasaje proporcionado a través de uno entre el recipiente y la tapa y un elemento para cerrar el pasaje para evitar que fluidos externos penetren en el espacio interior del cuerpo del recipiente. Preferiblemente, el elemento de evacuación del dispositivo comprende además una membrana de filtración microporosa dispuesta en el conducto.

Alternativamente, el dispositivo de recogida hermético al aire tiene una forma del tipo que comprende:

- 35 - 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
- 40 - una tapa adaptada para montarse de manera extraíble y hermética en el cuello del recipiente para cerrar la abertura de acceso del cuello y cerrar el espacio interior del cuerpo,
- 40 - en donde el espacio interior del cuerpo del recipiente comprende opcionalmente un dispositivo químico neutralizador de oxígeno.

45 Por ejemplo, para llevar a cabo las etapas a) a d) (o incluso e)) del procedimiento, según una realización de la invención, es posible utilizar un dispositivo de recogida provisto de al menos un dispositivo adicional, por ejemplo, un dispositivo anexo de suministro para suministrar fluido al espacio interior (por ejemplo, la solución añadida en la etapa d)), tal como se describe en el documento WO 2016/170290.

50 Además, el dispositivo adicional también puede ser un tubo de análisis, utilizado para tomar una muestra para análisis (por ejemplo, un control cualitativo según la etapa c)).

Preferiblemente, el dispositivo de recogida hermético al aire se utiliza para las etapas a) y b): el muestreo de la muestra de la etapa a) se realiza directamente en dicho dispositivo, en particular en el recipiente y el cierre del dispositivo, en particular gracias a la tapa, coloca la muestra en una atmósfera libre de oxígeno (etapa b)).

55 En particular, el dispositivo mencionado anteriormente, utilizado en la etapa b), permite realizar las etapas b), d) y e) de forma anaeróbica.

De este modo, opcionalmente puede tener lugar una etapa de transporte. Esta etapa de transporte permite enviar la muestra desde el lugar de recogida al laboratorio, para su tratamiento posterior y análisis.

60 Después de la etapa b), preferiblemente, en menos de 24 horas después de la etapa b), se realiza la etapa c) de control cualitativo de las muestras tomadas. La finalidad de este control cualitativo es eliminar las muestras de microbiota fecal que no cumplan los criterios cualitativos predefinidos. Por tanto, las muestras retenidas después del control se consideran aceptables para formar la mezcla homogénea deseada de microbiota fecal.

65 De manera general, los criterios de calidad que se monitorean incluyen:

- consistencia de la muestra entre 1 y 6 según la escala de Bristol, mediante inspección visual,
- ausencia de sangre y de orina en la muestra,

Los criterios también pueden incluir:

- 5
- ausencia de las siguientes bacterias: *Campylobacter*, *Clostridium difficile* (toxina A/B), *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio sp.*, *E. coli productora de toxina similar a Shigo (STEC) stx1/stx2*, bacterias multiresistentes: bacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLSE) - Enterococos resistentes a la vancomicina y a los glicopéptidos (ERV, GRE), *Listeria monocytogenes*, y bacterias resistentes a los carbapenémicos,
- 10
- ausencia de los siguientes parásitos: *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora sp.*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Blastocystis hominis*, *Helminthos*, *Strongyloides stercoralis*, *Isospora sp.*, *Microsporidia* y *Dientamoeba fragilis*,
- 15
- ausencia de los siguientes virus: Adenovirus F40/41, Astrovirus, Norovirus, Rotavirus A, Sapovirus y Picornavirus (Aichivirus y enterovirus),
  - ausencia de las siguientes bacterias: *E. coli enteroagregativa* (EAEC), *E. coli enteropatogénica* (EPEC), *E. coli enterotoxigénica* (ETEC) *Is/st*, *Shigella/E. coli enteroinvasiva* (EIEC) y *Plesiomonas shigelloides*.

20 La comprobación de la consistencia de la muestra se realiza generalmente mediante inspección visual. Si la muestra tiene una apariencia entre 1 y 6, preferiblemente 5, según la escala de Bristol [Lewis, S.J.; Heaton, K.W. (septiembre de 1997). "Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time". Scand. J. Gastroenterol.], es aceptable y se mantendrá.

25 El control de ausencia de sangre y orina en la muestra se puede realizar mediante inspección visual o por otros medios. Por ejemplo, se pueden utilizar pruebas inmunológicas rápidas. Por ejemplo, la prueba de OC-Sensor® (disponible en MAST Diagnostic en Francia), una prueba inmunológica cuantitativa que detecta la hemoglobina utilizando anticuerpos específicos para la globina humana.

30 Si se nota la presencia de sangre y/u orina, se descarta la muestra.

Según una realización de la invención, también se puede realizar un control de la ausencia de determinados parásitos, virus y bacterias en la muestra. Típicamente, la muestra se analiza para detectar la ausencia de ciertos parásitos, virus y bacterias una vez a la semana, por donante. Esto significa que, típicamente, para un donante que proporciona, por ejemplo, cinco muestras por semana, se analizará una muestra de cada cinco. Según una realización de la invención, la etapa de comprobar la ausencia de determinados parásitos, virus y bacterias en la muestra se lleva a cabo en cada muestra.

35

Los controles de la ausencia de determinadas bacterias, determinados parásitos y determinados virus en las muestras se realizan utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

40

Preferiblemente, las siguientes bacterias deberían estar ausentes de la muestra: *Campylobacter*, *Clostridium difficile* (toxina A/B), *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio sp.*, *E. coli productora de toxina similar a Shigo (STEC) stx1/stx2*, *Listeria monocytogenes* y bacterias multiresistentes, como las bacterias gramnegativas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLSE) y los Enterococos resistentes a la vancomicina y a los glicopéptidos (ERV, GRE), *Listeria monocytogenes*, bacterias resistentes a los carbapenémicos, *E. coli enteroagregativa*(EAEC), *E.coli enteropatogénica*(EPEC), *E.coli enterotoxigénica*(ETEC) *Es/st*, *Shigella/E. coli enteroinvasiva*(EIEC) y *Plesiomonas shigelloides*.

45

Preferiblemente, las bacterias citadas anteriormente son patógenos cuya presencia en la muestra de microbiota fecal recolectada excluirá de la selección al donante de dicha muestra.

50

Asimismo, preferiblemente, en la muestra de microbiota fecal deben estar ausentes los siguientes parásitos: *Cryptosporidium*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, *Blastocystis hominis*, *Helminthos*, *Strongyloides stercoralis*, *Isospora sp.*, *Microsporidia* y *Dientamoeba fragilis*.

55

Asimismo, preferiblemente, en la muestra de microbiota fecal deberían estar ausentes los siguientes virus: Adenovirus F40/41, Astrovirus, Norovirus, Rotavirus A, Sapovirus y Picornavirus (Aichivirus y enterovirus).

Los controles de presencia de bacterias, parásitos y de virus se llevan a cabo utilizando métodos conocidos por el experto en la técnica. Como ejemplos se pueden citar los métodos siguientes: cultivo en condiciones selectivas, detección de bacterias, parásitos o virus con anticuerpos, amplificación (por ejemplo, con PCR) y análisis de secuencias de ADN presentes en muestras. Como sistema de análisis de secuencias de ADN se puede citar el FilmArray® de BioMerieux (Francia) un sistema automatizado que puede utilizarse para la detección de bacterias, parásitos y virus. Por ejemplo, con este sistema se pueden detectar los siguientes parásitos: *Cryptosporidium*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. También se puede citar la serie de pruebas de PCR "Allplex-GI" disponible en Eurobio (Francia).

60

65

Otros parásitos como *Blastocystis hominis*, *Isopora* sp, *Microsporidies* y *Dientamoeba fragilis* pueden detectarse mediante examen microscópico con concentración de la muestra si es necesario. *Strongyloides stercoralis* se puede detectar, por ejemplo, mediante tinción electiva, después de concentrar la muestra si es necesario.

5

Las bacterias multirresistentes, tales como BLSE, ERV y GRE, pueden detectarse mediante cultivo en condiciones específicas, por ejemplo, en medio ESBL, VRE o ALOA disponible comercialmente, por ejemplo, de BioMerieux.

10

Para algunas especies de bacterias y virus, no se requiere su ausencia en la muestra. Según una realización de la invención, la presencia de las siguientes bacterias no es un criterio para la exclusión de la muestra: *E. coli enteroagregativa* (EAEC), *E. coli enteropatogénica* (EPEC), *E. coli enterotoxigénica* (ETEC) *Is/st*, *Shigella*/*E. coli enteroinvasiva* (EIEC) y *Plesiomonas shigelloides*. Según una realización de la invención, la presencia del virus EBV no es un criterio de exclusión porque este virus prevalece hoy en la población humana general.

15

En términos generales, las muestras retenidas después de la etapa de control c) que comprende un control de la ausencia de sangre y orina en la muestra y posiblemente un control de la ausencia de ciertos parásitos, virus y bacterias en la muestra, pasan a la etapa d). La etapa d) comprende la adición de un diluyente crioprotector.

20

Generalmente, para la etapa d), las muestras se transforman por separado en inóculos líquidos añadiendo diluyente crioprotector. Generalmente, se añade una solución salina acuosa que comprende al menos un agente crioprotector y/o un agente de carga a cada una de las muestras retenidas después de la etapa de control c).

25

Para la preparación de los inóculos se puede utilizar cualquier diluyente/crioprotector adecuado. Preferiblemente, se pueden usar polioles o di-, tri- o polisacáridos, o una mezcla de los mismos. Como poliol, se pueden citar la glicerina, manitol, sorbitol, propilenglicol o etilenglicol. Como di-, tri- o polisacáridos, se pueden citar los dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros de unidades diferentes o idénticas, seleccionándose dichas unidades entre la glucosa, fructosa, galactosa, fucosa y el ácido N-acetilneuramínico. Entre los disacáridos que pueden utilizarse, se pueden citar la trehalosa o uno de sus análogos o sacarosa. Preferiblemente, el crioprotector se elige entre glicerol, manitol, sorbitol, propilenglicol, etilenglicol, trehalosa y sus análogos, sacarosa, galactosa-lactosa y mezclas de los mismos. Más preferiblemente, el crioprotector es galactosa-lactosa o trehalosa.

30

35

Normalmente, la cantidad de crioprotector presente en la solución salina acuosa está entre 3 y 30 % en peso con respecto al volumen total del inóculo final (p/v), preferiblemente entre 4 y 20 % (p/v).

40

Como agentes de carga, se pueden citar, por ejemplo, los hidrolizados parciales de almidón, en particular de trigo o de maíz, así como los hidrolizados parciales de alimentos feculentos, por ejemplo, de patata, que contienen grandes cantidades de maltodextrina. Preferiblemente, el agente de carga es una mezcla de maltodextrinas, en la que la maltodextrina está presente entre 3 y 30 %, preferiblemente entre 4 y 20 % (con relación al volumen total del inóculo final peso/volumen).

45

Según una realización de la invención, el diluyente/crioprotector es una solución salina acuosa que comprende al menos un crioprotector y un agente de carga.

50

Típicamente, la solución contiene agua y sales fisiológicamente aceptables. Típicamente, la solución contendrá sales de calcio, sodio, potasio o magnesio con cloruro de hierro, gluconato, acetato o bicarbonato. Opcionalmente, la solución salina acuosa también puede contener al menos un antioxidante. El antioxidante puede elegirse entre el ácido ascórbico y sus sales, los tocoferoles, la cisteína y sus sales, en particular el clorhidrato, y sus mezclas. Preferiblemente, la solución salina acuosa comprende al menos una sal elegida entre cloruro sódico, cloruro cálcico, cloruro de magnesio, fluoruro potásico, gluconato sódico y acetato sódico y opcionalmente al menos un antioxidante elegido entre L-ascorbato sódico, tocoferol, clorhidrato de cisteína monohidratado y mezclas de los mismos. Típicamente, la sal está presente en la solución salina acuosa en una concentración entre aproximadamente 5 y 20 g/l, preferiblemente entre 7 y 10 g/l (con respecto al volumen total del inóculo final). Típicamente, el antioxidante está presente en la solución salina acuosa en una cantidad entre 0,3 y 1 % peso/volumen, preferiblemente entre 0,4 y 0,6 % peso/volumen (con respecto al volumen total del inóculo final).

55

60

En términos generales, la solución salina acuosa que comprende al menos un agente crioprotector y/o un agente de carga se añade a la muestra de microbiota fecal con una relación de peso (g)/volumen (ml) de entre 1: 0,5 y 1: 10, preferiblemente entre 1: 2 y 1: 8, más preferiblemente 1: 4. Una relación peso/volumen de muestra: solución igual a 0,5 peso: 10 volúmenes significa que la muestra se mezcla a razón de 0,5 en peso (por ejemplo, 0,5 g) por 10 volúmenes de solución (por ejemplo, 10 ml).

65

5 Preferiblemente, la etapa d) de agregar una solución salina acuosa que comprende al menos un agente crioprotector y/o un agente de carga se lleva a cabo de manera anaeróbica o en confinamiento donde la exposición al aire está limitada. Según una realización de la invención, la solución salina que comprende al menos un agente crioprotector y/o un agente de carga se añade al dispositivo anexo del dispositivo de recogida mencionado a continuación, y la solución se añade a la muestra de heces a través de un conducto cerrado. La mezcla de la muestra con al menos una solución salina acuosa que comprende al menos un agente crioprotector y/o un agente de carga puede realizarse normalmente mediante mezclado, para obtener una mezcla homogénea.

10 Las muestras obtenidas después de esta etapa de dilución se filtran a continuación, en la etapa e). Preferiblemente, la etapa de filtración se lleva a cabo con uno (o más, con poros de tamaño cada vez más reducido) filtro(s) que comprenden poros con un diámetro inferior o igual a 0,5 mm, preferiblemente inferior o igual a 265 µm. En el caso en que se utilizan varios filtros, el tamaño de los poros disminuye gradualmente. Preferiblemente, los primeros filtros utilizados comprenden poros con un diámetro inferior o igual a 2 mm, preferiblemente inferior o igual a 1 mm. Preferiblemente, el último filtro utilizado comprende poros con un diámetro inferior o igual a 0,5 mm, preferiblemente inferior o igual a 265 µm. Así, se obtienen los inóculos individuales. Preferiblemente, esta etapa de filtración e) se lleva a cabo de forma anaeróbica o en confinamiento donde la exposición al aire está limitada. Durante la filtración, la muestra salida de la etapa d) se puede empujar a través de los filtros manualmente, por acción mecánica, por gravedad, por vacío o por otros medios apropiados.

20 Según una realización de la invención, se utiliza la misma cantidad (en peso) de heces por donante para formar el inóculo, es decir para realizar las etapas d) y e). Como cantidad adecuada se puede citar, por ejemplo, 25-80 g, preferiblemente 40 g. Así, cada inóculo individual se produce utilizando la misma cantidad de muestra de microbiota fecal.

30 La etapa f) consiste en agrupar los inóculos provenientes de la etapa de filtración e). En particular, típicamente, los inóculos individuales se transfieren a un recipiente, preferiblemente una bolsa flexible. Típicamente, el volumen de este recipiente que agrupa los inóculos es de 1 l a 5 l, preferiblemente 3 l o de 5 l. Este volumen puede ser mayor dependiendo de la escala de industrialización del procedimiento. La transferencia se puede realizar manualmente o utilizando medios mecánicos. Preferiblemente, la transferencia de los inóculos se realiza utilizando medios mecánicos, por ejemplo, una jeringa, más preferiblemente, con una bomba peristáltica. Las bombas peristálticas adecuadas están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Interscience (Francia).

35 Una vez agrupados, los inóculos se mezclan para formar una mezcla homogénea (etapa de homogeneización g)). Por tanto, esta mezcla homogénea se considera "un lote" de microbiota fecal. La mezcla de inóculos puede realizarse por cualquier medio. La mezcla de los inóculos puede realizarse manualmente o mediante medios mecánicos conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, podemos citar un plato de agitación, disponible por ejemplo en la compañía Stuart (Inglaterra).

40 En general, se puede utilizar una velocidad de agitación de 80-200 rpm, preferiblemente entre 90 y 150 rpm, más preferiblemente 100-135 rpm. En general, la homogeneización puede tener lugar durante un período de tiempo entre 10 minutos y 2 horas, preferiblemente 20 minutos y 1 hora, más preferiblemente durante 30 minutos. La duración depende de la velocidad de agitación. Un experto en la técnica sabe determinar el tiempo de homogeneización necesario en función del método de homogeneización que utilice. Se puede utilizar una prueba colorimétrica para comprobar si la mezcla es homogénea. También se puede utilizar una inspección visual. Preferiblemente, se realiza una prueba colorimétrica seguida de una inspección visual para determinar si la mezcla es homogénea.

50 La etapa de homogeneización se puede llevar a cabo a una temperatura entre 2 y 25 °C, preferiblemente entre 2 °C y 8 °C, más preferiblemente a aproximadamente 4 °C.

55 Según una realización de la invención, se puede llevar a cabo una etapa de análisis en la mezcla homogénea obtenida después de la etapa g), antes de que la mezcla se almacene o se liofilice (ver detalles a continuación). Se pueden medir el pH y el pO<sub>2</sub>. Para realizar estas mediciones se utilizan métodos conocidos por los expertos en la técnica. Típicamente, el pO<sub>2</sub> de la mezcla es inferior al 10 %, preferiblemente inferior al 5 %; típicamente el pH está entre 4 y 7, preferiblemente entre 4,5 y 6,5.

60 Preferiblemente, transcurren menos de 76 horas entre el inicio de la etapa a) y el final de la etapa g).

De manera general, el producto final (la mezcla homogénea) cumple con las siguientes especificaciones:  
Aspecto: suspensión coloreada, homogénea, de color amarillo/marrón.

65 Viabilidad: superior al 20 %, preferiblemente superior al 40 % para liofilización.

El número de eventos (de bacterias): mayor que  $10^9$  bacterias/ml.

Diversidad bacteriana: el inverso del índice de Simpson superior o igual a 4. Preferiblemente, el inverso del índice de Simpson de la mezcla de inóculos es superior o igual a 10, más preferiblemente, superior a 15, incluso más preferiblemente, superior a 20.

Generalmente, la mezcla homogénea se transfiere (etapa h) de transferencia) para su almacenamiento o liofilización. Así, la mezcla se puede transferir a bolsas:

- para almacenamiento a una temperatura de aproximadamente  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , preferiblemente a aproximadamente  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para uso de la mezcla más allá de 16 horas, o
- para almacenamiento a una temperatura entre  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $6\text{ }^{\circ}\text{C}$  para uso dentro de aproximadamente 16 horas, o
- para almacenamiento a una temperatura entre  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  para uso de la mezcla dentro de las siguientes cuatro horas. Más allá de cuatro horas a temperatura ambiente, el número de bacterias aumenta y la homogeneidad del inóculo puede reducirse.

De lo contrario, la mezcla homogénea se puede transferir a un dispositivo de liofilización para una liofilización posterior o inmediata.

Según una realización de la invención, se puede llevar a cabo una etapa de análisis i) de la mezcla homogénea obtenida después de la etapa de transferencia, etapa h) de la mezcla homogénea en su lugar de almacenamiento (típicamente una bolsa) o en su lugar de liofilización (típicamente en un dispositivo de liofilización). Específicamente, esta etapa de análisis comprende una inspección visual, mediciones de viabilidad, análisis taxonómico y mediciones de número de eventos/ml. El propósito de esta etapa de análisis es determinar si la muestra cumple con los criterios cualitativos para su uso en la terapia TMF.

Típicamente, la mezcla tiene un color amarillo/marrón. Típicamente, la viabilidad debe ser  $>20\%$ . Según una realización de la invención, la viabilidad es preferiblemente  $>40\%$ . Si la mezcla se va a liofilizar, es preferible que la viabilidad sea  $>40\%$ . En general, la concentración celular medida por citometría de flujo es superior a  $10^6$ , preferiblemente, mayor que  $10^7$  bacterias/ml, y más preferiblemente mayor que  $10^9$  bacterias/ml. En términos de análisis taxonómico, en general es preferible que el índice de Shannon sea superior a 3,5, preferiblemente superior a 4.

Los solicitantes han demostrado la buena calidad de la mezcla resultante del procedimiento según una realización de la invención. Los resultados de una evaluación cualitativa del procedimiento según una realización de la invención, realizada con seis heces frescas de donantes sanos, se muestran en el Ejemplo 1. Se realizaron pruebas de viabilidad de la microbiota en cada inóculo antes de la etapa f) de agrupamiento y después de la etapa g) de homogeneización.

Los solicitantes comprobaron que la mezcla homogénea formada por los inóculos agrupados tenía una viabilidad bacteriana propia, y que es superior a la que cabría esperar.

La Figura 2 es un histograma que representa el porcentaje de viabilidad de la microbiota de los inóculos del Ejemplo 1 (inóculo 1, 4, 5, 6 y 2 + 8) y de la mezcla de inóculos (mezcla homogénea) en las bolsas 1 a 15 de inóculos destinadas a ser almacenadas. La Figura 2 demuestra que los inóculos individuales (inóculo 1, 4, 5, 6, 2 + 8) no tienen la misma viabilidad individual, pero que la mezcla de inóculos tiene su propia viabilidad, diferente a la de los inóculos individuales. Además, el procedimiento según la invención garantiza una buena reproducibilidad de las bolsas de mezcla finales, ya que la viabilidad de la microbiota es aproximadamente la misma para cada bolsa (más del  $40\%$ ).

Un análisis estadístico de las bolsas de mezcla homogénea indica que no hay diferencia significativa según una prueba t y según una prueba de rango, ni para la viabilidad de la microbiota ni para el número de eventos/ $\mu\text{l}$ . Así, los solicitantes han demostrado que todas las bolsas de mezcla preparadas son homogéneas entre sí.

En el Ejemplo 2 se muestran los resultados de una evaluación cualitativa del procedimiento, según una realización de la invención, realizado con cuatro lotes diferentes (Lote n.º 1 a Lote n.º 4) de heces frescas de donantes sanos. El Lote n.º 4 es el mismo que se usó para el Ejemplo 1 (e ilustrado en la Figura 2). En el Ejemplo 2, el número de donantes es 2, 7, 4 y 6 para el lote n.º 1, lote n.º 2, lote n.º 3 y lote n.º 4, respectivamente. Los solicitantes midieron la viabilidad y la diversidad bacteriana de los inóculos individuales (al final de la etapa e)), de los inóculos agrupados homogeneizados (al final de la etapa g)) y de las bolsas llenas antes del almacenamiento.

La Figura 3 demuestra además que los inóculos individuales varían, pero la mezcla de inóculo tiene su propia viabilidad, diferente del inóculo individual. La viabilidad de los lotes n.º 1 a 4 está entre  $46,1\%$  y  $60,1\%$ , lo cual es excelente.

- La Figura 4a demuestra la riqueza de las muestras. Se calculó el coeficiente de variación (CV) para cada inóculo. El CV (coeficiente de variación o desviación relativa) es una medida de dispersión de datos alrededor de la media. Este es el cálculo de la relación entre la desviación estándar y la media. El CV permite calcular el grado de variación de una muestra a otra. Cuanto menor sea el valor de CV, más homogéneos o estables serán los valores. El CV de los inóculos individuales de los cuatro lotes varía entre el 16 % y el 81 %. Esta diferencia es normal porque se sabe que la microbiota individual es muy diferente. Para cada inóculo agrupado (al final de la etapa g)), el coeficiente de variación, por lote, está entre 0,3 % y 2 %. Esta baja variación indica que la mezcla de inóculos para cada lote es homogénea y estable.
- La riqueza medida a nivel de especie o género es significativamente mayor en los inóculos agrupados, en comparación con los inóculos individuales. En promedio, la riqueza aumenta un 64 % en el lote n.º 4 y un 147 % en los lotes n.º 1 y 3 en comparación con los inóculos individuales.
- En promedio, la riqueza medida a nivel de género del inóculo agrupado aumenta en un 25 % para el lote n.º 4 y en un 61 % para los lotes n.º 1 y 3 en comparación con los inóculos individuales. La riqueza de los lotes 1 a 4 es sorprendente y no puede deducirse de la riqueza individual de cada inóculo; es decir que esta riqueza de las mezclas de inóculos (los inóculos agrupados) no es el promedio, ni directo ni ponderado por la masa de los inóculos individuales, ni siquiera por fracción de las riquezas individuales medidas. Este resultado es inesperado.
- Se midió el porcentaje de proteobacterias presentes en los cuatro inóculos agrupados (ver Tabla 5). Los valores son 5,5 %, 3,7 %, 3,1 % y 3,4 % para los lotes n.º 1, 2, 3 y 4 respectivamente.
- En conclusión, la agrupación de inóculos da como resultado un aumento inesperado en la riqueza de la microbiota. Así, la mezcla de inóculos es una muestra de microbiota fecal con características propias.
- La Figura 4b demuestra que el procedimiento implica la estandarización de los productos (mezcla homogénea) obtenidos para un lote y destinados a su uso en la clínica. La figura demuestra que la similitud de Bray Curtis entre las bolsas (que contienen el inóculo agrupado) para cada lote es superior al 96 %. Este resultado muestra que, en términos de perfil taxonómico, las bolsas de inóculo (la mezcla homogénea) son homogéneas.
- La diversidad bacteriana se midió utilizando el inverso del índice de Simpson y el índice de Shannon (Tabla 5).
- Los resultados indican que el inverso del índice de Simpson para donantes varía entre 5 y 30. Esta diferencia es normal ya que cada microbiota es diferente. A partir de los datos presentados en la Tabla 5, se puede observar que el inverso del índice de Simpson para el inóculo agrupado está entre 20,2 y 27,2. La diversidad bacteriana del inóculo agrupado (después de la etapa g)) es mayor que la de los donantes individuales (con la excepción del lote n.º 3 donde la diversidad de un donante es mayor que la del inóculo agrupado).
- El índice de Shannon está entre 2,4 y 4,2 para los donantes. Esta diferencia es normal ya que cada microbiota es diferente. El índice de Shannon para el inóculo agrupado está entre 4 y 4,50 (ver Tabla 5).
- También podemos observar que para cada lote la diversidad del inóculo agrupado es mayor que la de los donantes individuales. Los valores obtenidos, en cuanto a las riquezas, no se pueden predecir y cada uno constituye una característica específica de la mezcla homogénea.
- Los inventores han realizado ensayos comparativos para demostrar que, en general, la mezcla de inóculos susceptibles de obtenerse según el método de la invención presenta características ventajosas respecto a las muestras de microbiota fecal obtenidas según métodos conocidos, y en particular, métodos con donantes múltiples. Así, en el Ejemplo 3 se describe cómo los inventores caracterizaron muestras producidas según el método descrito en la técnica anterior [Paramsothy S., y otros (2017), Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial, *Lancet*, Mar 25; 389(10075): 1218-1228] y cómo los compararon con los producidos según una realización de la invención. Los dos métodos de producción se describen en la Figura 5. Las muestras producidas según una realización de la invención tenían mejor viabilidad y mejor diversidad en comparación con las producidas según el método de la técnica anterior.
- Se midió la viabilidad del producto. La viabilidad del inóculo agrupado según una realización de la invención cambia del 41,8 % en promedio en 5 muestras al 41,4 % después de un mes de almacenamiento a -80 °C +/- 10°C. Las muestras obtenidas según el método de Paramsothy y otros evoluciona de 38,5 % en promedio a 37,5 %. Este cambio de viabilidad no es significativo según la prueba de Wilcoxon con valores de p de 0,462 para las muestras según la invención y un valor de p de 0,1732 para las muestras de referencia (según Paramsothy y otros).
- Sin embargo, la prueba de Wilcoxon muestra una diferencia significativa entre la viabilidad entre los dos grupos de muestras en T0 (día 0), con un valor de p igual a 0,01193, así como al mes (p=0,007937).

Además, el coeficiente de variación (CV) para las muestras preparadas según el método de la invención a los 0 días es 0,010 en comparación con 0,034 para muestras de referencia según la técnica anterior (Paramsothy y otros). Al mes, el CV de las muestras preparadas según el método de la invención es de 0,018 en comparación a 0,028 para las muestras de referencia. En cuanto al Ejemplo 1, los inventores demostraron que las muestras producidas para el Ejemplo 2 tienen una variación muy baja lo que indica que la mezcla de inóculos para cada lote es homogénea y estable. En comparación, las muestras de referencia muestran un CV más importante.

Los inventores analizaron la diversidad microbiana de las muestras del Ejemplo 3 analizando el ADNr 16S de las muestras. La diversidad se expresa con el inverso del índice de Simpson que tiene en cuenta tanto la riqueza (el número de OTU/especies identificadas) como su abundancia relativa respectiva.

La Figura 6 muestra valores del inverso del índice de Simpson entre 30,96 y 33,69 (mediana = 32,56) para las muestras preparadas según una realización de la invención y entre 13,70 y 23,18 (mediana = 19,31) para las muestras de "Referencia" preparadas según Paramsothy y otros. La diversidad observada es por tanto superior en las muestras preparadas según una realización de la invención. Las muestras preparadas según una realización de la invención también presentan una mejor homogeneidad que las muestras de "Referencia", lo que es atestiguado por el coeficiente de variación del 2,7 % para las primeras frente al 16,1 % para las segundas. La prueba de rango evalúa una diferencia "muy altamente significativa" entre los dos métodos ( $p < 2,2 \times 10^{-16}$ ).

La Figura 7 muestra la abundancia relativa de las 10 familias bacterianas más presentes en dos grupos de muestras del Ejemplo 3. Las muestras Inv-01 a Inv-10 presentaron una homogeneidad significativamente mejor en comparación con las muestras Ref-01-Ref-10 producidas según un método de la técnica anterior, Paramsothy y otros. Aunque visual, esta representación nos permite observar el nivel de heterogeneidad generada por el método de Paramsothy y otros, así como las diferencias en abundancia para ciertas familias entre los dos métodos.

Las diferencias en homogeneidad, diversidad y abundancia ocurren en diferentes niveles de la escala taxonómica. Además, como se muestra en la Tabla 6 del Ejemplo 3, los inventores observaron que ciertas especies bacterianas, reconocidas como favorables para la salud, se conservan mejor en las muestras Inv-01 a Inv-10 en comparación con las muestras Ref-01-Ref-10. Por ejemplo, para el filo Actinobacteria, la abundancia relativa disminuye de manera muy significativa utilizando el método según Paramsothy y otros ya que esta abundancia mediana es del 3,6 % para las muestras Inv-01-Inv-10 en comparación con el 0,9 % para las muestras Ref-01 a Ref-10. En términos de homogeneidad, los inventores observaron coeficientes de variación respectivos del 7,8 % y del 14,5 %. Además, en la Figura 7, se observa una disminución significativa en la abundancia relativa de las Coriobacteriaceae, familia del filo de Actinobacteria, entre las muestras de la invención y las muestras de referencia.

Se observan resultados similares a nivel de género *Prevotella* (género vinculado al filo de las Bacteroidetes) y confirman las diferencias tanto en el mantenimiento de determinados taxones como en términos de homogeneidad de los dos métodos. La abundancia relativa de *Prevotella* es mayor en las muestras Inv-01-Inv-10 (mediana del 13 %) en comparación con las muestras Ref-01 a Ref-10 (mediana del 11%). En términos de homogeneidad, los inventores observaron coeficientes de variación respectivos del 3,3 % y del 8,5 %.

Finalmente, el género *Bifidobacterium* (perteneciente a las Actinobacterias) también confirma los resultados ya observados en otros niveles taxonómicos. *Bifidobacterium* ve disminuir significativamente su abundancia relativa (0,9 % vs 0,6 %) y la homogeneidad entre las muestras generadas por el método de Paramsothy y otros es menos importante que para los generados por el método según una realización de la invención (ver Tabla 6 del Ejemplo 3).

Por lo tanto, estos elementos muestran que, en general, el método reivindicado permite una mejor conservación de este filo asociado con una homogeneidad mucho mejor en las muestras producidas para cada lote, especialmente las muestras producidas según una realización de la invención en comparación con las producidas según el método de la técnica anterior. Esta mejor homogeneidad es esencial para la caracterización del producto final como producto farmacéutico. Así, un paciente que recibe varias muestras de microbiota fecal del mismo lote, recibe cada vez un producto homogéneo que tiene la misma diversidad y la misma viabilidad microbiana. Esta reproducibilidad está garantizada gracias al método utilizado para producir las muestras.

En conclusión, el análisis metagenómico (secuenciación del ADNr 16S) del Ejemplo 3 permitió demostrar que las muestras obtenidas según una realización de la invención presentaban:

- una mejor conservación de la diversidad ilustrada por el inverso del índice de Simpson muy superior,
- una conservación significativamente superior de ciertos taxones de interés como Actinobacterias, que incluye el género bien conocido *Bifidobacterium*,

- un mayor nivel de homogeneidad entre muestras en comparación con el obtenido para todas las muestras producidas con el método según Paramsothy y otros.

El método según la invención, en general, tiene una mejor reproducibilidad en comparación con el de la técnica anterior, lo cual es muy importante para un proceso destinado a la fabricación de medicamentos, para el cual la noción de un lote homogéneo y reproducible es la base de la reglamentación. Los valores de riqueza medidos para los diferentes lotes (ver Figura 9) muestran efectivamente una gran reproducibilidad entre lotes con un coeficiente de variación del 3,5 %. Por tanto, estos resultados demuestran que existe homogeneidad de la microbiota fecal entre lotes, así como dentro de los lotes. Los inventores observaron que la mezcla de inóculos así obtenida tiene un perfil taxonómico y una viabilidad bacteriana superiores a los de ciertos inóculos individuales, lo que implica que es perfectamente adecuada para su uso en la TMF (Transferencia de Microbiota Fecal) alogénica. La mezcla de inóculos obtenida según el procedimiento de la invención es superior en calidad para su uso en la TMF porque se caracteriza por una viabilidad alta y estable, así como por una diversidad muy alta. Estas características permiten un mayor potencial de recolonización de microbiota adaptada en comparación con lo que se obtendría utilizando un inóculo individual.

Según un modo de realización preferido de la invención, el procedimiento de preparación de muestras de microbiota permite obtener una mezcla homogénea de microbiota que comprende 15 géneros bacterianos productores de butirato, a saber, *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Alistipes*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Odoribacter*, *Roseburia*, *Holdemanella*, *Anaerostipes*, *Oscillibacter*, *Subdoligranulum* y *Butyrivibrio*. Esta realización se ilustra en el Ejemplo 4.

El Ejemplo 4 describe los experimentos destinados a obtener mezclas homogéneas de heces de ocho donantes que cumplieron los criterios de selección (etapa c)). Cada materia fecal que pasó el control de calidad se trató por separado añadiendo diluyente crioprotector y luego se filtró. A continuación, se mezclaron los inóculos individuales obtenidos el mismo día para obtener lotes de productos homogéneos.

El análisis de las heces de los donantes y de los lotes de mezclas producidas muestra que la concentración de los 15 géneros bacterianos mencionados anteriormente que producen butirato es estable en las mezclas, independientemente del número de heces utilizadas para producirlo. El análisis también muestra que la abundancia de estos 15 géneros bacterianos productores de butirato se estandariza cuando aumenta el número de heces utilizadas (Figura 8 y Tabla 7). Además, no todos los 15 géneros bacterianos productores de butirato se encuentran en las heces de donantes individuales, mientras que todos los lotes elaborados con una mezcla de al menos cuatro heces los contienen todos.

Según una realización preferida de la invención, el procedimiento para preparar una mezcla homogénea de microbiota fecal proviene de al menos cuatro donantes. Según una realización preferida de la invención, la mezcla homogénea de microbiota comprende los siguientes 15 géneros bacterianos productores de butirato, a saber, *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Alistipes*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Odoribacter*, *Roseburia*, *Holdemanella*, *Anaerostipes*, *Oscillibacter*, *Subdoligranulum* y *Butyrivibrio*.

La presencia de los 15 géneros bacterianos productores de butirato antes mencionados en el producto destinado a ser administrado al paciente es importante porque estos géneros bacterianos están asociados con propiedades antiinflamatorias. Así, desde un punto de vista terapéutico, su presencia en mezclas homogéneas resulta ventajosa para la utilización de estas mezclas homogéneas en el tratamiento de la inflamación intestinal, en particular la asociada a la disbiosis intestinal.

La mezcla homogénea se puede producir fácilmente de manera fiable y reproducible. Los resultados del Ejemplo 1 muestran homogeneidad de viabilidad y perfil taxonómico entre todas las bolsas de mezcla producidas. La calidad de la muestra de microbiota (la mezcla homogénea) administrada es reproducible e idéntica entre bolsas provenientes de un grupo de donantes. Con cada bolsa se puede administrar un producto casi idéntico. De este modo, el paciente puede recibir el mismo producto durante varios tratamientos, si es necesario más de un tratamiento.

En general,  $n$  donantes pueden dar suficiente mezcla homogénea para llenar aproximadamente  $3n$ , preferiblemente  $3,2n$  bolsas, donde cada saber, bolsa es suficiente para un tratamiento de TMF.

La mezcla homogénea de microbiota (o inóculos agrupados) puede utilizarse en el tratamiento de la disbiosis intestinal y patologías asociadas. Representa de hecho el principio activo. La diversidad bacteriana del inóculo agrupado, producido con el procedimiento de la invención, es alta, pudiendo tener un índice de Shannon entre 4 y 4,50, y un inverso del índice de Simpson situado entre 20,2 y 27,2. Los solicitantes han demostrado también que los inóculos individuales tienen viabilidades muy variadas, pero que la mezcla de inóculos (inóculos agrupados) tiene una viabilidad excelente (de aproximadamente 41 % a 60 %). Según una realización de la invención, la mezcla homogénea de inóculos tiene una viabilidad superior al 40 %, preferiblemente superior al 45 % y, más preferiblemente, superior al 50 %, incluso más preferiblemente, superior al 55 %. Los criterios de

diversidad bacteriana y viabilidad son muy importantes en la evaluación de la calidad de un producto para la TMF.

También es importante que los productos sean homogéneos, según criterios regulatorios para productos farmacéuticos. Los datos de los ejemplos siguientes demuestran que los productos según la invención son homogéneos.

Según una realización de la invención, la mezcla homogénea de microbiota (o inóculos agrupados) puede administrarse por vía rectal. Según una realización de la invención, la mezcla homogénea de microbiota (o inóculos agrupados) puede formularse para administración oral. Como formulación oral, se pueden mencionar las formulaciones mencionadas en la solicitud de patente EP 17306602.8.

Como se mencionó anteriormente, los estudios muestran que la TMF puede ser eficaz en el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped (GvHD). Así, la mezcla homogénea de microbiota de la invención se puede utilizar en el tratamiento de la GvHD. Además, la presencia de los 15 géneros bacterianos productores de butirato antes mencionados puede contribuir a la eficacia del tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped (GvHD). Así, según una realización de la invención, un paciente que padece GvHD puede recibir una TMF alogénica que comprende la mezcla homogénea de la invención. Por ejemplo, el paciente puede recibir una TMF alogénica por vía rectal. También puede recibirlo oralmente.

La mezcla homogénea de microbiota se puede utilizar en el tratamiento de disbiosis intestinal iatrogénica y/o patologías y complicaciones asociadas, incluidas inflamación intestinal y diarrea. Además, la presencia de los 15 géneros bacterianos mencionados anteriormente que producen butirato con efecto antiinflamatorio puede contribuir a la eficacia del tratamiento.

La mezcla homogénea de microbiota se puede utilizar en el tratamiento de la infección por *Clostridium difficile* y la diarrea asociada (CDI), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), síndrome del intestino irritable (IBS), estreñimiento idiopático, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, obesidad y obesidad mórbida, autismo, esclerosis múltiple, diarrea del viajero, enfermedad de Parkinson, diabetes tipo II, alergias alimentarias, cáncer, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia y trastornos bipolares, disbiosis intestinal asociada a quimioterapia contra el cáncer o a una inmunoterapia y enfermedades hepáticas alcohólicas y no alcohólicas.

La mezcla homogénea de microbiota se puede utilizar en el tratamiento de complicaciones debidas a la hospitalización en cuidados intensivos.

La invención se describe con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Se apreciará que la invención tal como se reivindica no pretende estar limitada de ninguna manera por estos ejemplos.

## Ejemplos

Ejemplo 1:

Etapas a) y b): Se recogieron ocho heces frescas de seis donantes sanos en el dispositivo médico descrito en WO2016/170290, luego se conservaron a +2 °C/+8 °C durante un período de 72 horas, durante las cuales se llevaron a cabo controles cualitativos (etapa c)). Según los resultados de estos controles, las heces de los donantes 3 y 7 fueron rechazadas.

Las heces 1, 4, 5, 6 y 2 + 8 se transformaron por separado en un inóculo líquido añadiendo diluyente crioprotector (solución salina acuosa que contiene una mezcla de maltodextrina y trehalosa de hasta 20 %) y se clarificaron a través de un filtro (265 µm). Las heces 2 y 8 se combinaron para formar un inóculo dadas las bajas cantidades de heces recolectadas.

Se probó la viabilidad de los inóculos 1, 4, 5, 6 y 2 + 8 (cinco inóculos). Luego los inóculos individuales se transfirieron a una bolsa flexible de 5L utilizando una bomba peristáltica. Seguidamente, la bolsa se colocó en una placa de agitación en una incubadora refrigerada a 4 °C y la mezcla del inóculo se llevó a cabo a 125 rpm +/- 5 % durante 30 minutos.

Una vez completada la homogeneización, la mezcla de inóculo se transfirió a una serie de 15 bolsas adecuadas para liofilización y se conservaron a -80 °C. Se probaron la viabilidad y el impacto del almacenamiento en diferentes condiciones de la mezcla homogénea para cada una de las 15 bolsas antes del almacenamiento.

Análisis de viabilidad:

Las pruebas de viabilidad se realizaron usando la tecnología de citometría de flujo utilizando un citómetro Accuri 6 (BD Science). Las muestras se diluyeron en solución salina acuosa al 0,9 %, con dilución en serie 1: 10, hasta 1: 10<sup>-3</sup>. Las muestras se marcaron con fluoróforos yoduro de propidio (PI) (10 µl/ml) y SYTO9<sup>®</sup> 9 (3 µl/ml). El

PI también se dirige al ADN, pero sólo ingresa a las células con membranas dañadas; emite a 635 nm (rojo) después de la excitación a 470 nm. El SYTO9<sup>®</sup> penetra en todas las células, intactas o no, se une al ADN y emite a 540 nm (verde) después de una excitación a 470 nm (láser azul). Las muestras de heces, inóculo o mezclas homogéneas se marcan con la mezcla de los dos fluoróforos antes de ser analizadas mediante citometría de flujo. El porcentaje de bacterias vivas comparado con el número de bacterias totales (vivas y muertas) permite obtener la viabilidad bacteriana de la muestra. Cada lote del análisis se validó con un control positivo (muestra de inóculo de referencia conservada a -80 °C) y un control negativo (muestra de referencia conservada a -80 °C y tratada por incubación durante 10 minutos en 70 % de isopropanol (proporción 1:9), se centrifugó, se resuspendió en 0,9 % de NaCl y se diluyó en series de diluciones 10 veces hasta 10<sup>-3</sup>).

Resultados:

La evaluación de la viabilidad de los inóculos individuales varía de 30,5 % a 67,6 %. Las 15 bolsas preparadas con las mismas mezclas de inóculos mostraron una viabilidad promedio de 47,1 % con una desviación estándar de 1,98. Los porcentajes de viabilidad de la microbiota de los inóculos individuales (inóculo 1, 4, 5, 6 y 2 + 8, de color gris claro) y la mezcla de inóculo en la bolsa de almacenamiento 1 a 15 (de color negro) se muestran en la Figura 2.

Los resultados resumidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Resumen de la viabilidad de la microbiota del inóculo alogénico analizado Análisis estadístico:

Análisis	Viabilidad (%)
Promedio	47,1
Desviación estándar	1,98
Mín.	44,3
Máx.	51,4

Se midió la viabilidad y el número de eventos de las 15 bolsas de mezcla homogénea. Para evaluar si estas dos mediciones eran homogéneas entre las bolsas, se realizó una asignación aleatoria de mediciones al Grupo A para 7 bolsas y al Grupo B para las bolsas restantes 500 veces.

Para cada iteración, se utilizaron una prueba t y una prueba de rango para comparar el Grupo A con el Grupo B. Los resultados finales presentados a continuación corresponden a la proporción de iteraciones donde la prueba estadística considerada no fue significativa (> 0,1). La conclusión es que las bolsas son homogéneas en cuanto a viabilidad y en cuanto al número de eventos/μl.

Tabla 2: Resultados estadísticos

Prueba	Viabilidad	Número de eventos/μl
Proporción de iteraciones donde la prueba t no es significativa	93,4 %	95,4 %
Proporción de iteraciones en las que la prueba de clasificación no es significativa	95,4 %	96,8 %

Los resultados muestran que no hay diferencia significativa para la prueba t y la prueba de rango, ni para la viabilidad de la microbiota ni para el número de eventos/μl.

Se puede concluir que las 15 bolsas de mezcla preparadas son homogéneas entre sí.

Conservación:

Durante el procedimiento de preparación de la mezcla se debe realizar un almacenamiento intermedio mientras se realizan los controles cualitativos. Para determinar el impacto de este almacenamiento intermedio sobre la viabilidad de la microbiota se realizó una evaluación:

- condición de control: una vez preparado, el inóculo se conserva instantáneamente a -80 °C.
- condiciones de conservación a temperatura ambiente: una vez preparado, el inóculo se deja a temperatura ambiente durante 16 horas, se realiza un muestreo para determinar la viabilidad de la microbiota, los eventos de microbiota/μl y la medición de pH y pO<sub>2</sub>, luego el inóculo se conserva a -80 °C.
- condición de conservación a 4 °C: una vez preparado, el inóculo se conserva a 4 °C durante 16 horas, se realiza muestreo para determinar la viabilidad de la microbiota, los eventos de microbiota/μl y la medición de pH y pO<sub>2</sub>, luego el inóculo se conserva a -80 °C.

Luego, se descongelan los tres inóculos y se mide la viabilidad de la microbiota.

Los datos muestran que la viabilidad media de la microbiota es la misma para el inóculo conservado durante 16 horas a temperatura ambiente o a 4 °C. Después de la descongelación, la viabilidad media de la microbiota disminuyó tanto para el inóculo conservado a 4 °C como para el conservado a temperatura ambiente. Se espera que la viabilidad disminuya después de la congelación. Aquí se constata que en ambos casos (4 °C y temperatura ambiente), se observa el mismo fenómeno.

Se puede observar que el número de eventos/μl es el mismo para el inóculo y para el inóculo conservado a 4 °C, pero, como era de esperar, aumenta para el inóculo conservado a temperatura ambiente. La misma observación se hace después de descongelar el inóculo.

Todos estos resultados muestran que el almacenamiento durante 16 horas no tiene impacto en la viabilidad de la microbiota cuando se conserva a 4 °C o temperatura ambiente; el número de eventos/μl aumenta a temperatura ambiente, lo que indica que la microbiota está evolucionando, mientras que a 4 °C la microbiota está en estado latente. Los resultados de las mediciones de pH y pO<sub>2</sub> se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Resultados de las mediciones de pH y pO<sub>2</sub>

Muestra	pH	pO <sub>2</sub> (%)
Inóculo	6,33	1,4
Conservación durante 16 horas a temperatura ambiente.	5,34	4,3
Conservación durante 16 horas a 4 °C	6,28	1,6
Indicador de descongelación	6,55	1,5
Descongelación del inóculo conservado a temperatura ambiente durante 16 horas.	5,29	3,7
Descongelación del inóculo conservado a 4 °C durante 16 horas.	6,23	1,3

Estos resultados muestran que la conservación durante 16 horas no tiene impacto sobre el pH y el pO<sub>2</sub> del inóculo almacenado a 4 °C.

Ejemplo 2:

Usando casi las mismas condiciones que para el Ejemplo 1, el procedimiento se llevó a cabo en cuatro lotes (del lote n.º 1 al lote n.º 4) de muestras de microbiota fecal, con 2, 8, 4 y 6 donantes para el lote n.º 1, lote n.º 2, lote n.º 3 y lote n.º 4 respectivamente. El lote n.º 4 corresponde al lote del Ejemplo 1. Así, para el lote n.º 4, dos de las seis heces se combinaron para formar un inóculo dadas las pequeñas cantidades de heces recolectadas.

Las heces se transformaron por separado en un inóculo líquido añadiendo diluyente crioprotector (solución salina acuosa que contiene una mezcla de maltodextrina y trehalosa hasta 20 %) y se clarificaron a través de un filtro (265 μm).

Se probó la viabilidad y el perfil taxonómico de los inóculos. Luego los inóculos individuales se transfirieron a una bolsa flexible de 3 l o 5 l utilizando una bomba peristáltica. Luego la bolsa se colocó en una placa de agitación en una incubadora refrigerada a 4 °C y el mezclado del inóculo se llevó a cabo a 130 rpm +/- 5 % durante 30 minutos en una incubadora a 4 °C.

Una vez completada la homogeneización, para cada lote, la mezcla de inóculo se transfirió a una serie de bolsas aptas para congelar y se conservaron a -80 °C. La viabilidad y el perfil taxonómico de las mezclas homogéneas se probaron antes del almacenamiento. Para el lote n.º 1 se recolectaron 2 heces y se llenaron 5 bolsas. Para el lote n.º 2 se recolectaron 8 heces y se llenaron 29 bolsas. Para el lote n.º 3 se recolectaron 5 heces y se llenaron 21 bolsas. Para el lote n.º 4 se recolectaron 6 heces, se combinaron 2 heces para tener material suficiente para formar un inóculo y se llenaron 15 bolsas.

Análisis de viabilidad:

Las pruebas de viabilidad se llevaron a cabo como en el Ejemplo 1.

Análisis metagenómico:

El ADN genómico se extrajo de las muestras con el kit NucleoSpin Soil (Machery Nagel). Se construyó un banco de secuenciación para cada muestra con el kit MyTaq HS-Mix (Bioline). Luego, los bancos se secuenciaron en una ejecución MiSeq V3 2x300 pb.

Tras el control de calidad de las secuencias demultiplexadas con Trimmomatic [Bolger y otros, (2014) 'Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data', Bioinformatics, 30(15), pp. 2114-2120. doi:

10.1093/bioinformatics/btu170], las secuencias humanas se eliminaron utilizando el software Bowtie2 (Langmead, Ben y Salzberg, (2013) 'Fast gapped-read alignment with Bowtie2', Nature methods, 9(4), pp. 357-359. doi: 10.1038/nmeth.1923.Fast). Para permitir la comparación de datos, el número de secuencias se normalizó a 60 000 secuencias por muestra. La agrupación de secuencias se realizó con VSEARCH y luego la asignación taxonómica se realizó utilizando la base de datos Silva 128. Los análisis taxonómicos y las mediciones de diversidad se realizaron con el software R (R Core Team 2015, versión 3.4.4, <http://www.R-project.org>). Para las mediciones de diversidad, se realizaron 20 submuestras de 60 000 secuencias para cada muestra y se midió la mediana.

10 Resultados:

Viabilidad:

15 La Tabla 4, a continuación, muestra la viabilidad de los lotes. La evaluación de la viabilidad de los inóculos individuales varía de 16,8 % a 67,6 %. La viabilidad de los lotes de inóculos agrupados se da en la siguiente Tabla y está entre 46,1 y 60,2 %.

Tabla 4

Análisis	Lote n.º 1	Lote n.º 2	Lote n.º 3	Lote n.º 4
Número de donantes	2	7	4	6
Promedio (%)	60,2	46,1	53,2	47,1
Desviación estándar	1,2	1,1	2,1	2,0
Mín.	59,4	45,0	50,6	44,3
Máx.	61,6	48,3	58,2	51,4

La Tabla 5 a continuación muestra los resultados.

Tabla 5

Análisis	Inverso del índice de Simpson	Shannon	Proteobacterias
Lote n.º 1	Donante 1	17,68	3,8
	Donante 2	8,23	2,6
	Mezcla de inóculos	20,2	4
Lote n.º 2	Donante 1	17,4	3,9
	Donante 2	7,5	3
	Donante 3	16,4	3,5
	Donante 4	16,3	3,48
	Donante 5	26	3,8
	Donante 6	12,4	3,4
	Donante 7	22,07	4
	Mezcla de inóculos	26,2	4,3
Lote n.º 3	Donante 1	21,06	3,98
	Donante 2	29,15	4,1
	Donante 3	20,28	3,7
	Donante 4	6,5	2,5
	Mezcla de inóculos	27,2	4,3
Lote n.º 4	Donante 1	12,3	3,59
	Donante 4	16,37	4,1
	Donante 5	21,37	3,48
	Donante 6	16,71	4
	Donante 2+ Donante 8	25,12	3,52
	Mezcla de inóculos	26,4	3,27

55 Ejemplo 3:

Este estudio tiene como objetivo comparar dos métodos de preparación de muestras de microbiota fecal de múltiples donantes:

- 60 - el método descrito en el Ejemplo 2 y
- el método de la técnica anterior de Paramsothy y otros [Paramsothy S., y otros (2017), Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial, Lancet, Mar 25; 389(10075): 1218-1228]. La Figura 5 muestra los dos métodos utilizados.

65 Se realizaron análisis de viabilidad y análisis metagenómicos para comparar la viabilidad de los productos finales obtenidos, así como su homogeneidad taxonómica.

Se recogieron cuatro heces frescas de cuatro donantes sanos cada una en el dispositivo médico descrito en WO2016/170290, luego se conservaron a +2 °C/+8 °C durante un período de 72 horas, durante las cuales se llevaron a cabo controles cualitativos (etapa c)).

5 Las cuatro heces se dividieron en dos fracciones, una destinada al tratamiento según una realización de la invención ("Inv") y la otra según el método de la técnica anterior de Paramsothy y otros ("Ref").

10 Las heces "Inv" se transformaron por separado en un inóculo líquido agregando diluyente crioprotector (solución salina acuosa que contiene una mezcla de maltodextrina y trehalosa hasta 20 %) y se clarificaron a través de un filtro (265 µm).

15 Luego los inóculos individuales se transfirieron a una bolsa flexible de 1l utilizando una bomba peristáltica. Luego la bolsa se colocó en una placa de agitación en una incubadora refrigerada regulada a 4 °C y la mezcla de inóculos se realizó a 125 rpm +/- 5 % durante 30 minutos.

Una vez completada la homogeneización, la mezcla de inóculos se transfirió a una serie de 10 crioviales y se conservó a -80 °C.

20 Las heces "Ref" se mezclaron para obtener un producto visualmente homogéneo, se clarificaron en una solución salina isotónica (0,9 % de NaCl) y luego se filtraron. Luego se añadió 10 % de glicerol a la preparación para su almacenamiento. Luego, la muestra así producida se transfirió a una serie de 10 crioviales y se conservó a -80 °C.

25 La viabilidad y el análisis metagenómico 16S se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados se comentan en el texto siguiente.

La Tabla 6 a continuación muestra la abundancia relativa de Actinobacteria, *Prevotella* y *Bifidobacterias* en las muestras "Inv" y "Ref".

30

Tabla 6

	Abundancia relativa		Coeficiente de variación		Prueba de rango de Wilcoxon
	Inv	Ref	Inv	Ref	
Actinobacterias	3,6 %	0,9 %	7,8 %	14,5 %	1,083 <sup>e</sup> -5
Prevotella	13 %	11 %	3,3 %	8,5 %	2,057 <sup>e</sup> -4
Bifidobacterias	0,9 %	0,6 %	12,4 %	13,9 %	1,083 <sup>e</sup> -5

35

Ejemplo 4:

40 Se realizó una campaña de producción encaminada a la obtención de mezclas homogéneas de heces tal como se describe en el Ejemplo 1. Las heces de 8 donantes que cumplían los criterios de selección de la etapa c) se recogieron diariamente durante un período de 5 semanas. Las heces se transformaron por separado en un inóculo líquido añadiendo diluyente crioprotector (solución salina acuosa que contiene una mezcla de maltodextrina y trehalosa hasta 20 %) y se clarificaron a través de un filtro (265 µm).

45 Luego los inóculos individuales obtenidos el mismo día se mezclaron para obtener lotes de productos homogéneos.

Extracción de ADN, secuenciación metagenómica y análisis bioinformático

50 El ADN genómico se extrajo de las mezclas de heces con el kit Nucleospin Soil (Macherey Nagel). Se construyó un banco de secuenciación para cada muestra de ADN genómico utilizando el kit TruSeq (Illumina) según las recomendaciones del proveedor. Luego, los bancos se secuenciaron simultáneamente en "extremo emparejado" en una ejecución HiSeq2500 (Illumina).

55 Tras el control de calidad de las secuencias demultiplexadas con Trimmomatic [Bolger y otros, (2014) 'Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data', Bioinformatics, 30(15), pp. 2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170], las secuencias humanas se eliminaron utilizando el software Bowtie2 (Langmead, Ben y Salzberg, (2013) 'Fast gapped-read alignment with Bowtie2', Nature methods, 9(4), pp. 357-359. doi: 10.1038/nmeth.1923.Fast). Para permitir la comparación de datos, el número de secuencias se normalizó a 20 000 000 de secuencias de extremos emparejados por muestra. Luego se realizó la asignación taxonómica con Kraken v.0.10.5-beta (Wood y Salzberg, 2014 'Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments', Genome Biology, 15(3), pp. R46. doi: 10.1186/gb-2014-15-3-r46) utilizando la base de datos genómica RefSeq (septiembre de 2017, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>).

60

65 Resultados:

La Figura 8 muestra la abundancia relativa de los 15 géneros bacterianos productores de butirato, a saber, *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Alistipes*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Odoribacter*, *Roseburia*, *Holdemanella*, *Anaerostipes*, *Oscillibacter*, *Subdoligranulum* y *Butyrivibrio*, en las heces de los donantes (primera barra a la izquierda), luego en los lotes de mezclas homogéneas obtenidas de las heces de 3, 4, 5 y 6 donantes respectivamente. La abundancia relativa de estos géneros es estable en cada lote y se estandariza cuando aumenta el número de heces utilizadas para obtener la mezcla homogénea (ver Tabla 7 a continuación).

Tabla 7: Coeficientes de variación de 15 géneros bacterianos productores de butirato en donantes y en diferentes lotes

Donantes	Lotes de 3 heces	Lotes de 4 heces	Lotes de 5 heces	Lotes de 6 heces
0,376	0,196	0,093	0,086	0,039

Si bien no todos los 15 géneros bacterianos productores de butirato se encuentran en todas las heces individuales, por el contrario, los lotes fabricados con una mezcla de al menos cuatro heces los contienen todos (datos no mostrados).

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de una mezcla homogénea de microbiota fecal proveniente de al menos dos donantes preseleccionados que comprende las siguientes etapas:
  - a. recoger al menos una muestra de microbiota fecal de dichos donantes preseleccionados,
  - b. en un plazo inferior a 5 minutos tras la recogida, colocar la muestra obtenida en a) en un dispositivo de recogida hermético al oxígeno,
  - c. controlar cualitativamente las muestras tomadas y excluir las muestras que no cumplan los criterios cualitativos,
  - d. añadir a cada una de las muestras retenidas después de la etapa de control c) una solución salina acuosa que comprende al menos un agente crioprotector y/o un agente de carga,
  - e. filtrar las muestras obtenidas al final de la etapa d) para formar una serie de inóculos,
  - f. agrupar dichos inóculos para formar una mezcla de inóculos,
  - g. homogeneizar dicha mezcla obtenida en la etapa f), en particular mediante agitación manual o utilizando un dispositivo de agitación, realizándose las etapas b) y d) a g) de forma anaeróbica.
  
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la mezcla homogénea de microbiota fecal proviene de al menos cuatro donantes.
  
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque los donantes son preseleccionados según los siguientes criterios de preselección:
  - i. tener entre 18 y 60 años,
  - ii. tener un índice de masa corporal (IMC) entre 18 y 30,
  - iii. ausencia de antecedentes personales de enfermedades infecciosas graves, trastornos metabólicos y neurológicos o depresión,
  - iv. ausencia de medicación reciente que pueda deteriorar la composición de la microbiota intestinal,
  - v. ausencia de síntomas recientes asociados con enfermedades gastrointestinales, como fiebre, diarrea, náuseas, vómitos, dolor abdominal, ictericia, ausencia de antecedentes de enfermedades infecciosas graves, en particular SIDA, hepatitis, etc.
  - vi. ausencia de viajes recientes a países tropicales
  - vii. ausencia de conductas sexuales de riesgo,
  - viii. ausencia de lesión, perforación reciente y/o tatuaje(s),
  - ix. ausencia de fatiga crónica reciente,
  - x. ausencia de reacción alérgica reciente,
  - xi. opcionalmente tener una dieta diversa.
  
4. Procedimiento según la reivindicación 1, 2 o 3, caracterizado porque los criterios cualitativos de las muestras de la etapa c) incluyen:
  - consistencia de la muestra entre 1 y 6 según la escala de Bristol,
  - ausencia de sangre y orina en la muestra,
  
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque los criterios cualitativos de las muestras de la etapa c) comprenden:
  - ausencia de las siguientes bacterias: *Campylobacter*, *Clostridium difficile* (toxina A/B), *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* sp., *E. coli* productora de toxina similar a Shiga (STEC) stx1/stx2, bacterias multirresistentes, bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLSE), Enterococos resistentes a la vancomicina y a los glicopéptidos (ERV, GRE), *Listeria monocytogenes*, y las bacterias resistentes a los carbapenémicos,
  - ausencia de los siguientes parásitos: *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora* sp., *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Blastocystis hominis*, *Helminths*, *Strongyloides stercoralis*, *Isospora* sp., *Microsporidies* y *Dientamoeba fragilis*,
  - ausencia de los siguientes virus: Adenovirus F40/41, Astrovirus, Norovirus, Rotavirus A, Sapovirus y Picornavirus (Aichivirus y enterovirus),
  - ausencia de las siguientes bacterias: *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) Is/st, *Shigella*/E. coli enteroinvasiva (EIEC) y *Plesiomonas shigelloides*.
  
6. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque los criterios cualitativos de las muestras de la etapa c) comprenden:
  - ausencia de las siguientes bacterias: *Campylobacter*, *Clostridium difficile* (toxina A/B), *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* sp., *E. coli* productora de toxina similar a Shiga (STEC) stx1/stx2,

bacterias multirresistentes, bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLSE), enterococos resistentes a la vancomicina y a los glicopéptidos (ERV, GRE) y *Listeria monocytogenes*,

- 5 - ausencia de los siguientes parásitos: *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora* sp., *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Blastocystis hominis*, *Helminths*, *Strongyloides stercoralis*, *Isospora* sp., *Microsporidies* y *Dientamoeba fragilis*,  
 - ausencia de los siguientes virus: Adenovirus F40/41, Astrovirus, Norovirus, Rotavirus A, Sapovirus y Picornavirus (Aichivirus y enterovirus),  
 10 - ausencia de las siguientes bacterias: *E. coli enteroagregativa* (EAEC), *E. coli enteropatógena* (EPEC), *E. coli enterotoxigénica* (ETEC) Is/st, *Shigella/E. coli enteroinvasiva* (EIEC) y *Plesiomonas shigelloides*.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el al menos un agente crioprotector y/o agente de carga es un poliol, un di-, tri- o polisacárido o su mezcla y un agente de carga.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la solución salina acuosa comprende maltodextrina y trehalosa.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la filtración en la etapa e) se realiza con un filtro que comprende poros con un diámetro inferior o igual a 0,5 mm, preferentemente inferior o igual a 265 µm.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el tiempo entre la recogida de la muestra y el final de la etapa g) es inferior a 76 horas.

11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque la etapa g) de homogeneización se lleva a cabo a una temperatura entre 2 °C y 25 °C, preferiblemente entre aproximadamente 2 y 6 °C, más preferiblemente a aproximadamente 4 °C.

12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque comprende la etapa de transferencia siguiente:  
 h. la transferencia de la mezcla homogeneizada obtenida en la etapa g):

- 35 i. en bolsas de inóculo para almacenamiento a una temperatura de aproximadamente -50 °C a -80 °C, preferiblemente a -80 °C, o para almacenamiento a una temperatura entre aproximadamente 2 a 6 °C para uso de la mezcla dentro de aproximadamente 16 horas, o para almacenamiento a una temperatura entre 10 y 25 °C para uso de la mezcla dentro de aproximadamente 4 horas,  
 40 ii. en un dispositivo de liofilización para liofilización.

13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 12, caracterizado porque la mezcla homogénea de microbiota fecal contiene 15 géneros bacterianos *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Alistipes*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Odoribacter*, *Roseburia*, *Holdemanelia*, *Anaerostipes*, *Oscillibacter*, *Subdoligranulum* y *Butyrivibrio*.

14. Mezcla homogénea de microbiota fecal obtenible según una de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en el tratamiento de la disbiosis intestinal y/o enfermedades asociadas a la disbiosis intestinal mediante trasplante de microbiota fecal alogénica.

15. Mezcla homogénea de microbiota fecal obtenible según una de las reivindicaciones 1 a 13 caracterizada porque la mezcla tiene un inverso del índice de Simpson superior a 15, preferentemente 20.

16. Mezcla homogénea de microbiota fecal obtenible según una de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en el tratamiento de la disbiosis intestinal.

17. Mezcla homogénea de microbiota fecal obtenible según una de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped (GvHD).

18. Mezcla homogénea de microbiota fecal obtenible según una de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en el tratamiento de la disbiosis intestinal iatrogénica y/o patologías y complicaciones asociadas que comprende la inflamación intestinal y la diarrea.

19. Mezcla homogénea de microbiota fecal obtenible según una de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso para el tratamiento de la infección por *Clostridium difficile* y la diarrea asociada (CDI), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), síndrome del intestino irritable (CDI), estreñimiento idiopático, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, obesidad y obesidad mórbida, autismo, esclerosis múltiple, diarrea del

viajero, enfermedad de Parkinson, diabetes tipo II, alergias alimentarias, cáncer, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia y trastornos bipolares, disbiosis intestinal asociada a quimioterapia contra el cáncer o inmunoterapia y enfermedades hepáticas alcohólicas y no alcohólicas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

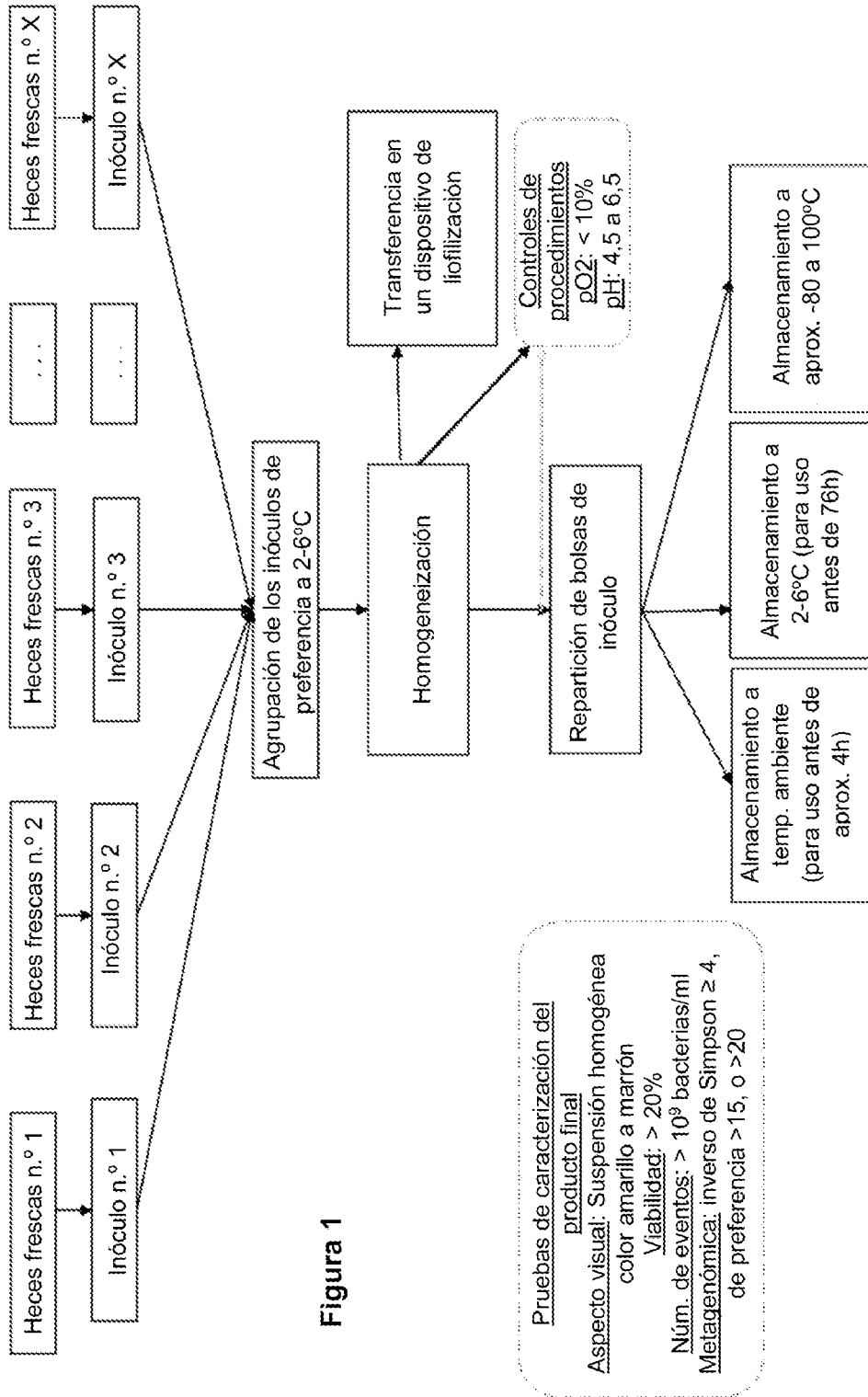


Figura 1

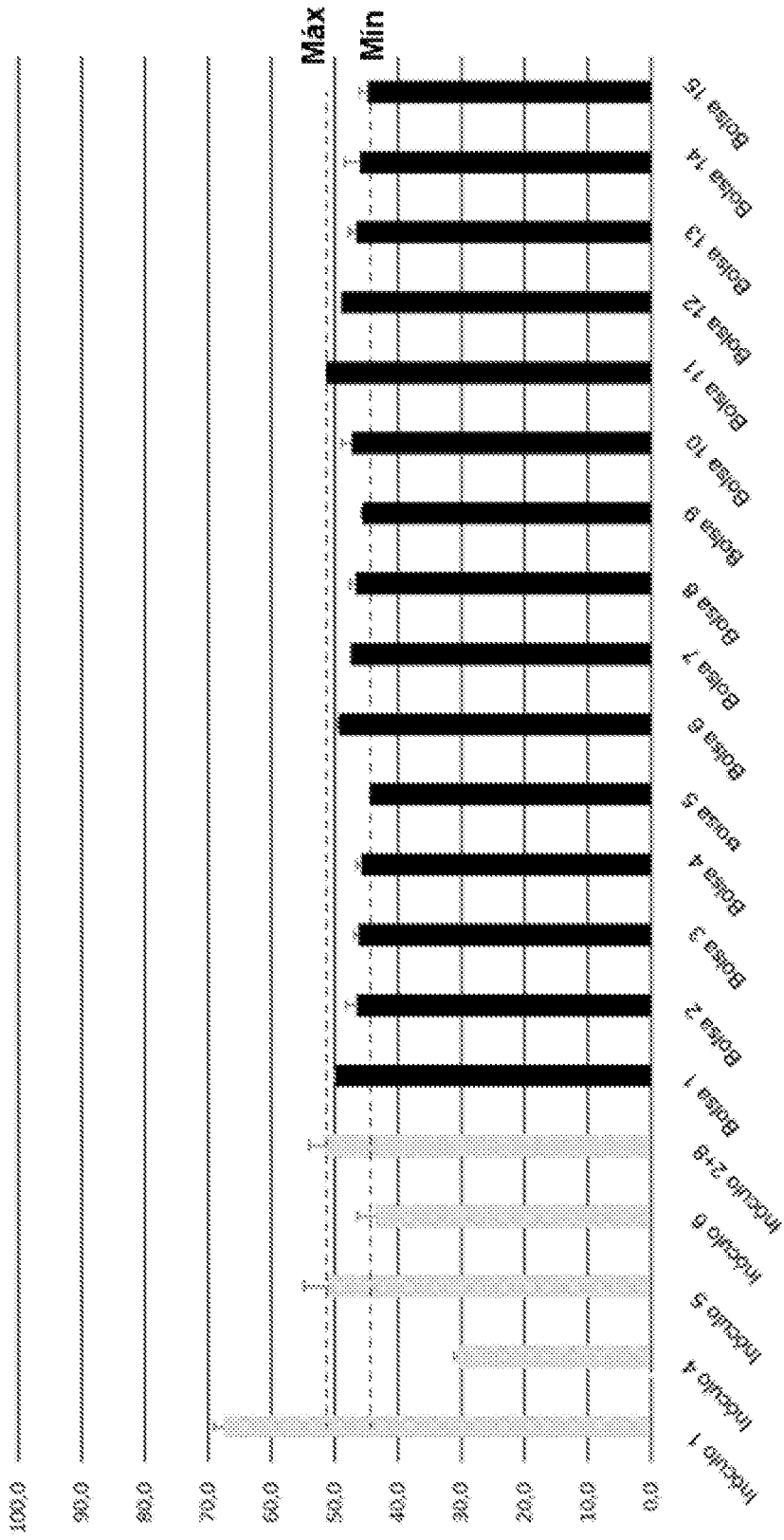
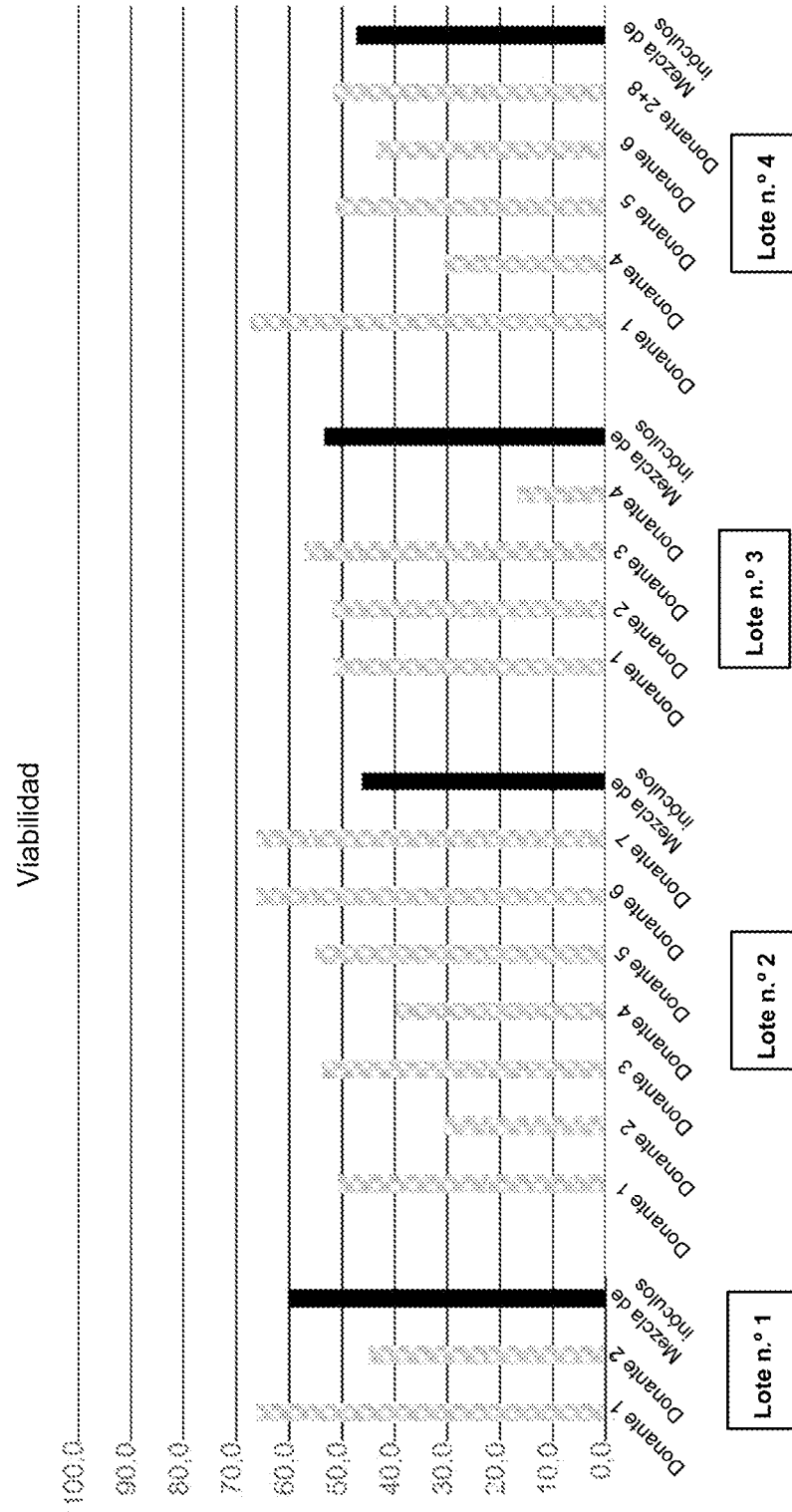


Figura 2

Figura 3



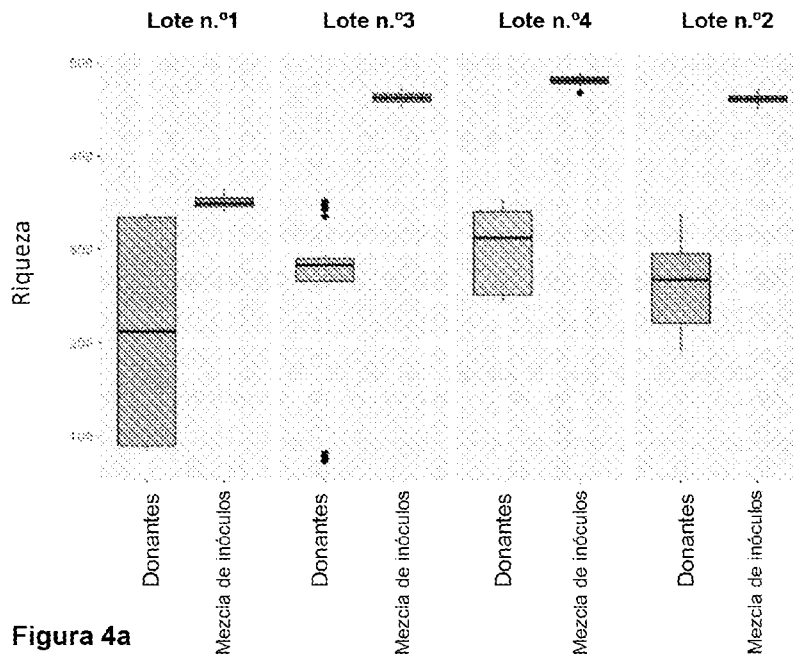


Figura 4a

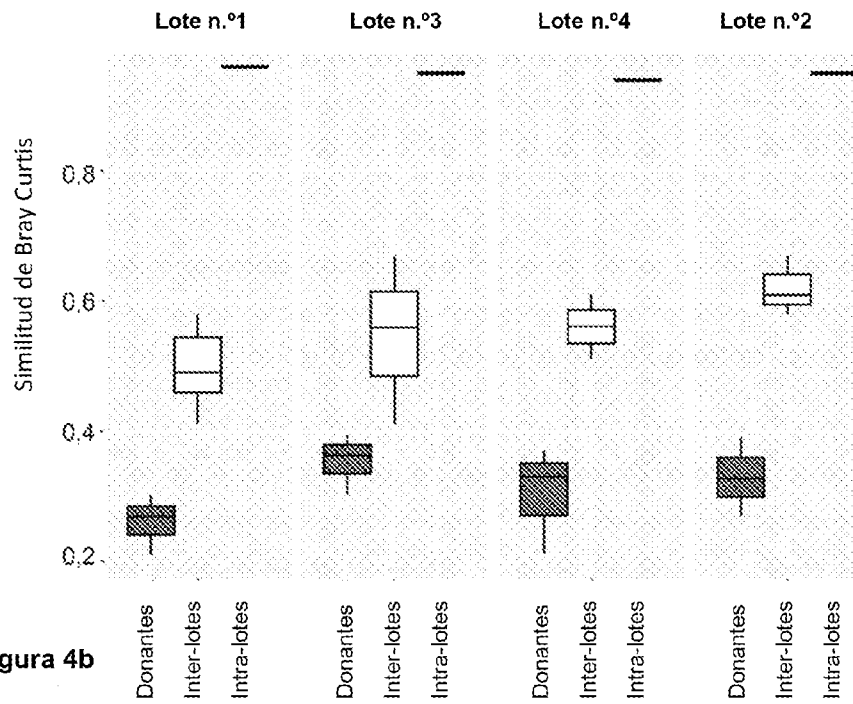


Figura 4b

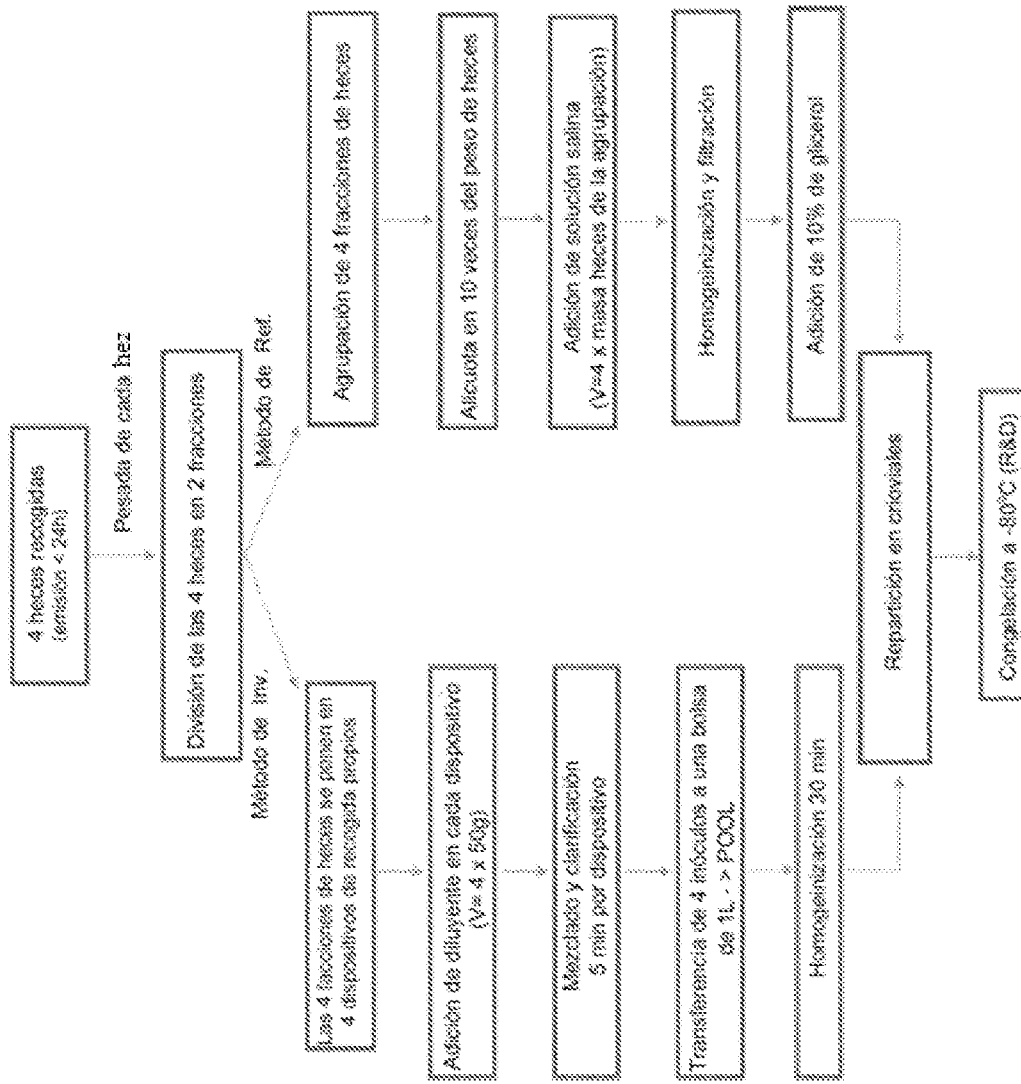


Figura 5

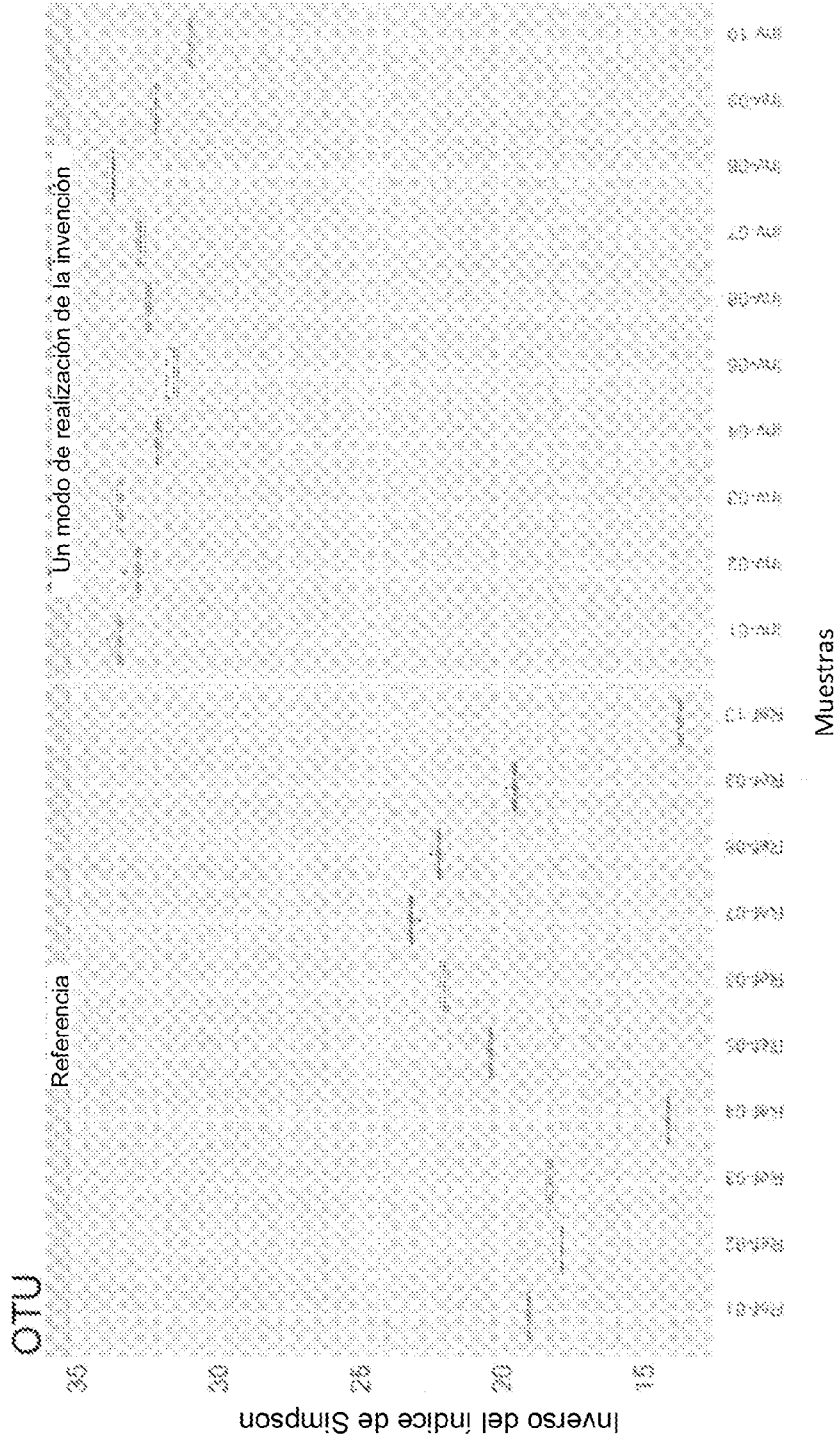


Figura 6a

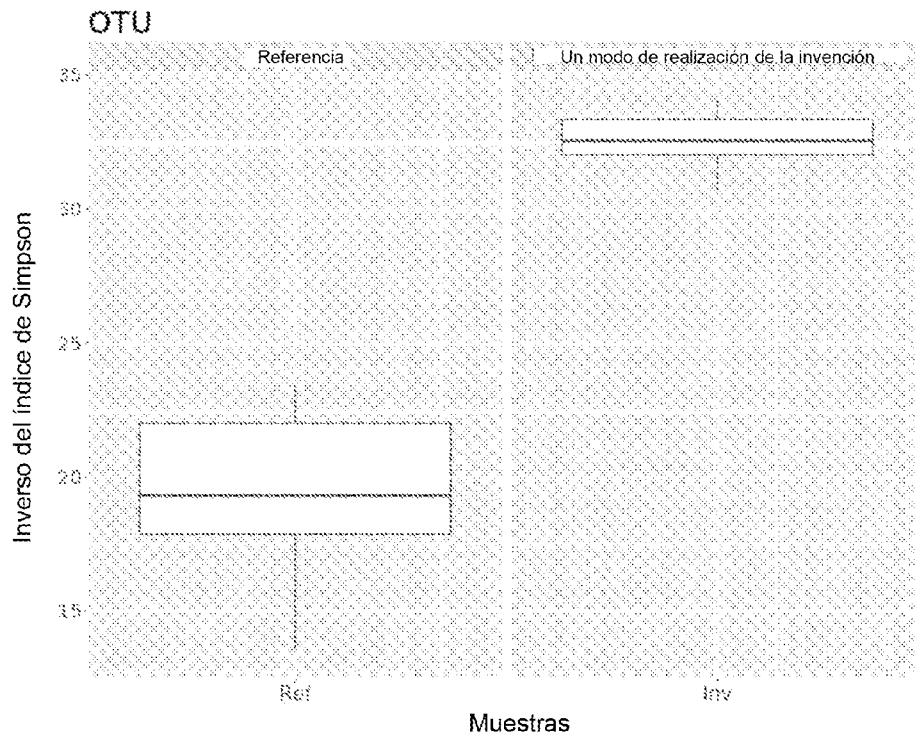


Figura 6b

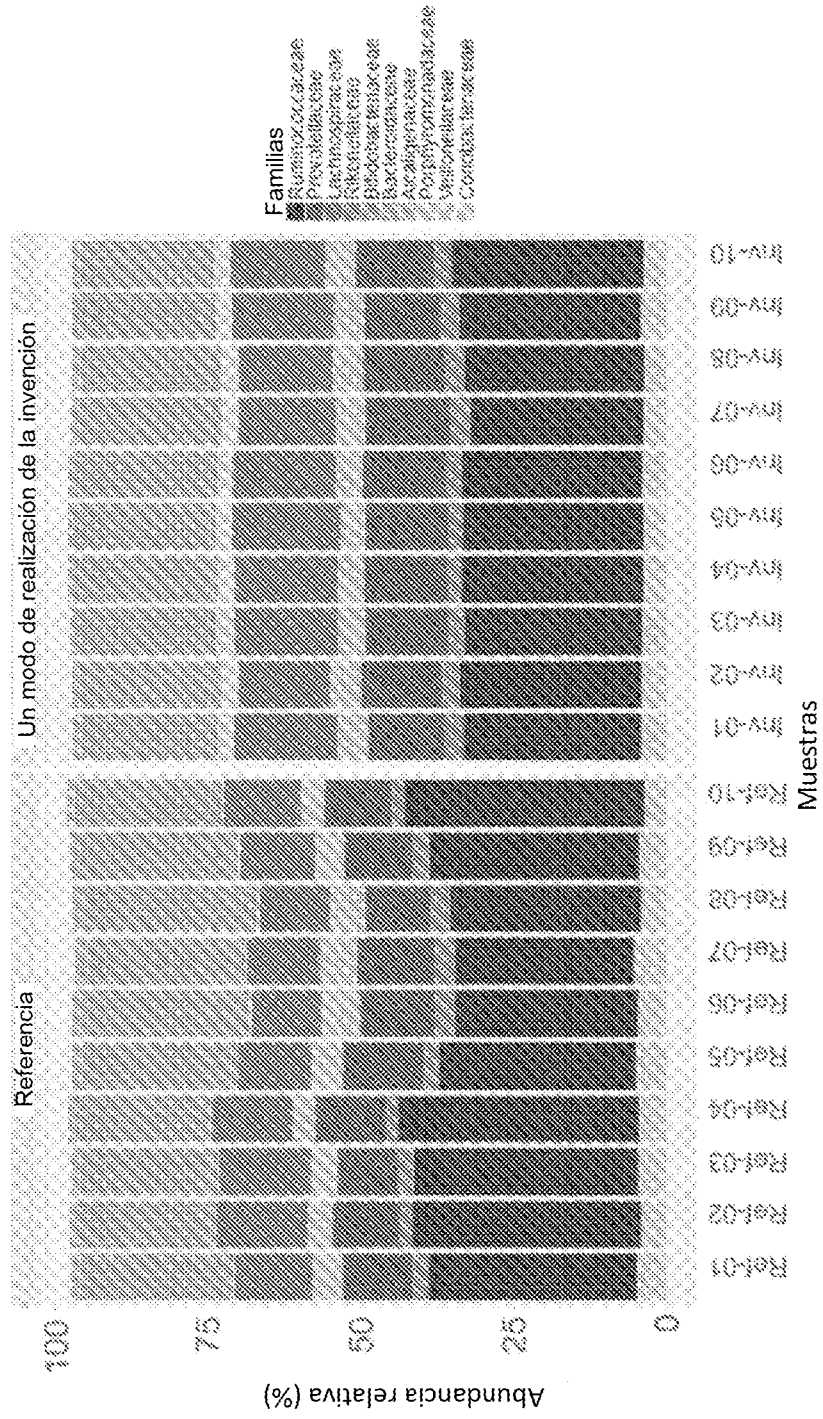


Figura 7

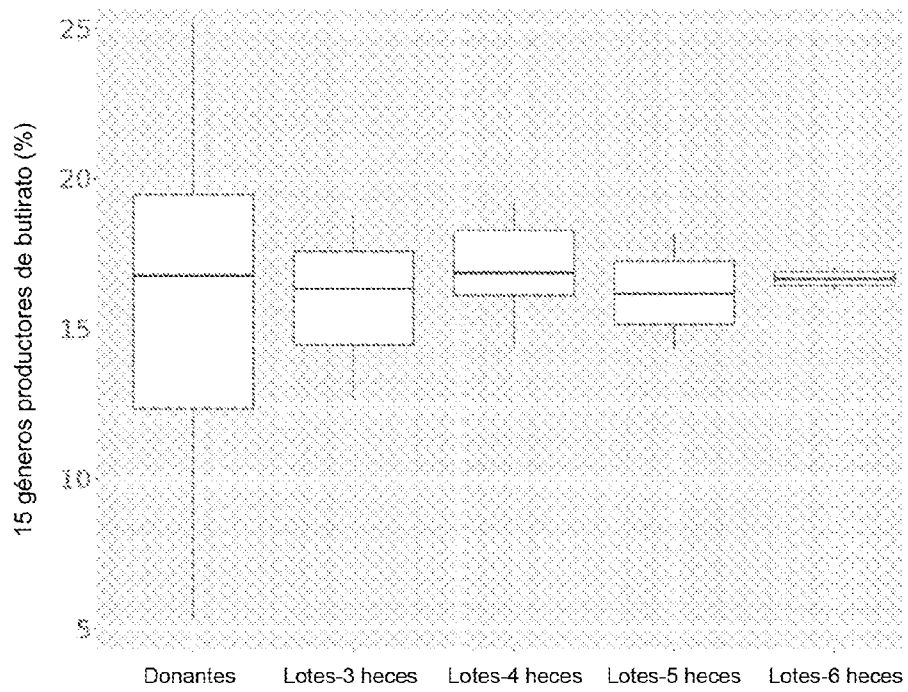


Figura 8

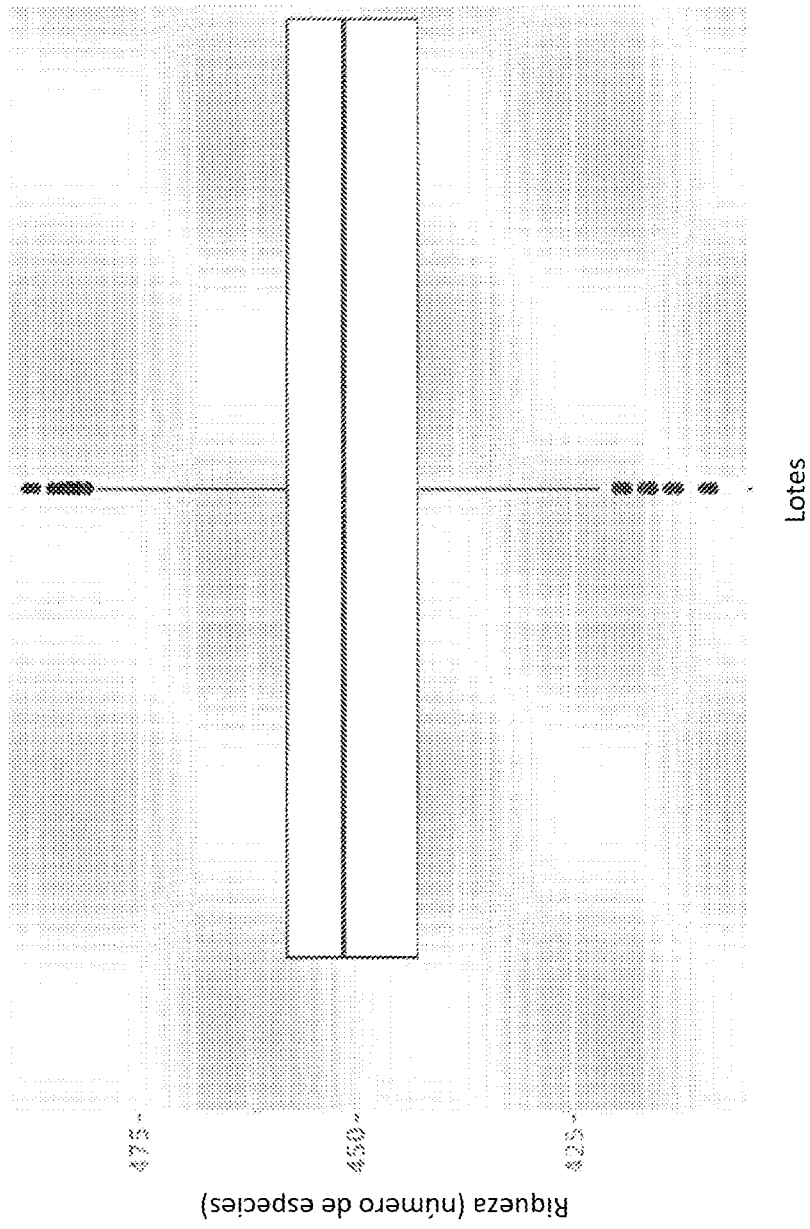


Figura 9