

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 284**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)
A61P 1/12 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 17/10 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2012 E 12772317 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2750682**

54 Título: **Composición que comprende microbiota intestinal humana anaeróbicamente cultivada**

30 Prioridad:

11.10.2011 SE 1150940
11.01.2012 SE 1250011

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

12.09.2016

73 Titular/es:

ACHIM BIOTHERAPEUTICS AB (100.0%)
Björnbodavägen 65
162 44 Vällingby, SE

72 Inventor/es:

BERSTAD, ARNOLD;
MIDTVEDT, TORE;
NORIN, ELISABETH;
BENNO, PETER y
DAHLGREN, ATTI-LA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 582 284 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).

Composición que comprende microbiota intestinal humana anaeróbicamente cultivada**DESCRIPCIÓN**

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un sistema micro-ecológico anaerobio que comprende microbiota intestinal humana anaeróbicamente cultivada. La presente invención también se refiere a una composición de microbiota anaeróbicamente cultivada que constituye un cultivo de siembra funcional para restablecer la normalidad de un microbioma humano alterado y funciones gastrointestinales.

La presente invención se refiere además a la composición para su uso como un fármaco y para su uso como profilaxis de enfermedades y un método de preparación de la composición.

15 ANTECEDENTES TÉCNICOS

La microbiota gastrointestinal consiste en varios sistemas micro-ecológicos complejos, en los que tienen lugar las interacciones entre las cepas microbianas individuales y entre la microbiota y el huésped. Las interacciones con el huésped se producen mediante el contacto directo con la pared de la mucosa e indirectamente, por ejemplo, mediante metabolitos y sustancias de señalización.

Este equilibrio ecológico intestinal puede alterarse por factores y agentes físicos, químicos y biológicos externos e internos, cuya consecuencia puede ser local, por ejemplo, metabolismo alterado, alteración de la motilidad gastrointestinal, funciones/comunicaciones cruzadas alteradas, y/o conducir a efectos sistémicos que implican a otros sistemas de órganos.

La diarrea asociada a *Clostridium difficile* DACD se describió por primera vez aproximadamente hace 1/3 de siglo. Sin embargo, a pesar de las miles de publicaciones en Pub Med de la patogénesis, epidemiología, diagnóstico clínico y diversos enfoques terapéuticos, la DACD sigue persistiendo como una causa frecuente cara de enfermedad gastrointestinal infecciosa asociada a la atención sanitaria y se supone que los problemas aumentan en el mundo. Se estableció recientemente que hoy en día experimentamos un aumento de diez veces de DACD en Europa, EE.UU. y Canadá. Se informan fallos terapéuticos crecientes de los tratamientos con metronidazol y vancomicina, y los nuevos antibióticos, como fidaxomicina, oritavancina, nitazoxanida, REP3123 y NVB303 están de camino al mercado. Sin embargo, tiene que reconocerse que incluso antes de usarse estos fármacos, un cierto número de cepas de *Clostridium difficile* están expresando una sensibilidad reducida a estos nuevos fármacos. Adicionalmente, sea cual sea la eficacia clínica que resulte, definitivamente serán de uso caro.

Se ha establecido que algunos pacientes continúan manifestando diarrea recurrente después de completarse el tratamiento con fármacos novedosos y, por tanto, otras estrategias se han basado, por ejemplo, en el trasplante fecal de un pariente cercano o una composición sintética que comprende una mezcla de diferentes bacterias.

El documento WO 02/07741 describe una composición sintética que comprende una preparación de una flora predeterminada para el tratamiento de trastornos gastrointestinales.

45 El documento WO 2011/033310 describe una forma de dosificación encapsulada que comprende flora extraída de heces para su uso en el tratamiento de trastornos gastrointestinales.

El trasplante fecal es un método conocido, pero no sin riesgo. Hasta ahora se ha usado material fecal de donantes de parientes cercanos. Un problema principal con este procedimiento es el riesgo de transmisión de genes resistentes a ciertos antibióticos. La transferencia de tales genes puede tener graves consecuencias para el paciente cuando en el futuro se necesite tratamiento con antibióticos. Otro problema principal con esta terapia es el riesgo de transmisión de agentes posiblemente contagiosos presentes en las heces del donante, que defiende la cuidadosa selección de las heces que van a administrarse. Esta selección requiere tiempo y es cara. Adicionalmente, este tipo de tratamiento es percibido por muchos como altamente antiestético.

55 Publicaciones previas que mencionan el trasplante fecal:

- Johan S. Bakken Fecal bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile* infection *Anaerobe* 15 (2009) 285-289.
- C Jorup-Rönström, A Håkansson, A-K Person, T Midtvedt, E Norin. Feceskultur framgångsrik terapi vid *Clostridium difficile*-diarré. *Läkartidningen* nr 46 2006 volym 103, 3603-3605.
- A. Gustafsson, A. Berstad, S. Lund-Tønnesen, T. Midtvedt, E. Norin. The Effect of Faecal Enema on Five Microflora-Associated Characteristics in Patients with Antibiotic-Associated Diarrhoea. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:580-586.
- A. Gustavsson, S. Lund-Tønnesen, A. Berstad, T. Midtvedt & E. Norin Faecal Short-Chain Fatty Acids in Patients with Antibiotic-Associated Diarrhoea, before and after Faecal Enema Treatment. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:721-727.

SUMARIO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a una composición que comprende microbiota intestinal humana estrictamente anaeróbicamente cultivada seleccionada de al menos tres de los cuatro filos Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria para su uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades. La presente invención se refiere además a un método de preparación de una composición tal. También se describe la administración de una cantidad terapéutica o profiláctica de la invención a un ser humano.

10 También se describe una composición que comprende microbiota intestinal anaeróbicamente cultivada que constituye un cultivo de siembra funcional para restablecer la normalidad de una microbiota humana alterada y funciones gastrointestinales y el uso de tal composición para la prevención y el tratamiento de enfermedad.

15 La presente invención también se refiere a una composición según las reivindicaciones para su uso en el tratamiento farmacéutico de trastornos gastrointestinales y/o sistémicos/metabólicos que tiene su origen en un ecosistema gastrointestinal alterado o disfuncional.

20 La invención también se refiere al uso de una microbiota humana anaeróbicamente cultivada tal para tratamiento farmacéutico o prevención de enfermedad. La composición también puede contener otros factores microbianos (por ejemplo, bacteriófagos) o sustancias señal activas contra enfermedades.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se define por las reivindicaciones.

25 Un primer aspecto de la presente invención es una composición que comprende microbiota intestinal humana anaeróbicamente cultivada como se define en las reivindicaciones.

30 En la presente solicitud, el término "microbiota" se usa para la flora microbiana, es decir, los microorganismos que normalmente habitan en el sistema gastrointestinal.

La composición según la presente invención constituye un cultivo funcional para restablecer la normalidad de una microbiota humana alterada y funciones gastrointestinales. Esta composición ha mostrado ser sorprendentemente útil en el tratamiento o la profilaxis de enfermedad.

35 La composición según la presente invención interacciona de una forma sinérgica con la microbiota intestinal dañada y restablece sus funciones fisiológicas y metabólicas. La invención también puede usarse como profiláctico para evitar la perturbación de la microbiota intestinal en primer lugar.

40 La composición contiene bacterias anaerobias de al menos tres de los cuatro siguientes filos: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria.

45 Según otra realización, la composición está libre de los siguiente microbios: virus de la hepatitis A, B y C, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), calici- y rotavirus, Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia y quistes de protozoarios. Preferentemente también está libre de material seleccionado de beta-lactamasas de amplio espectro y metalo-beta-lactamasas, metabolitos de sustancias farmacéuticas y xenobióticos.

50 Preferentemente, la microbiota en la composición según la presente invención no se ha expuesto a antibióticos tomados en uso clínico después de 1995.

La presente invención comprende una microbiota intestinal humana anaeróbicamente cultivada para el tratamiento farmacéutico de trastornos gastrointestinales y/o sistémicos/metabólicos que tienen su origen en un ecosistema gastrointestinal disfuncional.

55 Una ventaja con la composición según la presente invención es que consiste en un sistema micro-ecológico funcional que es estable y homogéneo durante 15 años de cultivo. Ninguna otra cepa bacteriana entra en el sistema durante el cultivo. Las cepas microbianas en el sistema micro-ecológico interaccionan y se comunican entre sí. Un sistema micro-ecológico es homogéneo.

60 El sistema ecológico funcional según la presente invención tiene la capacidad de restablecer y/o estabilizar microbiota intestinal y/o funciones intestinales normales.

65 Otro aspecto de la presente invención es una composición que comprende un sistema micro-ecológico que comprende microbiota intestinal humana anaeróbicamente cultivada para su uso en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades.

Preferentemente, el contenido bacteriano de la composición es superior a 10^6 por ml de medio, más preferentemente superior a 10^9 por ml de medio.

5 En una realización de la presente invención, la composición comprende un sistema micro-ecológico anaerobio obtenido de heces de un donante individual. El cultivo de heces de un donante individual sano es necesario para obtener un sistema micro-ecológico funcional que es estable con el tiempo.

Preferentemente, el donante es un individuo sano con un sistema gastrointestinal con buena funcionalidad.

10 Preferentemente, las heces se obtienen de muestras de heces individuales. También preferentemente, las heces se obtuvieron antes de 1995.

15 En una realización preferida de la presente invención, la composición se mantiene bajo condiciones anaerobias estrictas hasta la administración final. Por tanto, preferentemente la composición se mantiene en condiciones anaerobias durante la administración final.

20 Otro aspecto de la presente invención es un método de preparación de una composición que comprende un sistema micro-ecológico anaerobio que comprende microbiota intestinal humana anaeróticamente cultivada según las reivindicaciones.

La composición según la presente invención se ha cultivado bajo condiciones anaerobias estrictas. Por el cultivo anaerobio se promueve la proliferación de las bacterias anaerobias, y adicionalmente se suprime la proliferación de bacterias aerobias.

25 En una realización preferida de la presente invención, la composición se prepara cultivando una muestra de heces obtenida de un individuo sano. Preferentemente, el individuo sano tiene valores funcionales normales de coprostanol, urobilinas, mucina, actividad trípica fecal, ácidos grasos de cadena corta y beta-aspartilglicina. También preferentemente, la muestra debe obtenerse antes de 1995. Más preferentemente, la muestra de heces se investiga para estar libre de virus de la hepatitis A, B y C, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), calici- y rotavirus. Además, la muestra de heces se criba para estar libre de Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia, Clostridium difficile y la presencia de quistes de protozoarios.

35 El medio de cultivo usado en el método según la invención promueve la proliferación de las bacterias anaerobias de al menos tres de los cuatro siguientes filos: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria.

40 En una realización, el medio de cultivo es un medio basado en levadura, preferentemente un medio basado en levadura de peptona bacteriológica. El medio de cultivo comprende colesterol añadido, preferentemente colesterol de origen animal. Incluso más preferentemente, el medio comprende yema de huevo de gallina liofilizada añadida, preferentemente en una cantidad del 0,5 al 5 %, más preferentemente del 1,25 % peso/volumen (peso por volumen).

Preferentemente, el cultivo contiene un indicador anaerobio, preferentemente resazurina.

45 El medio de cultivo usado en el método según la invención promueve la proliferación de las bacterias anaerobias de al menos tres de los cuatro siguientes filos: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria en la misma muestra. Además, las condiciones de cultivo preferidas suprimen la proliferación de bacterias aerobias.

En una realización preferida, la composición se re-cultiva bajo condiciones anaerobias estrictas, preferentemente bajo flujo de nitrógeno cada dos semanas.

50 Preferentemente, la muestra fecal se cultiva anaeróticamente durante al menos 15 años.

El cultivo de una muestra fecal con el tiempo según el método de la presente invención promueve la proliferación de las bacterias deseadas, mientras que se suprimen las bacterias aerobias.

55 Una ventaja con el método según la presente invención es que permite la proliferación de todas las bacterias deseadas en la misma muestra. Así, no es necesaria la mezcla de diferentes cultivos. Esto tiene la ventaja de que la composición obtenida comprende un sistema micro-ecológico que tiene un efecto estabilizante sobre la microbiota intestinal y es capaz de restablecer la comunicación entre el huésped y el intestino. Además, cultivando anaeróticamente la microbiota en una muestra, según la invención reivindicada, el mismo sistema micro-ecológico se reproduce en cada composición con efecto fisiológico y/o farmacéutico retenido durante un largo tiempo, tal como durante al menos 15 años.

Además, el sistema micro-ecológico según la presente invención se cultiva bajo condiciones anaerobias estrictas.

65 La flora intestinal humana consiste en varios miles de microbios diferentes, de los que la gran mayoría son estrictamente anaerobios.

En una realización de la invención, las siguientes especies bacterianas juntas comprenden más del 1 %, preferentemente más del 20 %, y más preferentemente más del 50 % del contenido bacteriano total de la composición;

- 5 Bacteria; "Actinobacteria"; Actinobacteria; Coriobacteridae; Coriobacteriales; "Coriobacterineae"; Coriobacteriaceae; Collinsella,
 Bacteria; "Actinobacteria"; Actinobacteria; Coriobacteridae; Coriobacteriales; "Coriobacterineae"; Coriobacteriaceae; Eggerthella,
 Bacteria; "Actinobacteria"; Actinobacteria; Coriobacteridae; Coriobacteriales; "Coriobacterineae";
 10 Coriobacteriaceae; Olsenella,
 Bacteria; "Bacteroidetes"; "Bacteroidia"; "Bacteroidales"; "Porphyromonadaceae"; Parabacteroides,
 Bacteria; "Bacteroidetes"; "Bacteroidia"; "Bacteroidales"; "Prevotellaceae"; Prevotella, Bacteria; "Bacteroidetes";
 "Bacteroidia"; "Bacteroidales"; "Rikenellaceae"; Alistipes, Bacteria; "Bacteroidetes"; "Bacteroidia";
 "Bacteroidales"; Bacteroidaceae; Bacteroides,
 15 Bacteria; "Firmicutes"; "Bacilli"; "Lactobacillales"; "Enterococcaceae"; Enterococcus, Bacteria; "Firmicutes";
 "Clostridia"; Clostridiales; "Eubacteriaceae"; Eubacterium Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales;
 "Eubacteriaceae"; sin clasificar "Eubacteriaceae",
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Lachnospiraceae"; Anaerostipes, Bacteria; "Firmicutes";
 "Clostridia"; Clostridiales; "Lachnospiraceae"; Dorea, Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales;
 20 "Lachnospiraceae", Roseburia, Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Lachnospiraceae"; sin
 clasificar "Lachnospiraceae",
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Peptostreptococcaceae"; Sporacetigenium,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Peptostreptococcaceae"; sin clasificar
 "Peptostreptococcaceae", Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Ruminococcaceae"; Anaerofilum,
 25 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Ruminococcaceae"; Anaerotruncus, Bacteria; "Firmicutes";
 "Clostridia"; Clostridiales; "Ruminococcaceae"; Oscillibacter, Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales;
 "Ruminococcaceae"; sin clasificar "Ruminococcaceae",
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Clostridiaceae; "Clostridiaceae1"; Clostridium,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Clostridiaceae; "Clostridiaceae1"; Sarcina,
 30 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Clostridiaceae; "Clostridiaceae1"; sin clasificar
 "Clostridiaceae1",
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XI; Anaerococcus, Bacteria; "Firmicutes";
 "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XI; Finegoldia, Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales;
 Incertae Sedis XI; Peptoniphilus, Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XI; sin
 35 clasificar Incertae Sedis XI,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XIII; Anaerovorax, Bacteria; "Firmicutes";
 "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XIII; Mogibacterium, Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales;
 Incertae Sedis XIV; Blautia, Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; sin clasificar Clostridiales,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Veillonellaceae; Veillonella, Bacteria; "Firmicutes";
 40 "Erysipelotrichi"; "Erysipelotrichales"; Erysipelotrichaceae; Holdemania,
 Bacteria; "Proteobacteria"; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; Parasutterella

Enfermedades que pueden tratarse o prevenirse por la invención son, por ejemplo, diarreas tras el tratamiento con
 45 antibióticos, especialmente diarreas producidas por Clostridium difficile que pueden ser de duración muy larga y
 difíciles de tratar por los métodos convencionales y pueden en casos raros conducir a la muerte. Otras áreas
 terapéuticas son el síndrome del intestino irritable (SII), celiaquía y enfermedades inflamatorias del intestino, por
 ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, colitis microscópica y pouchitis. Otra área de tratamiento es la
 alteración/disbiosis iatrogénica del microbioma intestinal, por ejemplo, tras radioterapia, quimioterapia y a propósito
 50 de trasplantes. Ejemplos de otras enfermedades que pueden tratarse o prevenirse con la invención son:
 enfermedades neurológicas, por ejemplo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Lou
 Gehrig ALS-esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple; trastornos del comportamiento/psiquiátricos, por
 ejemplo, autismo, síndrome de Asperger, trastorno por déficit de atención de hiperactividad (TDAH) y depresión;
 enfermedades reumatológicas, por ejemplo, artritis reumatoide; y trastornos sistémicos/metabólicos, por ejemplo:
 hipertensión, obesidad y diabetes de tipo 2, y enfermedades neoplásicas/tumorales del tubo gastrointestinal. La
 55 invención también puede usarse en el tratamiento del síndrome de fatiga crónica. La invención también puede
 usarse en el tratamiento de enfermedades dermatológicas tales como acné vulgar.

También se describe el uso de una microbiota humana anaeróbicamente cultivada tal para la producción de un
 60 tratamiento farmacéutico o prevención de enfermedad.

La composición según la presente invención puede administrarse a un ser humano por un dispositivo seleccionado
 de un tubo naso-duodenal, gastroscopio, colo/sigmoidoscopio, y enema, o en forma liofilizada en una preparación
 galénica adecuada, por ejemplo, cápsula resistente a los ácidos gástricos, nano-encapsulación o supositorio.

65 En una realización, la composición también puede contener otros factores microbianos (por ejemplo, bacteriófagos)
 o sustancias de señalización activas contra enfermedades.

Formas de preparaciones

La composición puede proporcionarse en las siguientes formas de preparaciones:

- 5
1. Recién descongelada de disolución congelada
 2. Producto cultivado liofilizado
 3. Fresca del cultivo
 4. Cultivo micro-encapsulado vivo

10 Dosificación

La invención se aplica al tubo gastrointestinal humano al menos una vez al día durante el transcurso de varios días, por ejemplo 1-30 días, dependiendo de la naturaleza, causa y gravedad del problema. Se administra por administración de 1-100 ml del producto, preferentemente 20-40 ml, o la cantidad equivalente en forma liofilizada.

15 Medios de administración

El producto puede administrarse preferentemente según los siguientes ejemplos no limitantes: en forma de una disolución mediante, por ejemplo, un tubo naso-duodenal, gastroscopio, colo/sigmoidoscopio, enema o forma liofilizada en una preparación galénica adecuada, por ejemplo, una cápsula resistente a los ácidos gástricos, nano-encapsulada o un supositorio.

Otros componentes (vehículos)

25 Otras sustancias y componentes que facilitan la administración o soportan el efecto de la invención pueden añadirse a la composición.

El tratamiento con la invención puede o puede no ir precedido por un tratamiento con antibiótico y/o sustancias reductoras de la motilidad.

30 La invención se describe por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo1

35 Se obtuvo microbiota según la presente invención de una muestra de heces de un donante individual sano antes de 1995. Tanto el donante como las heces se examinaron minuciosamente. Se encontró que el estado funcional de la microbiota intestinal del donante tenía valores funcionales normales de coprostanol, urobilinas, mucina, actividad trípica fecal, ácidos grasos de cadena corta y beta-aspartilglicina. Las pruebas para los virus de la hepatitis A, B y C, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), calici- y rotavirus fueron todas negativas. Además, las heces se cribaron para la presencia de Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia, Clostridium difficile y quistes de protozoarios, y todas estas investigaciones fueron negativas.

45 Se tomó una muestra de heces del interior de la muestra de heces (escala de Bristol tipo 2) del donante sano anteriormente mencionado y se suspendió inmediatamente en 30 ml de un medio basado en levadura de peptona bacteriológica esterilizada previamente reducida (Difco, EE.UU.), con adición de 1,25 % (peso/volumen) de yema de huevo de gallina liofilizada, Fresenius-Kabi, Suecia, con resazurina como indicador anaerobio. Esta composición se volvió a cultivar bajo flujo de nitrógeno cada dos semanas. Se encontró que el contenido bacteriano del producto cultivado era $> 10^9$ por ml de medio.

50 El producto contuvo las siguientes especies:

- | | | | | |
|---|-----------------|------------------|-------------------|---------------------|
| Bacteria; "Actinobacteria"; | Actinobacteria; | Coriobacteridae; | Coriobacteriales; | "Coriobacterineae"; |
| Coriobacteriaceae; Collinsella, | | | | |
| Bacteria; "Actinobacteria"; | Actinobacteria; | Coriobacteridae; | Coriobacteriales; | "Coriobacterineae"; |
| Coriobacteriaceae; Eggerthella, | | | | |
| Bacteria; "Actinobacteria"; | Actinobacteria; | Coriobacteridae; | Coriobacteriales; | "Coriobacterineae"; |
| Coriobacteriaceae; Olsenella, | | | | |
| Bacteria; "Bacteroidetes"; "Bacteroidia"; "Bacteroidales"; "Porphyromonadaceae"; Parabacteroides, | | | | |
| Bacteria; "Bacteroidetes"; "Bacteroidia"; "Bacteroidales"; "Prevotellaceae"; Prevotella, | | | | |
| Bacteria; "Bacteroidetes"; "Bacteroidia"; "Bacteroidales"; "Rikenellaceae"; Alistipes, | | | | |
| Bacteria; "Bacteroidetes"; "Bacteroidia"; "Bacteroidales"; Bacteroidaceae; Bacteroides | | | | |
| Bacteria; "Firmicutes"; "Bacilli"; "Lactobacillales"; "Enterococcaceae"; Enterococcus, | | | | |
| Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Eubacteriaceae"; Eubacterium | | | | |
| Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Eubacteriaceae"; sin clasificar "Eubacteriaceae", | | | | |
| Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Lachnospiraceae"; Anaerostipes, | | | | |
| Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Lachnospiraceae"; Dorea, | | | | |

Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Lachnospiraceae"; Roseburia,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Lachnospiraceae"; sin clasificar "Lachnospiraceae",
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Peptostreptococcaceae"; Sporacetigenium,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Peptostreptococcaceae"; sin clasificar
 5 "Peptostreptococcaceae",
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Ruminococcaceae"; Anaerofilum,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Ruminococcaceae"; Anaerotruncus,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Ruminococcaceae"; Oscillibacter,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Ruminococcaceae"; sin clasificar "Ruminococcaceae",
 10 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Clostridiaceae; "Clostridiaceae1"; Clostridium,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Clostridiaceae; "Clostridiaceae1"; Sarcina,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Clostridiaceae; "Clostridiaceae1"; sin clasificar
 "Clostridiaceae1",
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XI; Anaerococcus,
 15 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XI; Finegoldia,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XI; Peptoniphilus,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XI; sin clasificar Incertae Sedis XI,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XIII; Anaerovorax,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XIII; Mogibacterium,
 20 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XIV; Blautia,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; sin clasificar Clostridiales,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Veillonellaceae; Veillonella,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Erysipelotrichi"; "Erysipelotrichales"; Erysipelotrichaceae; Holdemania, y
 Bacteria; "Proteobacteria"; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; Parasutterella,
 25

Después de la adición de 10 % de glicerol la composición puede almacenarse a -70 °C.

Ejemplo 2

30 La muestra de heces reciente o congelada de un individuo que no se ha expuesto a antibióticos o genes de
 resistencia a antibióticos, por ejemplo, mediante una infección bacteriana, se inocula en condiciones anaerobias
 sobre 30 ml de medio de peptona-levadura (Difco, EE.UU.), que contiene colesterol de animal origen (por ejemplo,
 1,25 % de yema de huevo de gallina liofilizada, Fresenius-Kabi, Suecia), con resazurina como indicador anaerobio.
 Esta composición se vuelve a cultivar cada dos semanas. El contenido bacteriano del producto cultivado debe ser >
 35 10^6 , preferentemente > 10^9 por ml de medio. Después de la adición de 10 % de glicerol la composición puede
 almacenarse a -70 °C.

Ejemplo 3

40 Se trató un número de 32 pacientes, de edades 27-94 años (20 mujeres, mediana de la edad 78 años y 12 hombres,
 mediana de la edad 75 años) con una composición según la invención. De estos pacientes, 22 habían tenido
 enfermedades crónicas como cáncer (mama, colon, próstata) y enfermedades cardiovasculares o pulmonares. En 11
 pacientes se administraron cefalosporinas, en 9 pacientes se administró clindamicina, en 4 pacientes se administró
 45 ciprofloxacina, en 2 pacientes se administró isoxazolilpenicilina, otros 3 pacientes se administraron con algunos otros
 antibióticos, y finalmente, 1 paciente se administró con azitromicina cuando se diagnosticó por primera vez infección
 recurrente por *Clostridium difficile* (IRCD). 2 pacientes no obtuvieron pretratamiento con antibióticos específicos
 antes de recibir la composición según la invención.

50 Rutinariamente, se administró por vía rectal un volumen de 30 ml de la invención según el Ejemplo 1 por un catéter
 rectalmente introducido en el sigmoideo o por colonoscopia. El análisis de la toxina *Clostridium* se realizó según la
 práctica general en el Hospital Karolinska, Huddinge, Suecia. De los 32 pacientes que recibieron la invención, 22
 pacientes se curaron. Estos 22 pacientes experimentaron una mejora espectacular en la calidad de vida de vivir con
 diarrea durante varios meses a una vida con hábitos intestinales normales en el plazo de algunos días. Quince de
 55 estos pacientes recibieron la invención solo una vez, el resto recibieron la invención una a dos veces más. Cuatro
 pacientes más experimentaron una mejora considerable, y en los 4 pacientes restantes tuvieron que administrarse
 terapias de antibióticos repetidas. También se curaron otros 2 pacientes con causa desconocida de la diarrea. El
 tiempo de seguimiento fue 5-68 meses, mediana 26 meses. No se observaron efectos adversos mediante el
 procedimiento.

Ejemplo 4

60 Diez pacientes con gastroenteritis post-infecciosa relacionada con *Giardia lamblia* padecían problemas similares a
 SII. El tratamiento de SII convencional no fue satisfactorio. Se decidió que estos pacientes deberían recibir la
 composición según la invención. Se administró una dosis de 30 ml durante tres días consecutivos, usando un tubo
 65 gastroyeyunal. Sorprendentemente, todos los pacientes se recuperaron poco después de la administración de la
 invención, y siguieron sin síntomas durante un largo periodo de tiempo.

Reivindicaciones

1. Una composición que comprende microbiota intestinal humana estrictamente anaeróbicamente cultivada seleccionada de al menos tres de los cuatro filos Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria para su uso en la prevención y el tratamiento de enfermedades.
2. La composición según la reivindicación 1, **caracterizada porque** está libre de beta-lactamasas de amplio espectro y metalo-beta-lactamasas, metabolitos de sustancias farmacéuticas o xenobióticos.
3. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, **caracterizada porque** está libre de los siguientes microbios: virus de la hepatitis A, B y C, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), calici- y rotavirus, Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia y quistes de protozoarios.
4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizada porque** las siguientes especies bacterianas juntas comprenden más del 1 % del contenido bacteriano total de la invención:
- Bacteria; "Actinobacteria"; Actinobacteria; Coriobacteridae; Coriobacteriales; "Coriobacterineae"; Coriobacteriaceae; Collinsella,
 Bacteria; "Actinobacteria"; Actinobacteria; Coriobacteridae; Coriobacteriales; "Coriobacterineae"; Coriobacteriaceae; Eggerthella,
 Bacteria; "Actinobacteria"; Actinobacteria; Coriobacteridae; Coriobacteriales; "Coriobacterineae"; Coriobacteriaceae; Olsenella,
 Bacteria; "Bacteroidetes"; "Bacteroidia"; "Bacteroidales"; "Porphyromonadaceae"; Parabacteroides,
 Bacteria; "Bacteroidetes"; "Bacteroidia"; "Bacteroidales"; "Prevotellaceae"; Prevotella,
 Bacteria; "Bacteroidetes"; "Bacteroidia"; "Bacteroidales"; "Rikenellaceae"; Alistipes,
 Bacteria; "Bacteroidetes"; "Bacteroidia"; "Bacteroidales"; Bacteroidaceae; Bacteroides,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Bacilli"; "Lactobacillales"; "Enterococcaceae"; Enterococcus,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Eubacteriaceae"; Eubacterium,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Eubacteriaceae"; sin clasificar "Eubacteriaceae",
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Lachnospiraceae"; Anaerostipes,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Lachnospiraceae"; Dorea,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Lachnospiraceae"; Roseburia,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Lachnospiraceae"; sin clasificar "Lachnospiraceae",
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Peptostreptococcaceae"; Sporacetigenium,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Peptostreptococcaceae"; sin clasificar "Peptostreptococcaceae",
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Ruminococcaceae"; Anaerofilum,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Ruminococcaceae"; Anaerotruncus,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Ruminococcaceae"; Oscillibacter,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; "Ruminococcaceae"; sin clasificar "Ruminococcaceae",
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Clostridiaceae; "Clostridiaceae1"; Clostridium,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Clostridiaceae; "Clostridiaceae1"; Sarcina,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Clostridiaceae; "Clostridiaceae1"; sin clasificar "Clostridiaceae1",
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XI; Anaerococcus,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XI; Finegoldia,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XI; Peptoniphilus,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XI; sin clasificar Incertae Sedis XI,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XIII; Anaerovorax,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XIII; Mogibacterium,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Incertae Sedis XIV; Blautia,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; sin clasificar Clostridiales,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Clostridia"; Clostridiales; Veillonellaceae; Veillonella,
 Bacteria; "Firmicutes"; "Erysipelotrichi"; "Erysipelotrichales"; Erysipelotrichaceae; Holdemania, y
 Bacteria; "Proteobacteria"; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; Parasutterella.
5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizada porque** el contenido bacteriano de la composición comprende uno o más de los grupos bacterianos mencionados en la reivindicación 4.
6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en el tratamiento de diarrea, tal como síndrome del intestino irritable (SII), o diarrea asociada a antibióticos (DAA), especialmente relacionada con Clostridium difficile, diarrea asociada a Clostridium difficile (DACD) e infecciones recurrentes por Clostridium difficile (IRCD).
7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en la administración a un ser

humano por un dispositivo seleccionado de un tubo naso-duodenal, gastroscopio, colo/sigmoidoscopio, y enema, o en forma liofilizada en una preparación galénica adecuada, por ejemplo, cápsula resistente a los ácidos gástricos, nano-encapsulada o supositorio.

5 8. Un método de preparación de una composición que comprende microbiota intestinal humana estrictamente anaeróbicamente cultivada seleccionada de al menos tres de los cuatro filos Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria, el método **caracterizado por** cultivo anaerobio de una muestra de heces en un medio de cultivo que promueve la proliferación de las bacterias anaerobias de al menos tres de los cuatro siguientes
10 filos: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria, **y caracterizado porque** las bacterias aerobias son suprimidas durante el cultivo.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65