

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 439**

51 Int. Cl.:

A61K 35/37 (2015.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2012** **PCT/US2012/028484**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012** **WO12122478**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2012** **E 12710616 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017** **EP 2683390**

54 Título: **Composiciones y métodos para el trasplante de microbiota de colon**

30 Prioridad:

09.03.2011 US 201161450838 P

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

05.10.2017

73 Titular/es:

**REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA
(100.0%)**

**200 Oak Street SE, Suite 600
Minneapolis, MN 55455, US**

72 Inventor/es:

**SADOWSKY, MICHAEL J.;
KHORUTS, ALEXANDER;
WEINGARDEN, ALEXA R. y
HAMILTON, MATTHEW J.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 636 439 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

Composiciones y métodos para el trasplante de microbiota de colon

5 Antecedentes

En 1978 se reconoció por primera vez *Clostridium difficile* como una causa importante de diarrea y colitis pseudomembranosa asociada con el uso de agentes antimicrobianos. Desde ese momento, la infección por *C. difficile* ha estado en crecimiento constante en incidencia, morbilidad y mortalidad en América del Norte y Europa (Freeman et al. Clin Microbiol Rev 2010;23:529-49, Kelly y LaMont. N Engl J Med 2008;359:1932-40). El análisis de las estadísticas del Estudio Nacional de Altas Hospitalarias de EE.UU. entre 1996 y 2003 revela que se ha duplicado la prevalencia del diagnóstico de la infección por *C. difficile* (CDI), hasta 0,61/1.000, entre pacientes hospitalizados (McDonald et al. Emerg Infect Dis 2006;12:409-15). Un estudio de 2008 del 12,5 % de todas las instalaciones de cuidado intensivo de EE.UU. indicó una tasa de prevalencia de la CDI de 13,1/1.000, que es al menos un orden de magnitud más alta que la que se encontró anteriormente (Jarvis et al. Am J Infect Control 2009;37:263-70). Mientras que pacientes mayores tienen tasas desproporcionadamente más altas de CDI que los individuos más jóvenes, no se prescinde de ningún grupo de edad y la incidencia de las hospitalizaciones relacionadas con CDI ha aumentado incluso en la población pediátrica (Zilberberg et al. Emerg Infect Dis 2010;16:604-9). El aumento en incidencia está compuesto, además, por una frecuencia elevada de las formas más graves de esta enfermedad, como queda de manifiesto por un aumento de la morbilidad asociada con la CDI y la tasa de letalidad (Ricciardi et al. Arch Surg 2007;142:624-31; discusión 631, Zilberberg et al. Emerg Infect Dis 2008;14:929-31). Esto está, en parte, relacionado con la emergencia de cepas de *C. difficile* más virulentas, tales como el ribotipo de PCR 027/North American Pulsed Field tipo 1 (NAP1), que se caracteriza por un mayor potencial de producción de toxinas y resistencia a antibióticos que otras cepas clínicamente relevantes (Rupnik et al. Nat Rev Microbiol 2009;7:526-36, Kuijper et al. Euro Surveill 2008;13).

La CDI recurrente es uno de los desafíos más difíciles y cada más vez comunes asociados con la CDI (Surawicz, Gastroenterology 2009;136:1152-4). Una incidencia inicial de la CDI puede ir seguida de una recaída en el plazo de 30 días en aproximadamente el 20-30 % de los casos (Kelly y LaMont. N Engl J Med 2008;359:1932-40, Louie et al. N Engl J Med 2011;364:422-31, Pepin et al. Clin Infect Dis 2006;42:758-64), y el riesgo de reaparición se duplica después de dos o más manifestaciones (McDonald et al. Emerg Infect Dis 2006;12:409-15). Mayor edad, uso intercurrente de antibióticos para indicaciones que no son de *C. difficile*, insuficiencia renal, deficiencia inmune y medicaciones antiácidas son algunos de los factores de riesgo conocidos para CDI recurrente (Surawicz, Gastroenterology 2009;136:1152-4, Garey et al. J Hosp Infect 2008;70:298-304). La presencia de solo tres criterios clínicos: edad > 65 años, enfermedad grave y uso continuado de antibióticos después del tratamiento del episodio de CDI inicial, son predictivos de una tasa de recaída de casi el 90 % (Hu et al. Gastroenterology 2009;136:1206-14). La CDI también complica comúnmente el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que ha sido reconocida recientemente como un factor de riesgo independiente adicional para la infección de CDI (Issa et al. Clin Gastroenterol Hepatol. 2007;5:345-51, Rodemann et al. Clin Gastroenterol Hepatol 2007;5:339-4415). La CDI en pacientes con EII subyacente se asocia con una mayor gravedad de la colitis y tasas más altas de reaparición y colectomía (Issa et al. Inflamm Bowel Dis 2008;14:1432-42).

Se acepta ahora que la presencia de microbiota intestinal sana normal (microorganismos intestinales normales) ofrece protección contra la CDI. En cambio, la alteración grave de la microbiota intestinal normal mediante el uso de antibióticos, que incluyen metronidazol y vancomicina que se usan para tratar la CDI, es probablemente una de las razones principales para su reaparición. Chang y colaboradores usaron una secuenciación de ADNr 16S para analizar la microbiota fecal de siete pacientes con CDI inicial y recurrente (Chang et al. J Infect Dis 2008;197:435-8). Informaron que la diversidad de las especies bacterianas se redujo en todos los pacientes en comparación con sujetos de control normales. La mayor reducción en la diversidad de especies, sin embargo, se encontró en los tres pacientes con CDI recurrente y la alteración de su microbiota intestinal fue evidente a nivel del filo, con una reducción marcada de Bacteriodes, normalmente uno de los dos filos dominantes en el colon. Por el contrario, la microbiota intestinal en estos pacientes fue dominada por los miembros de los filos de proteobacterias y verrucomicrobios, que normalmente solo son constituyentes menores de la microbiota del colon.

El objetivo general del tratamiento con antibióticos para la CDI recurrente no es la mera supresión de *C. difficile*, sino también la conservación de la microbiota del colon y la optimización de su restauración. Se han usado varios regímenes con antibióticos, que incluyen dosificaciones cada vez más bajas o pulsadas con vancomicina (McFarland et al. Am J Gastroenterol 2002;97:1769-75) y protocolos "perseguidores" de rifaximina (Johnson et al. Clin Infect Dis 2007;44:846-8, Johnson et al. Anaerobe 2009;15:290-1) para lograr este objetivo con éxito parcial. Recientemente se mostró que la fidaxomicina, un nuevo antibiótico macrocíclico que es de espectro estrecho y no ataca especies de Bacteriodes, reduce la tasa de recaída inicial de CDI un 50 % en comparación con el tratamiento con vancomicina (Louie et al. N Engl J Med 2011;364:422-31). Sin embargo, el tratamiento con fidaxomicina no alteró la tasa de reaparición de CDI provocada por una cepa de PCR 027/NAP1 más virulenta. Por lo tanto, a pesar de estos avances, parece probable que los desafíos en el tratamiento de la CDI recurrente quedarán para un futuro próximo.

El trasplante de microbiota fecal (FMT), también comúnmente conocido como 'bacterioterapia fecal', representa el

protocolo terapéutico que permite la reconstitución más rápida de una composición normal de comunidades microbianas de colon. Durante décadas, el FMT ha sido ofrecido por algunos centros en todo el mundo, normalmente como una opción de último recurso para pacientes con CDI recurrente. El informe más comúnmente citado para FMT fue por Eiseman y colaboradores, que en 1958 describieron el uso de enemas fecales para pacientes que probablemente tenían una forma grave o fulminante de colitis pseudomembranosa (Eiseman et al. Surgery 1958;44:854-9). Desde entonces, se ha informado de más de 200 casos como casos individuales, o pequeñas series de casos, con una tasa de éxito acumulada de ~90 % en la eliminación de la CDI recurrente, sin que se observara ningún acontecimiento adverso. La historia y metodología general usadas para el FMT se han descrito en varias revisiones recientes (Bakken. Anaerobe 2009;15:285-9, van Nood et al. Euro Surveill 2009;14, Khoruts y Sadowsky. Mucosal Immunol 2011;4:4-7). Sin embargo, a pesar de una trayectoria larga y exitosa, además de la gran necesidad clínica, la disponibilidad del procedimiento para muchos pacientes sigue siendo muy limitada.

La falta de una puesta en práctica más amplia del FMT se debe en gran medida a múltiples barreras prácticas no triviales y no es debido a una falta de eficacia. Estas incluyen falta de reembolso para la evaluación de donantes, falta de donantes adecuados en el momento apropiado, dificultad en la preparación y administración del material, así como preocupaciones estéticas sobre la realización del procedimiento en un consultorio de endoscopia o médico. Estas incluyen también la percepción que el paciente tiene del procedimiento, la voluntad del personal para realizar el procedimiento, problemas de higiene relacionados con la manipulación de materia fecal. Estos factores juntos lo convierten en una opción desagradable que a menudo se considera como un tratamiento de último recurso y que no está ampliamente disponible para la gran mayoría de los pacientes que podrían beneficiarse del mismo. Además, la industria farmacéutica ha mostrado poco interés en el desarrollo tecnológico de agentes terapéuticos basados en el FMT, debido en gran medida a la amplia disponibilidad de material del donante y su compleja composición. En lugar de eso, el desarrollo ha sido impulsado principalmente por profesionales clínicos individuales que se ven enfrentados a la necesidad desesperada de sus pacientes.

Sumario de la invención

La presente invención es como se define en las reivindicaciones. Específicamente, la invención proporciona un método de preparación de una composición que comprende un extracto o preparación de heces humanas que comprende material fecal humano, comprendiendo el método: mezclar una muestra fecal de un donante fecal con un diluyente, y filtrar la muestra fecal mezclada con un medio de filtro, en el que la muestra fecal mezclada se pasa a través de tamices con tamaños de tamiz progresivamente más pequeños hasta que un pase final a través de un tamiz de 0,25 mm produce una composición que comprende la microbiota intestinal del donante fecal que es capaz de pasar a través de un tamiz de 0,25 mm. La invención también proporciona una composición que comprende un extracto o preparación de heces humanas, siendo dicha composición obtenible por el método de la invención. La invención proporciona además la composición de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por microbiota de colon disfuncional.

Las composiciones de la invención como se define en las reivindicaciones incluyen un extracto o una preparación de heces humanas. En una realización, la composición incluye no más del 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % en peso de material no vivo/peso de material biológico. Opcionalmente, el material biológico incluye microbios fecales del ciego, colon o intestino humanos y opcionalmente el material biológico incluye bacterias del ciego, colon o intestino humanos. Opcionalmente, la composición incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la composición es una formulación para administración por vía oral.

En una divulgación, una composición consiste en, o consiste esencialmente en, partículas de material no vivo y/o partículas de material biológico que pasarán a través de un tamiz que tiene un tamaño de tamiz de 2,0 mm, 1,0 mm, 0,5 mm, 0,25 mm, 0,212 mm, 0,180 mm, 0,150 mm, 0,125 mm, 0,106 mm, 0,090 mm, 0,075 mm, 0,063 mm, 0,053 mm, 0,045 mm, 0,038 mm, 0,032 mm, 0,025 mm, 0,020 mm, 0,01 mm o 0,2 mm. En el método de la invención, la muestra fecal mezclada se pasa a través de tamices con tamaños de tamiz progresivamente más pequeños, hasta que un pase final a través de un tamiz de 0,25 mm produce una composición que comprende la microbiota intestinal del donante fecal que es capaz de pasar a través de un tamiz de 0,25 mm. Opcionalmente, la composición incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente la composición es una formulación para administración por vía oral.

En una realización, la composición incluye al menos 4 filos diferentes de bacterias de ciego, colon o intestino extraídas o preparadas a partir del ciego, colon o intestino, en la que los filos incluyen un miembro del filo Bacteroidetes, miembro del filo Firmicutes, miembro del filo Proteobacteria, un miembro del filo Tenericutes, o una combinación de los mismos. Opcionalmente, los filos se eligen de Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria y Tenericutes. La composición incluye no más del 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % en peso de material no vivo/peso de material biológico. Opcionalmente, el material biológico incluye flora del ciego, colon o intestino. Opcionalmente, el material biológico incluye bacterias del ciego, colon o intestino. Opcionalmente, la composición incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente la composición es una formulación para administración por vía oral.

En una realización, la composición incluye un extracto de heces humanas en la que la composición es sustancialmente inodora, opcionalmente incluye material biológico y opcionalmente en la que el material biológico incluye bacterias. Opcionalmente, la composición incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente la composición es una formulación para administración por vía oral.

Una composición de la presente invención puede incluir no más de 0,1 % en peso de material no vivo/peso de material biológico. En una realización, una composición puede consistir en, o consistir esencialmente en, partículas que pasarán a través de un tamiz de 0,25 mm o equivalente. En una realización, una composición puede incluir no más del 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % en peso de material no vivo/peso de material biológico. Una composición de la presente invención puede incluir además un crioprotector, tal como glicerol. En una realización, una composición puede estar a una temperatura de menos de 0 °C. En una realización, una composición es un sólido, tal como un polvo. Una composición de la presente invención puede incluir al menos 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} o 5×10^{10} bacterias. En una realización, el material biológico de una composición puede incluir una pluralidad de células procariotas, células eucariotas o virus; o una población de células procariotas, células eucariotas y virus, que es sustancialmente idéntica a o representativa de o equivalente a una población de células procariotas, células eucariotas y virus presentes en las heces de un ser humano sano normal. En una realización, el material biológico de una composición puede incluir una población de células procariotas y virus que es sustancialmente idéntica o representativa de o equivalente a una población de células procariotas y virus presentes en las heces de un ser humano sano normal. En una realización, el material biológico de una composición incluye una población de células procariotas, células eucariotas o virus que es sustancialmente idéntica o representativa de o equivalente a una población de células procariotas, células eucariotas y virus presentes en las heces de un ser humano sano normal.

La presente invención también proporciona una composición preparada mediante un proceso como se define en las reivindicaciones. En una realización, un proceso incluye someter una muestra fecal a una condición o condiciones que eliminen al menos el 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de material no vivo presente en la muestra fecal. En una divulgación, un proceso incluye filtrar una muestra fecal con un medio de filtro, en la que el medio de filtro incluye un tamaño de tamiz de no más de 2,0 mm, 1,0 mm, 0,5 mm, 0,25 mm, 0,212 mm, 0,180 mm, 0,150 mm, 0,125 mm, 0,106 mm, 0,090 mm, 0,075 mm, 0,063 mm, 0,053 mm, 0,045 mm, 0,038 mm, 0,032 mm, 0,025 mm, 0,020 mm, 0,01 mm o 0,2 mm para producir o generar un filtrado. En el proceso de la invención, la muestra fecal mezclada se pasa a través de tamices con tamaños de tamiz progresivamente más pequeños hasta que un pase final a través de un tamiz de 0,25 mm produce la composición que comprende la microbiota intestinal del donante fecal que es capaz de pasar a través de un tamiz de 0,25 mm. Opcionalmente, una composición incluye un material biológico, y opcionalmente el material biológico incluye bacterias. Opcionalmente, una composición incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, una composición es una formulación para administración por vía oral. Opcionalmente, el proceso puede producirse a una temperatura no superior a 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C o 34 °C.

La composición puede incluir al menos 4 filos de bacterias diferentes, en la que se incluye un miembro del filo Bacteroidetes, un miembro del filo Firmicutes, un miembro del filo Proteobacteria, un miembro del filo Tenericutes, o una combinación de los mismos. Opcionalmente, los filos se eligen de Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria y Tenericutes. En una realización, la composición incluye además al menos 5, 6, 7, 8, 9 o 10 clases de bacterias diferentes elegidas de Actinobacteria, Bacteroidia, Bacilli, Clostridia, Erysipelotrichi, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Mollicutes y Verrucomicrobiae.

El proceso puede incluir además agregar un crioprotector, por ejemplo, glicerol, a la composición. El proceso puede incluir además congelar la composición. La composición puede ser para su uso como un agente terapéutico y puede ser para su uso en el tratamiento de una enfermedad o una afección patológica o iatrogénica del colon. La enfermedad puede ser una enfermedad o afección caracterizada por una composición disfuncional o patológica de la microbiota del colon, por ejemplo, una colitis por *Clostridium difficile*.

La presente divulgación también proporciona un método de reemplazo o complementación o modificación de la microbiota de colon de un sujeto. El método puede incluir administrar al sujeto una composición descrita en el presente documento. La presente invención también proporciona un método de tratamiento de un sujeto. El método puede incluir administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de una composición descrita en el presente documento. Los métodos pueden incluir además la eliminación de parte, la mayor parte o sustancialmente toda la microbiota del colon, el ciego o los intestinos del sujeto antes de la administración. El sujeto puede tener o estar en riesgo de tener una colitis. La colitis puede ser una colitis autoinmune, tal como una enfermedad inflamatoria del intestino, una colitis ulcerosa, una enfermedad de Crohn o un síndrome del intestino irritable. La colitis puede ser una colitis infecciosa, tal como una colitis por *Clostridium difficile* o una colitis enterohemorrágica. La colitis por *Clostridium difficile* puede ser una colitis aguda por *Clostridium difficile*, una colitis por *Clostridium difficile* recidivante y una colitis por *Clostridium difficile* grave. La colitis enterohemorrágica puede ser causada por *Shigella* spp. o *E. coli*. El sujeto puede tener o estar en riesgo de tener diarrea crónica o estreñimiento crónico.

La presente divulgación también proporciona el uso de una composición descrita en el presente documento para la fabricación de un medicamento, o para la fabricación de un medicamento para tratar o mejorar o prevenir una

enfermedad o una afección patológica o iatrogénica del colon. Opcionalmente, la enfermedad es una enfermedad o afección caracterizada por una afección disfuncional o patológica de la microbiota de colon, o la enfermedad es una colitis por *Clostridium difficile*, o la enfermedad o afección es una colitis, una colitis autoinmune, una colitis infecciosa o una colitis enterohemorrágica. La presente invención proporciona la composición descrita en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por microbiota de colon disfuncional.

El término "y/o" significa uno o todos de los elementos enumerados o una combinación de de dos cualesquiera o más de los elementos enumerados.

Las palabras "preferido" y "preferentemente" se refieren a realizaciones de la invención que pueden proporcionar ciertos beneficios, en determinadas circunstancias. Sin embargo, otras realizaciones también pueden ser preferidas, en las mismas u otras circunstancias. Asimismo, la enumeración de una o más realizaciones preferidas no implica que otras realizaciones no sean útiles, y no pretende excluir otras realizaciones del alcance de la invención.

Los términos "comprende" y variaciones del mismo no tienen un significado limitante cuando estos términos aparecen en la descripción y reivindicaciones.

A menos que se especifique lo contrario, "un", "una", "el", "la" y "al menos uno" se usan indistintamente y significan uno o más de uno.

También en el presente documento, las enumeraciones de intervalos numéricos por puntos finales incluyen todos los números incluidos dentro de ese intervalo (por ejemplo, 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5, etc.).

Para cualquier método desvelado en el presente documento que incluye etapas discretas, las etapas pueden realizarse en cualquier orden posible. Y, según convenga, pueden realizarse simultáneamente cualquier combinación de dos o más etapas.

El sumario anterior de la presente invención no pretende describir cada realización desvelada o cada implementación de la presente invención. La descripción que sigue ejemplifica más particularmente realizaciones ilustrativas. En varios lugares a lo largo de la solicitud se proporciona una guía a través de listas de ejemplos, ejemplos que pueden usarse en diversas combinaciones. En cada caso, la lista citada sirve solo como grupo representativo y no deber interpretarse como una lista exclusiva.

Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

Antes de la presente invención, las prácticas estándar sugerían hacer coincidir cada receptor de bacterioterapia fecal con un donante separado, normalmente un miembro de la familia cercana, o el uso de las propias heces almacenadas del receptor para uso posterior. El fundamento de estas prácticas fue la idea de que los miembros de la familia cercana ya habían compartido sus patógenos, y que estos tipos de microbiota intestinal serían de alguna forma mejor tolerados por el sistema inmunitario del receptor debido a la exposición previa. Sin embargo, esto resultó en una evaluación duplicativa, cargando a los pacientes ya debilitados con la tarea de encontrar un donante adecuado, presión sobre el donante para proporcionar el material y potencialmente retener información médica importante, presión para reducir los costes, ya que estos normalmente corrían por cuenta del paciente, demoras asociadas con la evaluación y presión de aceptar donantes con un estado de salud inferior al óptimo durante la selección de donantes. Las composiciones presentadas en el presente documento resultan de un proceso de fabricación más normalizado con evaluación de donantes rigurosa, múltiples etapas de filtración que concentran la microbiota y eliminan la acumulación de material no vivo, y opcionalmente lo congela/descongela de forma que se preserve su viabilidad. Las composiciones presentadas en el presente documento proporcionan una ventaja significativa, haciendo útiles las composiciones de microflora de colon fácilmente disponibles para su uso por un médico para tratar a un paciente. Asimismo, es mucho más aceptable desde el punto de vista estético, dado que las composiciones son casi inodoras, están en forma concentrada y son fácilmente manipuladas usando prácticas de laboratorio estándar.

La presente invención proporciona composiciones como se define en las reivindicaciones que incluyen microbios fecales. Como se usa en el presente documento, la expresión "microbios fecales" se refiere a microorganismos que están presentes en el ciego, intestino o colon, preferentemente el colon, de un ser humano adulto sano normal. Tal composición puede prepararse mediante el procesamiento del material fecal. Como se usa en el presente documento, la expresión "material fecal" se refiere a heces humanas. El material fecal sin procesar contiene material no vivo y material biológico. El "material no vivo" puede incluir, pero no se limita a, bacterias muertas, células hospedadoras eliminadas, proteínas, hidratos de carbono, grasas, minerales, moco, bilis, fibra y otros alimentos no digeridos, y otros compuestos que resultan de alimentos y productos de desecho metabólicos y digestión parcial o completa de materiales de alimentos. "Material biológico" se refiere al material vivo en material fecal e incluye microbios que incluyen células procariotas tales como bacterias y arqueas (por ejemplo, células procariotas vivas y esporas que pueden esporular hasta convertirse en células procariotas vivas), células eucariotas tales como protozoos y hongos, y virus. En una realización, el "material biológico" se refiere al material vivo, por ejemplo, los microbios, células eucariotas y virus, que están presentes en el colon de un ser humano sano normal.

Ejemplos de células procariotas que pueden estar presentes en una composición de la presente invención incluyen células que son miembros de la clase Actinobacteria, tal como la subclase Actinobacteridae o Coriobacteridae, tal como el orden Bifidobacteriales o Coriobacteriales y/o tal como la familia Bifidobacteriaceae o Coriobacteriaceae; miembros del filo Bacteroidetes, tal como la clase Bacteroidia, tal como una clase Bacteroidales y/o tal como la familia Bacteroidaceae o Rikenellaceae; miembros del filo Firmicutes, tal como la clase Bacilli, Clostridia o Erysipelotrichi, tal como el orden Bacillales o Lactobacillales o Clostridiales o Erysipelotrichales y/o tal como la familia Paenibacillaceae o Aerocaceae o Lactobacillaceae o Streptococcaceae o Catabacteriaceae o Peptococcaceae o Peptostreptococcaceae o Ruminococcaceae o Clostridiaceae o Eubacteriaceae o Lachnospiraceae o Erysipelotrichaceae; miembros del filo Proteobacteria, tal como la clase Alphaproteobacteria o Betaproteobacteria o Gammaproteobacteria, tal como el orden Rhizobiales o Burkholderiales o Alteromonadales o Enterobacteriales, y/o tal como la familia Rhodobiaceae o Burkholderiaceae o Shewanellaceae o Enterobacteriaceae; miembros del filo Tenericutes, tal como la clase Mollicutes, tal como el orden Entomoplasmatales y/o tal como la familia Spiroplasmataceae; y/o miembros de la clase Verrucomicrobiae, tal como el orden Verrucomicrobiales y/o tal como la familia Verrucomicrobiaceae.

En una realización, una composición de la presente invención puede incluir bacterias procariotas que son miembros de al menos 1 filo, al menos 2 filos, al menos 3 filos, al menos 4 filos, al menos 5 filos, al menos 6 filos, al menos 7 filos, al menos 8 filos, al menos 9 filos o al menos 10 filos. En una realización, una composición de la presente invención puede incluir bacterias procariotas que son miembros de al menos 1 clase, al menos 2 clases, al menos 3 clases, al menos 4 clases, al menos 5 clases, al menos 6 clases o al menos 7 clases. En una realización, una composición de la presente invención puede incluir bacterias procariotas que son miembros de al menos 1 orden, al menos 2 órdenes, al menos 3 órdenes, al menos 4 órdenes, al menos 5 órdenes, al menos 6 órdenes o al menos 7 órdenes. En una realización, una composición de la presente invención puede incluir bacterias procariotas que son miembros de al menos 1 familia, al menos 2 familias, al menos 3 familias, al menos 4 familias, al menos 5 familias, al menos 6 familias o al menos 7 familias. En una realización, una composición de la presente invención puede incluir al menos 5, al menos 10, al menos 20, o al menos 30 géneros diferentes de bacterias procariotas. En una realización, una composición de la presente invención puede incluir al menos 10, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300 o al menos 400 especies diferentes de bacterias procariotas.

En una realización, una composición de la presente invención incluye no más del 5 % en peso de material no vivo/peso de material biológico (p/p), no más del 2,5 % (p/p), no más del 1 % (p/p), no más del 0,1 % (p/p), no más del 0,01 % (p/p) o no más del 0,001 % (p/p) de material no vivo. En una realización, la cantidad de material no vivo en una composición de la presente invención es indetectable usando las técnicas actualmente disponibles. Por ejemplo, el material vivo puede teñirse para actividad biológica, transporte de electrones, ADN y ARN para genes específicos.

En una divulgación, el material fecal presente en una composición no incluye partículas (por ejemplo, partículas de material no vivo y/o partículas de material biológico) que tengan un tamaño superior a 2,0 milímetros (mm), superior a 1,0 mm, superior a 0,5 mm, superior a 0,25 mm, superior a 0,212 mm, superior a 0,180 mm, superior a 0,150 mm, superior a 0,125 mm, superior a 0,106 mm, superior a 0,090 mm, superior a 0,075 mm, superior a 0,063 mm, superior a 0,053 mm, superior a 0,045 mm, superior a 0,038 mm, superior a 0,032 mm, superior a 0,025 mm, superior a 0,020 mm, superior a 0,01 mm, o superior a 0,2 mm. La composición de la presente invención no incluye partículas (por ejemplo, partículas de material no vivo y/o partículas de material biológico) que tengan un tamaño superior a 0,25 mm. El material no fecal presente en una composición puede incluir partículas que tienen un tamaño superior a 2,0 mm, superior a 1,0 mm, superior a 0,5 mm, superior a 0,25 mm, superior a 0,212 mm, superior a 0,180 mm, superior a 0,150 mm, superior a 0,125 mm, superior a 0,106 mm, superior a 0,090 mm, superior a 0,075 mm, superior a 0,063 mm, superior a 0,053 mm, superior a 0,045 mm, superior a 0,038 mm, superior a 0,032 mm, superior a 0,025 mm, superior a 0,020 mm, superior a 0,01 mm, o superior a 0,2 mm. En una divulgación, el material fecal presente en una composición consiste en, o consiste esencialmente en, partículas de material no vivo y/o material biológico que tienen un tamaño que pasará a través de un tamiz que tiene un tamaño de tamiz de 2,0 mm, 1,0 mm, 0,5 mm, 0,25 mm, 0,212 mm, 0,180 mm, 0,150 mm, 0,125 mm, 0,106 mm, 0,090 mm, 0,075 mm, 0,063 mm, 0,053 mm, 0,045 mm, 0,038 mm, 0,032 mm, 0,025 mm, 0,020 mm, 0,01 mm, o 0,2 mm. Así, en una divulgación tal, el material fecal presente en una composición tiene un tamaño que es inferior o igual a 2,0 mm, inferior o igual a 1,0 mm, inferior o igual a 0,5 mm, inferior o igual a 0,25 mm, inferior o igual a 0,212 mm, inferior o igual a 0,180 mm, inferior o igual a 0,150 mm, inferior o igual a 0,125 mm, inferior o igual a 0,106 mm, inferior o igual a 0,090 mm, inferior o igual a 0,075 mm, inferior o igual a 0,063 mm, inferior o igual a 0,053 mm, inferior o igual a 0,045 mm, inferior o igual a 0,038 mm, inferior o igual a 0,032 mm, inferior o igual a 0,025 mm, inferior o igual a 0,020 mm, inferior o igual a 0,01 mm, o inferior o igual a 0,2 mm. El tamaño de tamiz puede basarse en los tamaños de tamiz de las normas de EE.UU. de, por ejemplo, 10, 18, 35, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 170, 200, 230, 270, 325 o 400.

Una composición de la presente invención puede incluir opcionalmente un crioprotector. Un crioprotector es un compuesto que mantiene la viabilidad de los microbios fecales cuando se congelan. Los crioprotectores son conocidos en la técnica y se usan rutinariamente para proteger microbios cuando se exponen a condiciones de congelación. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos tales como alanina, glicina, prolina; azúcares simples tales como sacarosa, glucosa, lactosa, ribosa y trehalosa; y otros compuestos tales como sulfoxido de dimetilo (DMSO) y glicerol. La cantidad de crioprotector presente en una composición descrita en el presente

documento puede variar dependiendo del crioprotector usado y la temperatura que va a usarse para congelación (por ejemplo, -20 °C, -80 °C o a temperatura diferente). La cantidad de crioprotector que puede usarse es conocida para el experto o puede ser fácilmente determinada usando experimentación rutinaria. En una realización, una composición de la presente invención puede incluir glicerol a una concentración del 10 %.

En una realización, una composición de la presente invención no incluye material biológico patógeno. En una realización, el material fecal es de una persona que se ha sometido a examen de los antecedentes médicos, físico y pruebas de laboratorio. La evaluación de los antecedentes médicos puede incluir, pero no se limita a, riesgo de agentes infecciosos, presencia de comorbilidades gastrointestinales, factores que pueden afectar o afectan la composición de la microbiota intestinal y afecciones médicas sistémicas. Los criterios de exclusión con respecto al riesgo de agentes infecciosos pueden incluir, pero no se limitan a, infección viral conocida con hepatitis B, C o VIH; exposición conocida al VIH o hepatitis viral en cualquier momento; comportamientos de alto riesgo que incluyen sexo por drogas o dinero, hombres que tienen sexo con otros hombres, más de un compañero sexual en los últimos 12 meses, cualquier uso pasado de drogas intravenosas o cocaína intranasal, antecedentes de encarcelamiento; tatuaje o perforación en el cuerpo en los últimos 12 meses; viajes a áreas del mundo donde el riesgo de diarrea del viajero es mayor que en EE.UU.; y enfermedad actual transmisible, por ejemplo, infección viral de las vías respiratorias superiores.

Los criterios de exclusión relativos a las comorbilidades gastrointestinales incluyen, pero no se limitan a, antecedentes de síndrome del intestino irritable, en los que los síntomas específicos pueden incluir calambres abdominales frecuentes, exceso de gases, hinchazón, distensión abdominal, urgencia fecal, diarrea, estreñimiento; antecedentes de enfermedad inflamatoria del intestino tal como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis microscópica; diarrea crónica; estreñimiento crónico o uso de laxantes; antecedentes de tumor maligno gastrointestinal o poliposis de colon conocida; antecedentes de cualquier cirugía abdominal, por ejemplo, derivación gástrica, resección intestinal, apendectomía, colecistectomía y similares; uso de probióticos o cualquier otro auxiliar de venta libre usado por el posible donante a efectos de regular la digestión, pero se pueden permitir yogur y productos de kéfir si se toman simplemente como alimentos en vez de como complementos nutricionales.

Los criterios de exclusión relativos a factores que pueden afectar o afectan la composición de la microbiota intestinal incluyen, pero no se limitan a, antibióticos para cualquier indicación en los últimos 6 meses; cualquier medicamento inmunosupresor o antineoplásico prescrito.

Los criterios de exclusión relativos a afecciones médicas sistémicas incluyen, pero no se limitan a, síndrome metabólico establecido o emergente, donde los criterios utilizados para definición aquí son más estrictos que los criterios establecidos, incluidos antecedentes de tensión arterial elevada, antecedentes de diabetes o intolerancia a la glucosa; autoinmunidad sistémica conocida, por ejemplo, enfermedad de tejido conjuntivo, esclerosis múltiple; enfermedades atópicas conocidas, que incluye asma o eccema; síndromes de dolor crónico que incluyen fibromialgia, síndrome de fatiga crónica; uso continuado (aunque sea intermitente) de cualquier medicación prescrita, incluidos inhaladores o cremas y pomadas tópicas; trastornos neurológicos, del neurodesarrollo y neurodegenerativos, incluidos autismo, enfermedad de Parkinson.

Los criterios de exclusión del examen físico pueden incluir, pero no se limitan a, generales tal como índice de masa corporal > 26 kg/m², obesidad central definida por la relación cintura : cadera > 0,85 (hombre) y > 0,80 (mujer); tensión arterial > 135 mmHg sistólica y > 85 mmHg diastólica; piel - presencia de irritación, tatuajes o perforaciones en el cuerpo realizados en el último año, ictericia; ganglios linfáticos agrandados; sibilancia en la auscultación; hepatomegalia o estigmas de enfermedad hepática; articulaciones inflamadas o dolorosas con la palpación; debilidad muscular; examen neurológico anormal.

Los criterios de exclusión de las pruebas de laboratorio pueden incluir, pero no se limitan a, heces positivas para la toxina B de *Clostridium difficile* probada por PCR; cultivos de heces positivas para cualquiera de los patógenos rutinarios que incluyen *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7; examen anormal de huevos y parásitos; antígenos positivos de *Giardia*, *Cryptosporidium* o *Helicobacter pylori*; evaluación positiva para cualquier enfermedad viral, incluidas VIH 1 y 2, IgM de hepatitis viral A, antígeno de superficie de la hepatitis y Ab de núcleo; RPR anormal (detección de sífilis); cualquier prueba de función hepática anormal que incluye fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa; triglicéridos en suero elevados > 150 mg/dl; colesterol HDL < 40 mg/dl (hombres) y < 50 mg/dl (mujeres); CRP de alta sensibilidad > 2,4 mg/l; glucosa de plasma en ayunas elevada (> 100 mg/dl).

Las composiciones de la presente invención pueden incluirse en diversas formulaciones farmacéuticamente aceptables. En una realización, una formulación puede ser una composición fluida. Las composiciones fluidas incluyen, pero no se limitan a, soluciones, suspensiones, dispersiones y similares. En una realización, una formulación puede ser una composición sólida. Las composiciones sólidas incluyen, pero no se limitan a, polvo, gránulo, comprimido por compresión, píldora, cápsula, chicle, oblea y similares. Tales formulaciones pueden incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable para hacer que la composición sea apropiada para su administración a un sujeto. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye compuestos farmacológicamente inactivos compatibles con la administración farmacéutica. Las composiciones de la presente

invención pueden formularse para ser compatibles con su vía de administración deseada. Una composición de la presente invención puede administrarse cualquier método adecuado para depósito en el tubo gastrointestinal, preferentemente el colon, de un sujeto. Ejemplos de vías de administración incluyen administración rectal (por ejemplo, por supositorio, enema, endoscopia superior, enteroscopia por empuje superior o colonoscopia), intubación a través de la nariz o la boca (por ejemplo, mediante un tubo nasogástrico, tubo nasoentérico o tubo yeyunal nasal) o administración por vía oral (por ejemplo, mediante un sólido tal como una píldora, comprimido o cápsula, o mediante un líquido).

Para uso terapéutico en el método de la presente invención, una composición puede administrarse de forma conveniente en una forma que contiene uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Vehículos adecuados son muy conocidos en la técnica y varían en la forma y modo deseado de administración de la composición. Por ejemplo, pueden incluir diluyentes o excipientes tales como cargas, aglutinantes, agentes humectantes, disgregantes, agentes tensioactivos, deslizantes, lubricantes y similares. Normalmente, el vehículo puede ser un sólido (incluido polvo), líquido, o combinaciones de los mismos. Cada vehículo es preferentemente "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la composición y no nocivo para el sujeto. El vehículo es preferentemente biológicamente aceptable e inerte, es decir, permite que la composición mantenga la viabilidad del material biológico hasta que se administre al sitio apropiado.

Las composiciones orales pueden incluir un diluyente inerte o un vehículo comestible. Con el fin de la administración terapéutica por vía oral, el compuesto activo puede incorporarse con los excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también pueden prepararse combinando una composición de la presente invención con un alimento. En una realización, un alimento usado para administración se enfría, por ejemplo, helado. Aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes componentes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aromatizante de naranja.

Los compuestos activos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán al compuesto contra la rápida eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles tales como etileno-acetato vinilo, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Tales formulaciones pueden prepararse usando técnicas convencionales. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de, por ejemplo, en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También pueden usarse suspensiones liposomales como vehículos farmacéuticamente aceptables. Éstas pueden prepararse según métodos conocidos para los expertos en la técnica.

En una realización, una composición puede ser encapsulada. Por ejemplo, cuando la composición va a ser administrada por vía oral, la forma de dosificación se formula de forma que la composición no se exponga a las condiciones prevalentes en el tubo gastrointestinal antes del colon, por ejemplo, acidez alta y enzimas digestivas presentes en el estómago y/o intestino. La encapsulación de composiciones para uso terapéutico es rutinaria en la técnica. La encapsulación puede incluir cápsulas de cubierta dura, que pueden usarse para componentes secos en polvo, y cápsulas de cubierta blanda. Las cápsulas pueden prepararse a partir de soluciones acuosas de gelificantes tales como proteína animal (por ejemplo, gelatina), polisacáridos vegetales o derivados como carrageninas y formas modificadas de almidón y celulosa. Pueden añadirse otros componentes a una solución de gelificante tales como plastificantes (por ejemplo, glicerina y/o sorbitol), agentes colorantes, conservantes, disgregantes, lubricantes y tratamiento superficial.

Puede prepararse una composición obteniendo una muestra fecal de un donante apropiado y mezclado con un diluyente. Diluyentes útiles incluyen soluciones acuosas que son rutinariamente usadas para manipular microbios, células eucariotas y/o virus. Diluyentes útiles pueden incluir constituyentes para mantener el tamponamiento fisiológico, osmolaridad y similares. El diluyente es preferentemente estéril y/ no alergénico. Un ejemplo de un diluyente incluye, pero no se limitan a, solución salina tamponada con fosfato a pH 7. En una realización, 1 parte de heces de donante puede combinarse con 5 partes de diluyente (por ejemplo, pueden combinarse 50 gramos de heces de donante con 250 ml de diluyente) y mezclarse. En una realización, el oxígeno en la cámara de mezcla puede reducirse o quitarse purgando con un gas inerte tal como nitrógeno o argón antes de la mezcla. Tales condiciones anaerobias pueden ser útiles para mantener la viabilidad de la mayoría de las bacterias anaerobias presentes en un colon. La muestra puede mezclarse múltiples veces y/o puede añadirse más diluyente hasta que se logre una consistencia que permita que ocurran las siguientes etapas. En una realización, las condiciones anaerobias no se usan en las etapas posteriores a la mezcla. Se encontró que las condiciones anaerobias no eran necesarias en las etapas posteriores a la mezcla, y este fue inesperado y sorprendente dado que un porcentaje sustancial de células procariotas en el material fecal son anaerobias estrictas y la exposición al oxígeno las destruye.

Después de la mezcla, las soluciones usadas para el lavado y la resuspensión no necesitaron ser purgadas de oxígeno, y no se necesitó la manipulación de la microbiota en una vitrina o cámara sellada con guantes libre de oxígeno.

5 No todos los microbios y células eucariotas presentes en el colon de un individuo pueden cultivarse, por lo tanto, en una realización las condiciones para preparar una composición incluyen el uso de temperaturas que reducen la replicación de los microbios y células eucariotas. En una realización, las condiciones usadas para la preparación se mantienen por debajo de 37 °C. Por ejemplo, las condiciones usadas para la preparación se mantienen a una temperatura no superior a 30 °C, no superior a 20 °C, no superior a 10 °C o no superior a 5 °C. En una realización, se usan condiciones de forma que la replicación de los microbios y las células eucariotas no ocurra. Cuando las condiciones usadas para preparar una composición de la presente invención incluyen temperaturas más bajas para minimizar la replicación y muerte celular, el material biológico presente en una composición incluye una población de microbios, células eucariotas y virus que es esencialmente idéntica a una población de microbios, células eucariotas y virus presentes en el colon o heces de un ser humano sano normal, por ejemplo, el donante del que se obtuvo la muestra fecal.

La eliminación del material no vivo puede lograrse pasando la muestra mezclada a través de un tamiz con un tamaño de tamiz no superior a 2,0 mm, no superior a 1,0 mm, no superior a 0,5 mm, no superior a 0,25 mm, no superior a 0,212 mm, no superior a 0,180 mm, no superior a 0,150 mm, no superior a 0,125 mm, no superior a 0,106 mm, no superior a 0,090 mm, no superior a 0,075 mm, no superior a 0,063 mm, no superior a 0,053 mm, no superior a 0,045 mm, no superior a 0,038 mm, no superior a 0,032 mm, no superior a 0,025 mm, no superior a 0,020 mm, no superior a 0,01 mm, o no superior a 0,2 mm. En una divulgación, la muestra mezclada se prepara pasándola a través de un tamiz con un tamaño de tamiz de 0,25 mm y recolectando el filtrado. La composición de la presente invención se prepara por un método en el que la muestra mezclada se pasa a través de tamices con un tamaño de tamiz progresivamente más pequeños hasta el pase final a través de un tamaño de tamiz de 0,25 mm. Por ejemplo, si se usa un total de cuatro tamices, el tamaño de tamiz del primer tamiz puede ser 2 mm, seguido de 1 mm, seguido de 0,5 mm y luego seguido de 0,25 mm. El filtrado final puede recogerse en un tubo de centrifugadora, y centrifugarse a una velocidad suficiente para sedimentar el material biológico, por ejemplo, 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se elimina, las células se resuspenden en diluyente, opcionalmente se centrifugan nuevamente, por ejemplo, a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante final se desecha y las células se resuspenden en una solución acuosa (por ejemplo, diluyente, crioprotector y similares, o una combinación de los mismos). En una realización, el volumen de la mezcla combinada se reduce a través de las etapas de tamizado y lavado. Por ejemplo, en una realización, el volumen se reduce al 14 % del volumen usado en la mezcla (por ejemplo, de 250 ml a 35 ml). En una realización, el volumen de la mezcla se reduce a través de las etapas de tamizado y lavado para producir entre 1×10^{10} y 5×10^{10} células en un volumen que posteriormente se administra a un sujeto. Este proceso produce un extracto de heces que está altamente enriquecido en toda la microbiota de colon que es capaz de pasar a través de un tamiz como se describió anteriormente, y puede centrifugarse a 10.000 x g durante 10 minutos. Como se usa en el presente documento, "enriquecido" se refiere a aumentar la abundancia del material biológico con respecto al material no vivo, de forma tal que el material biológico constituya una proporción significativamente más alta en comparación con el material fecal antes del enriquecimiento. El término "enriquecido" se refiere a aquellas situaciones en las que una persona ha intervenido para elevar la proporción de material biológico.

La cantidad de solución acuosa añadida puede ser una cantidad que produzca una única dosificación que tenga un número apropiado de células. En una realización, una única dosificación puede incluir entre 1×10^{10} y 5×10^{10} células, por ejemplo, 3×10^{10} células. Como la mayoría del material biológico es difícil o imposible de cultivar, puede usarse un hemocitómetro para determinar el número de células.

En una realización, el sedimento resultante puede suspenderse en la mitad del volumen original de diluyente que contiene 10 % de glicerol. La muestra puede usarse inmediatamente, o puede congelarse, por ejemplo, a -80 °C, para uso posterior. Cuando se congela, la muestra puede dejarse en un tubo de centrifugadora, o pueden estar en un recipiente diferente. En una realización, el recipiente es uno que aumenta el área superficial de la muestra. Por ejemplo, la muestra puede colocarse en una bolsa IV. Cuando la muestra congelada deba usarse, puede descongelarse sobre hielo y luego trasplantarse al receptor. Se encontró que la congelación de las composiciones descritas en el presente documento no produjo la destrucción de su potencial curativo. En una realización, la muestra que resulta de la centrifugación puede procesarse para almacenamiento a largo plazo de 1 año o más. La capacidad de almacenamiento de una muestra tal proporciona un nivel de flexibilidad que no fue posible con otros métodos. Por ejemplo, fue necesario identificar rápidamente un donante, procesar rápidamente una muestra fecal del donante y usarla inmediatamente. Ejemplos de métodos de procesamiento útiles incluyen, pero no se limitan a, congelación, liofilización, secado por pulverización, secado al vacío, secado con aire, u otras formas de secado evaporativo. El procesamiento de una composición de la presente invención puede incluir la producción de un polvo tras cualquier procedimiento de secado.

El uso de tamices para extraer el material biológico del material fecal produjo inesperadamente una composición que era casi inodora. Esto no estaba previsto debido a que las heces normalmente tienen un olor distintivo y fue sorprendente que se eliminara por la mínima manipulación usada. Esto es una ventaja significativa porque toma un

método que es poco estético y tan desagradable que algunos pacientes y personal rehúsan a realizarlo, y lo cambia en un método que se pone en práctica fácilmente en un contexto clínico normal o en el hogar. Como se usa en el presente documento, "inodoro" significa que hay una cantidad reducida de moléculas orgánicas volátiles presentes, y la cantidad reducida de moléculas orgánicas volátiles presentes puede ser fácilmente detectada por una persona comparando el material antes del procesamiento con el material después del procesamiento.

La composición de la presente invención puede usarse en diversos métodos descritos en el presente documento. Un método incluye administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de una composición descrita en el presente documento. La administración es en condiciones adecuadas para la deposición de la composición en una región del intestino grueso o delgado de forma que el material biológico en la composición colonice el colon. Por ejemplo, la administración puede ser en el tubo gastrointestinal superior, así como el tubo gastrointestinal inferior, por ejemplo, el íleon terminal, ciego, áreas colónicas que contienen diverticulosis y el recto. La administración puede ser oral, tal como mediante un comprimido. La administración puede ser por intubación, tal como mediante tubo nasogástrico. La administración puede ser rectal, por ejemplo, mediante colonoscopia, enema o supositorio. Condiciones que son "adecuadas" para que ocurra un acontecimiento, o condiciones "adecuadas" son condiciones que no previenen que se produzcan tales acontecimientos. Así, estas condiciones permiten, mejoran, facilitan y/o contribuyen al acontecimiento. Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente de una composición descrita en el presente documento para proporcionar el efecto deseado. Por ejemplo, una "cantidad eficaz" es una cantidad eficaz para aliviar uno o más síntomas y/o signos de la enfermedad como se describe en el presente documento. Una cantidad eficaz puede ser una cantidad que es suficiente para efectuar una reducción de un síntoma y/o signo asociado con una enfermedad, tal como diarrea o *C. difficile*. Una reducción de un síntoma y/o signo es, por ejemplo, al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos el 100 % de un signo medido en comparación con un control, un sujeto sin tratar, o el sujeto antes de la administración de la composición. Una cantidad eficaz puede ser una cantidad suficiente para producir al menos 1×10^{10} , al menos 3×10^{10} o al menos 5×10^{10} células administradas al colon. Se entenderá, sin embargo, que la dosificación total de las composiciones como se desvela en el presente documento será decidida por el médico adjunto dentro del alcance de criterio médico sensato. La cantidad exacta requerida variará dependiendo de factores tales como el tipo y alcance de la enfermedad que está tratándose.

Un método de la presente divulgación incluye tratar ciertas enfermedades en un sujeto en necesidad de tratamiento. El sujeto puede ser un mamífero, tal como un ser humano. Pueden usarse modelos animales, tales como un mamífero, que incluyen una rata, un ratón, un hámster, un jerbo o un primate. Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad" se refiere a cualquier desviación de o interrupción de la estructura o función normal de una parte, órgano, o sistema, o combinación de los mismos, de un sujeto que se manifiesta mediante un síntoma característico o signo clínico. Enfermedades incluyen aquellas caracterizadas por composición disfuncional de la microbiota de colon. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, colitis, que incluye colitis autoinmune (por ejemplo, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, síndrome del intestino irritable) y colitis infecciosa. Ejemplos de colitis infecciosa incluyen, pero no se limitan a, colitis por *Clostridium difficile* (por ejemplo, colitis por *C. difficile* aguda, colitis por *C. difficile* recidivante o colitis por *C. difficile* grave) y colitis enterohemorrágica (por ejemplo, una colitis causada por *Shigella* spp. o *E. coli*). Otros ejemplos de enfermedad incluyen, pero no se limitan a, diarrea crónica; estreñimiento crónico, síndrome metabólico y obesidad, enfermedad atópicas que incluyen asma, eccema, trastornos eosinofílicos del tubo GI, autoinmunidad sistémica que incluye artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, esclerosis múltiple, etc., trastornos de dolor crónico tales como fibromialgia, síndrome de fatiga crónica, trastornos neurodegenerativos, trastornos de la alimentación y desnutrición.

Como se usa en el presente documento, el término "síntoma" se refiere a pruebas subjetivas de enfermedad o afección experimentadas por el paciente y causadas por enfermedad. Como se usa en el presente documento, el término "signo clínico" o simplemente "signo" se refiere a pruebas objetivas de una enfermedad presente en un sujeto. Los síntomas y/o signos asociados con las enfermedades a las que se hace referencia en el presente documento y la evaluación de tales signos son rutinarios y conocidos en la técnica. Normalmente, puede determinarse si un sujeto tiene una enfermedad y si un sujeto está respondiendo al tratamiento evaluando los signos asociados con la enfermedad.

El tratamiento de una enfermedad puede ser profiláctico o, alternativamente, puede ser iniciado después del desarrollo de una enfermedad. El tratamiento que es profiláctico, por ejemplo, iniciado antes de que un sujeto manifieste los signos de una enfermedad, se denomina en el presente documento tratamiento de un sujeto que está "en riesgo" de desarrollar una enfermedad. Un ejemplo de un sujeto que está en riesgo de desarrollar una enfermedad es una persona que tiene un factor de riesgo. Un ejemplo de un factor de riesgo para colitis por *Clostridium difficile* es la terapia con antibióticos del tubo gastrointestinal. El tratamiento puede realizarse antes, durante o después de la aparición de las enfermedades descritas en el presente documento. El tratamiento iniciado después del desarrollo de una enfermedad puede producir una disminución de la gravedad de los signos de la enfermedad, o eliminar completamente los signos.

Un método de la presente divulgación incluye trasplantar una microbiota de un donante a un receptor.

Un método de la presente divulgación incluye aumentar la abundancia relativa de miembros del filo Firmicutes, tal como un miembro no patógeno de la clase Clostridia, y/o miembros del filo Bacteroidetes, en el colon de un receptor. La expresión "abundancia relativa" se refiere al número de miembros de un filo o clase en comparación con el número de miembros de todos los otros taxones en el colon de un receptor. Una comparación tal puede expresarse como un porcentaje. La abundancia relativa de miembros no patógenos de la clase de Clostridia en el colon de un receptor después de la administración puede aumentarse al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 20 % o al menos el 50 %, en comparación con el colon de un receptor antes de la administración. La abundancia relativa de miembros del filo Firmicutes en el colon de un receptor después de la administración puede aumentarse al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 20 % o al menos el 50 %, en comparación con el colon de un receptor antes de la administración. El cambio en la abundancia puede determinarse, por ejemplo, 3 días, 10 días, 15 días o 25 días después de la administración de la microbiota fecal.

Un método de la presente divulgación incluye reducir la abundancia relativa de miembros del filo Proteobacteria en el colon de un receptor. La abundancia relativa de miembros del filo Proteobacteria en el colon de un receptor después de la administración puede reducirse al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 % o al menos el 40 %, en comparación con el colon de un receptor antes de la administración. El cambio en la abundancia de los miembros del filo Proteobacteria puede determinarse, por ejemplo, 3 días, 10 días, 15 días o 25 días después de la administración.

La microbiota existente no necesita ser eliminada antes de la administración de una composición de la presente invención. La eliminación de la microbiota puede ser necesaria. Los métodos para la eliminación de la microbiota existente son conocidos y rutinarios. En un ejemplo, la eliminación puede llevarse a cabo administrando una mezcla de antibióticos durante una semana hasta un día antes del trasplante. Un ejemplo de una mezcla útil es metronidazol (1000 mg dos veces al día), rifaximina (550 mg dos veces al día), vancomicina (500 mg dos veces al día) y neomicina (1000 mg dos veces al día).

La presente invención se ilustra por los siguientes ejemplos.

Hasta el punto que los ejemplos contienen materia que se encuentra fuera del alcance de la presente invención, están incluidos simplemente para fines de referencia.

Ejemplo 1

La enfermedad asociada con *Clostridium difficile* es una complicación conocida importante de la terapia con antibióticos. El patógeno normalmente se mantiene bajo control mediante la microbiota del colon nativa, pero este nivel de protección puede perderse cuando estas comunidades microbianas son suprimidas por los antibióticos. Los antibióticos usados para tratar la infección por *C. difficile* también pueden perpetuar su reaparición mediante la supresión continuada de la microbiota normal. Por lo tanto, una fracción significativa de pacientes sufre infección por *C. difficile* persistente y la infección por *C. difficile* persistente está asociada con una morbilidad significativa. La bacterioterapia fecal es un método cada vez más usado para romper el ciclo de reaparición de la infección por *C. difficile* supuestamente a través de la restauración de las comunidades microbianas intestinales normales. Los presentes inventores informaron previamente, en un caso clínico, que la bacterioterapia de microbiota del colon produjo el reemplazo de una microbiota del hospedador por la del donante (Khorats, et al., 2010, J. Clin. Gastroenterol., 44(5):354). Con el fin de obtener una mayor comprensión de la composición y estabilidad de las comunidades microbianas antes y después de la bacterioterapia, los presentes inventores han analizado regiones de ARNr 16S amplificadas de ADN fecal (V5 y V6) usando una tecnología de pirosecuenciación (Illumina HiSeq2000 u otras plataformas Illumina). Actualmente están siendo procesados y analizados individuos adicionales.

Introducción

- *Clostridium difficile* es un patógeno emergente y la causa más común de diarrea intrahospitalaria.
- Las infecciones están frecuentemente asociadas con la terapia con antibióticos, donde está alterado el efecto protector proporcionado por la flora intestinal normal.
- La infección por *C. difficile* se controla frecuentemente mediante una terapia antimicrobiana adicional, pero aproximadamente el 20 % de los pacientes desarrolla una enfermedad refractaria que resulta en diarrea recurrente.
- Se ha mostrado que la bacterioterapia, en forma de un trasplante fecal, trata satisfactoriamente la infección por *C. difficile* refractaria.
- Las tecnologías de secuenciación de última generación han permitido un interrogatorio más profundo de la microflora intestinal y se usó en el estudio de los presentes inventores para examinar cambios en la estructura de la comunidad microbiana después del trasplante.

Se obtuvo material fecal del donante del hijo del paciente, que se probó para enfermedad infecciosa, que incluye *C. difficile*, virus de la hepatitis A, B o C, virus de VIH, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Shigella*, *E. coli* O157:H7, *Helicobacter pylori*, *Treponema pallidum*, *Giardia* y *Cryptosporidium*.

- 5 Se infundió el paciente con material fecal del donante mediante colonoscopia, que reveló diverticulosis extensa grave en el colon sigmoideo. El material fecal del donante se depositó en el ciego. Los síntomas según la infección por *C. difficile* se resolvieron en un plazo de días desde la bacterioterapia.

Métodos

- 10
- Se recogieron muestras fecales del paciente el día -31 antes de la bacterioterapia de trasplante fecal y en los días 5, 21, 46, 95, 132, 159, 188 y 227 después del trasplante. Se recogió una muestra fecal del donante el día del procedimiento y se depositó en el ciego del receptor.
- 15
- Se extrajo ADN de los materiales fecales usando un kit de ADN fecal MOBIO Ultra-clean (MOBIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA) según las indicaciones del fabricante. Se extrajeron y agruparon muestras por triplicado.
- 20
- Se amplificó la región hipervariable V6 del gen ARNr 16S de las bacterias usando 50 ng de ADN extraído como molde. Se usaron cebadores con código de barra para una secuenciación múltiplex (Kysela et al., 2005, *Environmental Microbiology* 7:356- 64 y Claesson et al., *Nucleic Acids Research*, 2010, Vol. 38, No. 22 e200 doi:10.1093/nar/gkq873). Se prepararon y agruparon muestras por triplicado.
- 25
- Se mezclaron muestras amplificadas en relaciones equimolares y se secuenciaron en el Centro Nacional de Investigación Genómica (NCGR) usando la plataforma de secuenciación Illumina.
- 30
- Se analizaron datos de secuencia usando MOTHUR y la base de datos de referencia SILVA (Scholss, 2009, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 (23) :7537-7541). La taxonomía de unidades taxonómicas operacionales (OTU) se asignaron al 97 % de similitud usando los archivos de referencia GreenGenes.
- 30
- Se hizo el análisis de los componentes principales usando el cálculo theta de Yue y Clayton (Yue y Clayton, 2005, *Commun. Stat. Theor. Methods*, 34:2123-2131). Las curvas de acumulación se calcularon basándose en el 97 % de similitudes de OTU.

Resultados y análisis

- 35
- Más del 40 % de las secuencias obtenidas de la muestra pre- trasplante del receptor (día -31) perteneció a cepas de Mollicutes sin clasificar o Gammaproteobacteria.
- 40
- Por el contrario, las muestras post-trasplante del donante y del receptor estuvieron dominadas por Firmicutes. Los miembros sin clasificar de la familia de los Clostridiales y los Ruminococcaceae fueron abundantes.
- 45
- El análisis de la comunidad hecho usando el índice theta de Yue y Clayton mostró que las muestras post-trasplante se agruparon más estrechamente entre sí y con la muestra del donante, en comparación con la de la muestra pre-trasplante del receptor.
- 50
- El análisis de secuencia indicó que los taxones presentes en las muestras fecales pre- y post-trasplante del receptor difirieron considerablemente, sugiriendo que la bacterioterapia fecal fue satisfactoria en alterar la microflora intestinal del paciente.
- 50
- La comunidad microbiana trasplantada en el intestino del receptor permaneció bastante estable después de 7,5 meses post- trasplante.

Sorprendentemente, las secuencias que representan los Bacteroidales se encontraron en abundancia bastante baja en todas las muestras analizadas.

Ejemplo 2

Evaluación de donantes para la preparación de material de microbiota fecal

- 60 El donante se somete a un examen completo de los antecedentes médicos y físico. Además, se completa un cuestionario completo sobre los antecedentes del donante según recomienda la FDA para donantes de sangre y se excluyen posibles donantes que dicen sí a cualquiera de las preguntas (<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/BloodDonorScreening/UCM213552.pdf>). Sin embargo, como la microbiota intestinal se ha asociado o se ha

supuesto que se relaciona con afecciones médicas múltiples, el proceso de selección es más riguroso que el de los donantes de sangre e incluye prácticamente cualquier enfermedad sistémica.

Criterios de inclusión

5

1. Edad > 18
2. Capacidad de proporcionar consentimiento informado.

Criterios de exclusión

10

I. Antecedentes médicos

A. Riesgo de agente infeccioso.

15

1. Infección viral conocida con hepatitis B, C o VIH
2. Exposición conocida a VIH o hepatitis viral en cualquier momento.
3. Comportamientos de alto riesgo incluyendo sexo por drogas o dinero, hombres que han tenido sexo con hombres, más de un compañero sexual en los últimos 12 meses, cualquier uso pasado de drogas intravenosas o cocaína intranasal, antecedentes de encarcelamiento.

20

4. Tatuaje o perforación en el cuerpo en los últimos 12 meses.
5. Viaje a áreas del mundo donde el riesgo de diarrea del viajero es mayor que en EE.UU.
6. Enfermedad transmisible actual, por ejemplo, infección viral de las vías respiratorias superiores.

B. Comorbilidades gastrointestinales.

25

1. Antecedentes de síndrome del intestino irritable. Síntomas específicos pueden incluir calambres abdominales frecuentes, exceso de gases, hinchazón, distensión abdominal, urgencia fecal, diarrea, estreñimiento.

30

2. Antecedentes de enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis microscópica.

3. Diarrea crónica.

4. Estreñimiento crónico o uso de laxantes.

5. Antecedentes de tumor maligno gastrointestinal o poliposis de colon conocida.

35

6. Antecedentes de cualquier cirugía abdominal, por ejemplo, derivación gástrica, resección intestinal, apendectomía, colecistectomía, etc.

7. Uso de probióticos o cualquier otro auxiliar de venta libre usado por el posible donante a efectos de regular la digestión. Yogurt y productos de kéfir son permitidos si se consumen simplemente como alimentos en vez de como complementos nutricionales.

40

C. Factores que pueden afectar o afectan la composición de la microbiota intestinal.

1. Antibióticos para cualquier indicación en los últimos 6 meses.
2. Cualquier medicamento inmunosupresor o antineoplásico prescrito.

45

D. Afecciones médicas sistémicas.

50

1. Síndrome metabólico, establecido o emergente. Los criterios usados para la definición aquí son más estrictos que cualquier criterio establecido. Éstos incluyen antecedentes de tensión arterial elevada, antecedentes de diabetes o intolerancia a la glucosa.

2. Autoinmunidad sistémica conocida, por ejemplo, enfermedad de tejido conjuntivo, esclerosis múltiple.

3. Enfermedades atópicas conocidas, incluyendo asma o eccema.

7. Síndromes de dolor crónico, incluyendo fibromialgia, síndrome de fatiga crónica.

4. Uso continuo (aunque sea intermitente) de cualquier medicación prescrita, incluyendo inhaladores o cremas y pomadas tópicas.

55

5. Trastornos neurológicos, del neurodesarrollo y neurodegenerativos que incluyen autismo, enfermedad de Parkinson.

II. Criterios de exclusión del examen físico.

60

1. Generales. Índice de masa corporal >26 kg/m², obesidad central definida por la relación cintura : cadera > 0,85 (hombre) y > 0,80 (mujer).

2. Presión sanguínea > 135 mmHg sistólica y >85 mmHg diastólica.

3. Piel - presencia de una irritación, tatuajes o perforaciones en el cuerpo realizados en el último año, ictericia.

65

4. Ganglios linfáticos agrandados.

5. Sibilancia en la auscultación.

6. Hepatomegalia o estigma de enfermedad hepática.
7. Articulaciones inflamadas o dolorosas con la palpación. Debilidad muscular.
8. Examen neurológico anormal.

5 III. Criterios de exclusión en las pruebas de laboratorio.

1. Heces positivas para la toxina B de *Clostridium difficile* probada por PCR.
2. Cultivos de heces positivas para cualquiera de los patógenos rutinarios que incluyen *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7.
- 10 3. Examen anormal de huevos y parásitos.
4. Antígenos de *Giardia*, *Cryptosporidium* o *Helicobacter pylori* positivos.
5. Evaluación positiva para cualquier enfermedad viral, incluyendo VIH 1 y 2, IgM de hepatitis viral A, antígeno de superficie de hepatitis y Ab de núcleo.
6. RPR anormal (detección de sífilis).
- 15 7. Cualquier prueba de función hepática anormal incluyendo fosfatasa alcalina, aspartato aminotransaminasa, alanina aminotransferasa.
8. Triglicéridos en suero elevados > 150 mg/dl
9. Colesterol HDL < 40 mg/dl (hombres) y < 50 mg/dl (mujeres)
- 20 10. CRP de alta sensibilidad >2,4 mg/l
11. Glucosa en plasma en ayunas elevada (> 100 mg/dl)

Ejemplo 3

Procesamiento de muestras fecales

25 El material fecal del donante se enfría inmediatamente sobre hielo para el transporte al laboratorio. Las muestras se procesan en el plazo de una hora después de la recogida.

30 Las muestras fecales se homogeneizan mezclando 50 g de heces del donante y 250 ml de solución salina tamponada con fosfato estéril, pH 7, (PBS) en una mezcladora Waring. La cámara de mezcla se purga con gas nitrógeno durante varios minutos para eliminar el oxígeno antes de la homogenización. Las muestras se mezclan tres veces en la configuración más baja durante 20 segundos. Pueden añadirse PBS adicional o ciclos de mezcla dependiendo de la consistencia de la suspensión fecal. Las muestras mezcladas se pasan a través de una serie de cuatro tamices con tamaños de poro de 2,0 mm, 1,0 mm, 0,5 mm y 0,25 mm (W.S. Tyler Industrial Group, Mentor, OH). Los tamices se basaron en tamaños de tamiz de la norma de EE.UU. de 10, 18, 35, y 60 durante 2,0 mm, 1,0 mm, 0,5 mm y 0,25 mm, respectivamente. El filtrado final que pasa a través de los tamices (fracción inferior a 0,25 mm) se recoge en tubos cónicos de centrifugadora de 50 ml y se centrifuga a 4.000 rpm (aproximadamente 4.000 x g) durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descarta y el sedimento se suspende en la mitad del volumen original de PBS (por ejemplo, 125 ml) que contiene 10 % de glicerol. Las muestras se usan inmediatamente o se almacenan congeladas a -80 °C y se descongelan sobre hielo antes del trasplante.

Ejemplo 4

45 Este ejemplo informa de la experiencia clínica con 43 pacientes consecutivos que se trataron para una infección por *C. difficile* recurrente (CDI). Durante este tiempo se simplificó la identificación y evaluación de donantes moviéndose de donantes individuales identificados como pacientes a donantes voluntarios estándar. La preparación del material cambió de la sala de endoscopia a un proceso normalizado en el laboratorio y finalmente al almacenamiento en banco de material fecal procesado congelado que está listo para uso cuando se necesite. La normalización de la preparación del material simplificó significativamente los aspectos prácticos del tratamiento sin la pérdida de eficacia aparente en eliminar la CDI recurrente. Aproximadamente el 30 % de los pacientes tenían la enfermedad inflamatoria del intestino subyacente y el tratamiento fue igualmente de eficaz en este grupo. Varias etapas clave en la normalización de la preparación del material del donante simplificaron significativamente la práctica clínica del tratamiento de CDI recurrente en pacientes que fallaron en la terapia con antibióticos. Esto también se informa en Hamilton et al., Am. J. Gastroenterol., 2012, doi:10.1038/ajg.2011.482.

Métodos

Pacientes

60 Este informe incluye los primeros 43 pacientes que recibieron el trasplante de microbiota fecal (FMT) para CDI recurrente. Todos los pacientes fueron identificados por referencia directa de profesionales clínicos en enfermedad infecciosa y prácticas de gastroenterología en el área metropolitana de Minneapolis y St. Paul. Los criterios de inclusión para FMT incluyeron antecedentes de infección sintomática, positiva para toxina, por *C. difficile* y al menos dos reapariciones posteriores documentadas a pesar del uso de terapia con antibióticos estándar. Al menos 65 régimen de antibióticos fallido tenía que incluir un mínimo de un ciclo de 6 semanas de dosificación de vancomicina cada vez más baja o pulsada, o al menos un ciclo de vancomicina de un mes seguido de un "perseguidor" de

rifaximina de un mínimo de dos semanas. Los únicos criterios de exclusión en el protocolo fueron edad < 18 y fragilidad médica de problemas no por *C. difficile* que resultaron en una esperanza de vida de < 1 año. En la última situación los presentes inventores aconsejaron a los pacientes que la mejor opción terapéutica era un ciclo indefinido de vancomicina. Todos los pacientes dieron consentimiento informado para el FMT a través de colonoscopia, reconociendo una experiencia relativamente limitada con este enfoque del tratamiento y las incógnitas intrínsecas asociadas con su uso. El Comité de ética médica en la Universidad de Minnesota aprobó la recogida prospectiva de datos de resultados clínicos, mientras que reconoció que esta experiencia no constituía un ensayo clínico, y como tal no se diseñó para probar la eficacia del FMT en comparación con cualquier otra opción terapéutica.

Identificación y cribado de donantes

Al comienzo del programa se les pidió a los pacientes que auto-identificaran posibles donantes. Éstos incluían madres (n=2), hijas (n=1), hijos (n=3), esposas (n=1), maridos (n=1) y amigos (n=2). Antes del reclutamiento, se solicitó a los donantes que presentaran historias médicas disponibles y que tuvieran una entrevista sobre los antecedentes médicos por separado lejos del paciente receptor. La historia incluyó: evaluación del riesgo infeccioso, incluyendo la identificación de factores de riesgo conocidos para VIH y hepatitis, enfermedades transmisibles actuales y viaje reciente a áreas del mundo con una prevalencia más alta de enfermedades diarreicas. Los criterios de exclusión de los donantes adicionales absolutos incluyeron comorbilidades gastrointestinales y el uso de antibióticos en el plazo de los tres meses precedentes. Como es probable que la microbiota intestinal esté implicada en diversos aspectos del metabolismo de la energía y el funcionamiento del sistema inmunitario, la presencia de características del síndrome metabólico, autoinmunidad o enfermedades alérgicas fueron tratadas como criterios de exclusión relativos. Los donantes proporcionaron consentimiento informado por separado para participar en el protocolo, que incluyó riesgos asociados con la evaluación de laboratorio. Los donantes se sometieron a una prueba serológica para VIH y hepatitis B y C, y la prueba de heces que incluyó la evaluación de patógenos entéricos rutinarios, toxina B de *C. difficile* y examen de huevos y parásitos y antígenos de *Giardia* y *Cryptosporidium*.

Dadas las dificultades logísticas variables en el reclutamiento de donantes identificados como pacientes individuales, la falta de disponibilidad de materiales de donantes cuando se necesitan, y que ninguna evidencia sugiera una ventaja terapéutica clara de uso de un donante relacionado frente a uno no relacionado (por ejemplo, hijo o hija frente a amigo o compañero), se reclutaron donantes voluntarios en el programa de FMT. Las ventajas de este cambio incluyeron retirar la carga de la identificación del donante del paciente, mejorar la eficiencia y los costes relacionados con la evaluación de los donantes, un suministro más consistente de la microbiota fecal del donante y la capacidad de imponer criterios de exclusión extensivos y rigurosos en la selección de donantes (Tabla 1). Durante este periodo se reclutaron dos voluntarios no remunerados y uno de ellos proporcionó la mayor parte del material fecal donado. Se revisaron los antecedentes médicos de los donantes antes de cada donación y se realizó la evaluación de laboratorio completa, como se ha descrito anteriormente, cada 6 meses.

Tabla 1. Criterios de exclusión de donantes.

Criterios de exclusión de donantes	Examen de antecedentes y físico	Evaluación de laboratorio
Riesgo de agente infeccioso	1. Infección por VIH o hepatitis B, C conocida. 2. Exposición conocida a VIH o hepatitis viral en cualquier momento. 3. Comportamientos de alto riesgo incluyendo sexo por drogas o dinero, hombres que han tenido sexo con hombres, más de un compañero sexual en los últimos 12 meses, antecedentes de encarcelamiento, cualquier uso pasado de drogas intravenosas o cocaína intranasal. 4. Tatuaje o perforación en el cuerpo en los últimos 12 meses. 5. Viaje a áreas del mundo con riesgo elevado de diarrea del viajero. 6. Enfermedad transmisible actual, por ejemplo, infección viral de las vías respiratorias superiores.	1. Ab para VIH 1 y 2. 2. IgM de hepatitis viral A. 3. Ag de superficie de hepatitis B y Ab de núcleo. 4. Ab de VHC. 5. RPR. 6. Cultivos de heces para patógenos entéricos que incluyen <i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>, <i>Yersinia</i>, <i>Campylobacter</i>, <i>E. coli</i> O157:H7. 7. Examen de huevos y parásitos. 8. Antígenos de <i>Giardia</i>, <i>Cryptosporidium</i> o <i>Helicobacter pylori</i> de heces positivos. 9. PCR de toxina B de <i>Clostridium difficile</i> 10. Pruebas de función hepática incluyendo fosfatasa alcalina, AST, ALT.

Comorbilidades gastrointestinales	1. Antecedentes de síndrome del intestino irritable o cualquiera de los síntomas asociados, incluyendo calambres abdominales frecuentes, exceso de gases, hinchazón, distensión abdominal, urgencia fecal, diarrea o estreñimiento. 2. Antecedentes de enfermedad inflamatoria del intestino tal como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis linfocítica. 3. Diarrea crónica. 4. Estreñimiento crónico o uso de laxantes. 5. Antecedentes de tumor maligno gastrointestinal o poliposis de colon conocida. 6. Antecedentes de cualquier cirugía abdominal, por ejemplo, derivación gástrica, resección intestinal, apendectomía, colecistectomía, etc. 7. Uso de probióticos o cualquier otra ayuda de venta libre para fines específicos de regular la digestión.	
Criterios de exclusión de donantes	Examen de antecedentes y físico	Evaluación de laboratorio
Afecciones médicas sistémicas	1. Síndrome metabólico establecido o cualquier característica temprana que sugiere su aparición. Índice de masa corporal > 26 kg/m², relación cintura : cadera > 0,85 (hombre) y > 0,80 (mujer); TA > 135 mmHg sistólica y > 85 mmHg diastólica. 2. Autoinmunidad sistémica conocida, por ejemplo, enfermedad de tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, etc. 3. Enfermedades atópicas conocidas incluyendo asma o eccema. 4. Síndromes de dolor crónico incluyendo fibromialgia, síndrome de fatiga crónica. 5. Uso continuo (aunque sea intermitente) de cualquier medicación prescrita, incluyendo inhaladores o cremas y pomadas tópicas. 6. Trastornos neurológicos, del neurodesarrollo y neurodegenerativos incluyendo autismo, enfermedad de Parkinson, etc. 7. Presencia de una irritación de piel, sibilancia en la auscultación, linfadenopatía, hepatomegalia o cualquier estigma de enfermedad hepática, articulaciones inflamadas o dolorosas con la palpación, debilidad muscular, examen neurológico anormal.	1. Triglicéridos en suero (> 150 mg/dl). 2. Colesterol HDL < 40 mg/dl (hombres) y < 50 mg/dl (mujeres). 3. CRP de alta sensibilidad > 2,4 mg/l 4. Glucosa en plasma en ayunas > 100 mg/dl. 5. Pruebas de función hepática incluyendo fosfatasa alcalina, AST, ALT. 6. FANA.
Factores adicionales que se sabe	1. Antibióticos para cualquier	

que afectan la composición de la microbiota intestinal	indicación en los últimos 6 meses.	
--	------------------------------------	--

Preparación del material de donantes

Los donantes identificados como pacientes individuales usados en la fase temprana del programa ingresaron al centro de endoscopia ambulatoria 1-2 h antes del procedimiento programado. El material fecal se recogió en un recolector de muestras de tipo sombrero y se procesó en un baño con tales fines separado de la sala de procedimiento. Se dispusieron aproximadamente 50 gm de material fecal en una mezcladora comercial estándar (Oster, Subebeam Corp, Rye, NY) y homogeneizó en 250 ml de solución salina normal no bacteriostática estéril. La suspensión se pasó entonces a través de filtros de té de acero inoxidable para eliminar partículas grandes que pudieran interferir con la carga de las jeringas.

El material obtenido de los donantes "universales" voluntarios se transportó sobre hielo al laboratorio, donde se procesó en el plazo de dos horas desde la recogida. El material se pesó y se homogeneizó en una mezcladora comercial en una vitrina biológica con tales fines. La suspensión se pasó entonces a través de tamices de laboratorio de acero inoxidable de 2,0 mm, 1,0 mm, 0,5 mm y 0,25 mm (W. S. Tyler, Inc., Mentor, OH) para eliminar los alimentos sin digerir y el material en partículas más pequeño. El material resultante que pasó a través del tamiz de 0,25 mm se centrifugó a 6.000 x g durante 15 min en un rotor Sorvall SS-34 y se resuspendió a la mitad del volumen original en solución salina normal no bacteriostática. La suspensión de bacterias fecales concentradas resultante se administró al paciente inmediatamente o se corrigió con glicerol de calidad farmacéutica estéril (Sigma, St. Louis, MO) a una concentración final del 10 % y se almacenó congelada a -80 °C durante una a ocho semanas hasta que se usó. La descongelación se hizo durante 2-4 horas en un baño de hielo antes del procedimiento de FMT. La preparación congelada se diluyó a 250 ml con solución salina normal no bacteriostática antes de la infusión en el donante. Este extracto de material fecal, ya fuera fresco o congelado, era casi inodoro y de viscosidad reducida, color y textura con respecto al material temprano preparado en el centro de endoscopia. La filtración del material del donante permitió una carga sin esfuerzo de jeringas de punta larga de 60 ml sin el riesgo de obstruirse. Todos los recipientes, botellas y tamices usados en la preparación del material fueron esterilizados antes de su uso. El material fecal de los donantes universales se trató del mismo modo que el obtenido de los donantes identificados como pacientes.

Procedimiento de trasplante

Los pacientes se mantuvieron en una dosis completa de vancomicina (125 mg, 4 veces diarias, por la boca) hasta dos días antes del procedimiento de FMT. El día antes del procedimiento, los pacientes se prepararon usando una purga de polietilenglicol de dosificación fraccionada (GoLYTELY o Moviprep), que es estándar en la unidad de endoscopia de los presentes inventores, antes de las colonoscopias para lavar el antibiótico residual y el material fecal. Los pacientes se sometieron a una colonoscopia completa con sedación consciente. Se tomaron biopsias de mucosa para descartar colitis linfocítica en ausencia de enfermedad inflamatoria del intestino obvia. La mayoría del material del donante preparado (220-240 ml) se administró a través del canal de biopsia del colonoscopio en el íleon y ciego terminal del paciente. Sin embargo, en algunos casos, también se infundió una pequeña porción (50 ml) en áreas colónicas que contenían diverticulosis máxima. El procedimiento de recuperación fue idéntico al rutinariamente usado para los pacientes de colonoscopia estándar. Se pidió que todos los pacientes se pusieran en contacto con el endoscopista en caso de reaparición del síntoma, se siguieron formalmente en el consultorio 1-2 meses después del procedimiento. La eliminación de CDI se definió mediante la resolución de diarrea y prueba de heces negativa para la detección de *C. difficile* 2 meses después del FMT. Todos los pacientes en este protocolo también participaron en un estudio que examinaba la estructura de la comunidad bacteriana fecal, que implicó la recogida de especímenes fecales en los días 3, 7, 14 y 1, 3, 6 y 12 meses después del procedimiento. El personal de investigación recogió estos especímenes de los lugares de residencia del paciente, proporcionando oportunidades adicionales para el seguimiento de los síntomas.

Análisis estadísticos

Se compararon datos no categóricos usando la prueba de la t de Student para datos independientes. Los datos categóricos se compararon usando la prueba exacta de Fisher. Se usó el programa informático GraphPad Prism para calcular los valores de p de dos colas y dos lados que se calcularon con cada prueba, respectivamente.

Resultados

Datos demográficos

El grupo de pacientes con CDI recurrente descrito en este informe claramente tenía una enfermedad refractaria como se demostró mediante el número promedio de recaídas secuenciales y la duración de la afección (Tabla 2). Además, muchos pacientes tuvieron múltiples factores de riesgo para alta probabilidad de reaparición, tal como los antecedentes de CDI grave como se demostró por la hospitalización, uso frecuente de antibióticos intercurrentes que no eran para *C. difficile* y edad avanzada (Hu et al. Gastroenterology 2009;136:1206-14). Todos los pacientes

fracasaron en un régimen cada vez más bajo o pulsado de vancomicina y el 40 % de los pacientes también fracasó en un ciclo largo adicional de vancomicina seguido de un régimen "perseguidor" de rifaximina de dos semanas. Uno de estos pacientes también fracasó en un ciclo de 4 semanas de rifaximina. Varios pacientes (3/43) tomaron un ciclo de 2-4 semanas de nitazoxanida, que también fracasó en eliminar la infección. Los pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino no se excluyeron del protocolo. El treinta y cinco por ciento de los pacientes de los presentes inventores (14 de 40) tuvieron EII subyacente, incluyendo enfermedad de Crohn (6/14), colitis ulcerosa (4/14) y colitis linfocítica (4/14). Los pacientes con EII eran generalmente más jóvenes (Tabla 3), pero esto no difirió en la naturaleza refractaria de la CDI o la gravedad de la presentación de los pacientes mayores. Sin embargo, la mayoría de los pacientes sin EII subyacente tenía diverticulosis moderada a severa.

5

10

Tabla 2. Datos demográficos de la población de pacientes. Los primeros 10 casos se realizaron utilizando donantes individuales identificados como pacientes. Después de ello, el protocolo se cambió para utilizar un donante estándar. Se usó material fresco en los casos tempranos y luego la práctica se cambió para usar el material congelado.

Material de donante	Edad (media $\pm$ DE)	Sexo femenino	Duración (meses) de RCDI (media $\pm$ DE)	Número de recaídas (media $\pm$ DE)	Historia de hospitalización para CDI	Antibióticos provisionales	PPI	CRI	EII	Diverticulosis	Tasa de éxito
Donante individual (n = 10)	61 $\pm$ 22	70 %	12,7 $\pm$ 7,3	6,2 $\pm$ 3,0	70 %	60 %	60 %	30 %	30 %	50 %	7/10 (70 %)
Donante estándar, Material fresco (n=12)	55 $\pm$ 22	83 %	13,1 $\pm$ 9,8	6,4 $\pm$ 3,3	75 %	42 %	33 %	25 %	50 %	50 %	11/12 (92 %)
Donante estándar, Material congelado (n=12)	59 $\pm$ 21	67 %	10,1 $\pm$ 10,0	5,2 $\pm$ 3,0	38 %	43 %	43 %	14 %	24 %	48 %	19/21 (90 %)
Experiencia total	59 $\pm$ 21	72 %	12,2 $\pm$ 10,3	5,9 $\pm$ 3,3	56 %	48 %	47 %	21 %	33 %	49 %	37/43 (86 %)
RCDI = Infección recurrente por <i>C. difficile</i> PPI = Medicación inhibidora de la bomba de protones CRI = Insuficiencia o fallo renal crónico EII = Enfermedad inflamatoria del intestino											

Tabla 3. Comparación de pacientes sin y con EII subyacente. La definición de EII incluye pacientes con enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y colitis linfocítica accidentalmente descubierta.

	Sin EII (n = 29)	EII (n = 14)	Valor de p
Edad (media $\pm$ EEM)	64,7 $\pm$ 3,3	44,6 $\pm$ 5,8	p = 0,0021
Mujeres	69 %	79 %	p = 0,43 (NS)
Duración de RCDI (N.º medio de meses $\pm$ DE)	13,5 $\pm$ 2,1	8,3 $\pm$ 3,3	p = 0,09 (NS)
Número de recaídas $\pm$ DE	6,2 $\pm$ 3,0	4,4 $\pm$ 1,3	p = 0,04
Tasa de hospitalización	55 %	57 %	p = 1,00 (NS)
Antibióticos provisionales	51 %	36 %	p = 0,35 (NS)
PPI	48 %	43 %	p = 1,00 (NS)
Insuficiencia renal	32 %	14 %	p = 0,69 (NS)
Diverticulosis	69 %	14 %	p = 0,0028

Respuesta al tratamiento

La tasa general de eliminación de la infección fue del 86 % en respuesta a una única infusión del material fecal del donante, como se demostró mediante la resolución de síntomas y la prueba de PCR negativa para toxina B de *C. difficile* después de dos meses de seguimiento (Tabla 2). La prueba negativa para la toxina B de *C. difficile* durante dos meses se aceptó como éxito terapéutico en pacientes con EII subyacente, incluso en ausencia de una resolución de síntomas completa. Tres de los diez pacientes (30 %) que recibieron FMT usando material de los donantes individuales identificados como pacientes tuvieron una reaparición de CDI. Se emplearon dos donantes estándar para los 33 casos restantes en esta serie, pero la mayoría (30/33) se realizaron utilizando material preparado de un único donante. Tres de los 33 pacientes que recibieron FMT de un donante estándar (fresco o congelado) tuvieron una reaparición de CDI. La diferencia en la fuente de donante, identificado como paciente frente a uno estándar, no fue significativa (p = 0,1270). No hubo diferencia significativa en la eliminación de la infección con material del donante fresco (11/12) o congelado (19/21). A los 6 pacientes que experimentaron una reaparición de CDI después de FMT se les ofreció repetir el procedimiento. Dos de estos pacientes, ambos > 80 años de edad, tuvieron otros múltiples problemas médicos activos y prefirieron permanecer en tratamiento indefinido con vancomicina. Los otros cuatro pacientes fueron tratados con una segunda infusión y todo eliminó la infección llevando la tasa de éxito general al 95 % (41 de 43 pacientes). Todas las segundas infusiones se realizaron usando el material derivado de donantes estándar. Una de las reapariciones de CDI ocurrió en un paciente que recibió su primera infusión del segundo donante estándar. Se usó la misma fuente de donante para su segundo FMT. Tres de los cuatro pacientes que recibieron un segundo FMT tuvieron EII subyacente; dos pacientes tuvieron enfermedad de Crohn y uno tuvo colitis linfocítica. Finalmente, el cuarto paciente tuvo una resección parcial del colon realizada para una constricción que se desarrolló después de su episodio de CDI inicial. Ella tiene una colostomía que drena su colon proximal y un segmento largo de colon distal residual. Después de la reaparición de CDI en el plazo de tres semanas posteriores a su primer FMT, los presentes inventores pensaron que era probable que la inserción en este caso se complicara por la dificultad en retener el material del donante debido a un alto flujo de contenidos fecales y un tamaño relativamente pequeño del colon infectado. La segunda infusión en este caso se realizó con dos dosis de material del donante estándar congelado: una a través de colostomía en el colon y la otra en el yeyuno usando una enteroscopia por empuje superior. La prueba de *C. difficile* de su material fecal se realizó semanalmente en el primer mes y luego mensualmente. No se encontró *C. difficile* durante tres meses de seguimiento.

No se notaron acontecimientos adversos graves después de FMT en ninguno de los pacientes, ni con materiales frescos ni congelados. Una minoría de pacientes (aproximadamente un tercio) notó alguna irregularidad de deposiciones y flatulencia excesiva durante el primer par de semanas después del procedimiento, pero estos síntomas se resolvieron para cuando fueron vistos en el seguimiento clínico. No se observó actividad de colitis mejorada en pacientes con EII subyacente y hubo una mejora en la actividad de colitis general en todos los pacientes con CU, aunque eso es fácilmente atribuible a la eliminación de CDI. Curiosamente, todos los diagnósticos de colitis linfocítica se realizaron por primera vez a partir de biopsias tomadas durante las colonoscopias realizadas en el momento de FMT. Estos pacientes normalizaron completamente su función intestinal y no tuvieron diarrea después de FMT sin ninguna terapia médica adicional para colitis linfocítica. No se realizaron biopsias de seguimiento en estos pacientes cuando se volvieron asintomáticos.

Discusión

La infección recurrente es uno de los desafíos clínicos más difíciles en el espectro de la enfermedad diarreica inducida por *C. difficile*. El riesgo de reaparición aumenta hasta el 65 % después de dos o más episodios (McDonald et al. Emerg Infect Dis 2006/12:409-15) y este riesgo es casi seguro en pacientes mayores que sufrieron CDI grave y sufrieron de una alteración adicional de la microbiota intestinal de la administración intercurrente de antibióticos supresores no de *C. difficile* (Hu et al. Gastroenterology 2009;136:1206-14). Los criterios de inclusión para pacientes en esta serie de casos fueron simples: al menos tres reapariciones y fallo de tratamientos con antibióticos estándar. Los pacientes de los presentes inventores tuvieron como promedio aproximadamente seis reapariciones durante un ciclo promedio de un año. Esta población destaca factores de riesgo conocidos para la reaparición de CDI distinta de la reaparición documentada. La mayoría tuvo antecedentes de al menos una hospitalización para CDI grave y casi la

mitad tomó antibióticos después de desarrollar CDI por otra indicación que no era de *C. difficile*. Los pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino dominaron el grupo de menor edad. Prácticamente todos los pacientes estaban tomando probióticos al presentarse y muchos también han probado resinas que se unen a toxinas. Los presentes inventores no recogieron sistemáticamente información sobre todas las diversas preparaciones de probióticos tomadas por sus pacientes y muchos han probado múltiples tipos a lo largo del curso de sus infecciones recurrentes. Las preparaciones más comunes contenían *Saccharomyces boulardii* y cepas de *Lactobacilli*. Se recomendó a todos los pacientes que dejaran de tomar los probióticos después de FMT. En resumen, mediante todos los indicadores disponibles, los pacientes en esta serie de casos tenían CDI persistente, que no hubiese tenido una tasa de respuesta significativa a un placebo, y era improbable que respondieran a otro ciclo de antibióticos u otras opciones terapéuticas disponibles.

Se ha usado FMT durante décadas como un último método de desviación para curar la CDI recurrente y ha habido un crecimiento incontrolado de evidencia que apoya su eficacia. Aquí, los presentes inventores informan de una de las series de casos únicos más grande. El 95 % de la tasa de éxito general en esta serie es comparable con la experiencia acumulada en la bibliografía (Bakken. *Anaerobe* 2009;15:285-9, van Nood et al. *Euro Surveill* 2009;14, Khoruts y Sadowsky. *Mucosal Immunol* 2011;4:4-7) y se suma al impulso para desarrollar este enfoque terapéutico para hacerlo más ampliamente disponible. Los principales problemas abordados por el centro de los presentes inventores fueron aquellos de practicidad. En la fase temprana del programa, los presentes inventores solicitaron a los pacientes que aportaran posibles donantes, que es el enfoque más común en la práctica en este momento. Nuestra experiencia no contradice la eficacia de este enfoque. Sin embargo, la identificación de donantes y la elaboración aumentaron el gasto del procedimiento e introdujeron un posible periodo de demora. Además, algunos pacientes que ya estaban exhaustos por la enfermedad tuvieron dificultad en encontrar donantes adecuados. Mientras que el estado ideal de la salud del donante puede no ser esencial para receptores ancianos con esperanza de vida limitada, los presentes inventores sintieron que el compromiso no era una opción para pacientes más jóvenes en cualquiera de los criterios de exclusión del donante. La microbiota intestinal constituye un órgano microbiano humano con funciones importantes en el metabolismo de la energía y la función del sistema inmunitario (Khoruts y Sadowsky. *Mucosal Immunol* 2011;4:4-7). Por lo tanto, este procedimiento de trasplante tiene posibles implicaciones para la fisiología sistémica del receptor. Mientras que la salud del donante no es garantía para una composición óptima de microbiota intestinal, actualmente es el único indicador disponible. Por todas estas razones, los presentes inventores decidieron introducir la opción de donante estándar a sus pacientes. Curiosamente, aunque muchos pacientes ingresaron en la clínica con algún posible donante ya identificado, todos prefirieron inmediatamente la opción estándar de un donante seleccionado anónimo al tener conocimiento de la misma.

El siguiente desafío pasó a ser la preparación avanzada del material del donante. Poco se conoce sobre la viabilidad de los diferentes constituyentes de la microbiota fecal con el tiempo, y los presentes inventores no deseaban probar esta variable. Sin embargo, como la producción de material fresco a demanda no siempre es práctica y crea demoras y problemas de higiene y estética, los presentes inventores introdujeron el material de donante congelado como otra opción de tratamiento. La eficacia clínica de la preparación congelada se volvió rápidamente evidente y ahora forma parte del protocolo estándar en el programa de los presentes inventores.

El FMT se considera normalmente una última alternativa, una opción de terapia desesperada por la mayoría de los profesionales clínicos, y eso se debe principalmente a múltiples barreras estéticas y prácticas que se presentan a la hora de su administración. Una mayor prevalencia, morbilidad y mortalidad de CDI ha llegado a alcanzar proporciones epidémicas y una fracción significativa de estos pacientes no puede eliminar la infección con terapias estándar. Estos pacientes pueden beneficiarse del FMT, pero es probable el procedimiento no esté disponible para ellos. El protocolo de FMT de los presentes inventores ha evolucionado ahora al punto que se han superado los desafíos estéticos y prácticos más evidentes. Esto también reduce considerablemente los costes asociados con la selección de posibles donantes. Aunque se requiere esfuerzo y organización para el reclutamiento y selección de donantes adecuados, además de la preparación y un banco de material, la ejecución del FMT se ha convertido en una simple cuestión de cargar las jeringas con material descongelado, casi inodoro, y una colonoscopia.

Existen varias limitaciones a este estudio. No era un ensayo clínico riguroso diseñado para probar la eficacia de una metodología de FMT particular con respecto a otra, o alguna otra forma de terapia. Por el contrario, fue un intento por normalizar FMT, ya que el protocolo del procedimiento evolucionó con el trascurso de la experiencia clínica de los presentes inventores. Se necesita trabajo adicional para que este procedimiento esté listo para ensayos clínicos y para una aplicación más amplia. No obstante, los resultados clínicos de los presentes inventores proporcionan pruebas muy convincentes de la eficacia de las preparaciones congeladas. Sin embargo, los presentes inventores no pueden concluir solo a partir de esta experiencia que las preparaciones frescas y las congeladas sean equivalentes. La complejidad de las preparaciones del material del donante, la incapacidad técnica para cultivar la mayor parte de los constituyentes microbianos contenidos mediante técnicas de laboratorio estándar y la ignorancia de los presentes inventores en cuanto a la identidad de las especies que son terapéuticamente más importantes excluyó pruebas simples del material del donante antes del FMT, que podrían predecir su eficacia. Sin embargo, los presentes inventores están actualmente trabajando para caracterizar la composición microbiana del material del donante y muestras fecales de receptores recogidas con el tiempo mediante secuenciamiento del gen ARNr 16s de alto rendimiento. Los resultados de estos experimentos deberían proporcionar algunos medios para comparar diferentes preparaciones de donantes. Además, los presentes inventores están trabajando para desarrollar pruebas

de laboratorio prácticas que permitan la normalización adicional de la composición microbiana de preparaciones de donantes.

- 5 Mientras que la aplicación del FMT para CDI recurrente tiene una larga historia, los informes de los casos sugieren que también puede tener un lugar en el tratamiento de la EII o SII (Bennet et al. Lancet 1989;1:164, Borody et al. J Clin Gastroenterol 2003;37:42-7, Andrews and Borody. Med J Aust 1993;159:633-4). Dada la función potencialmente importante de la microbiota intestinal en la patogénesis del síndrome metabólico, el FMT ya está siendo explorado en un ensayo clínico para esta afección (Vrieze et al. Diabetologia 2010;53:606-13). La simplificación y normalización de los agentes terapéuticos basados en FMT es crítica para su futuro desarrollo. Avances tecnológicos recientes también han posibilitado obtener una percepción de composición de microbiota intestinal y su actividad. El estudio de la microbiota en el contexto del FMT debería acelerar el desarrollo de agentes terapéuticos microbianos y dar nuevas percepciones sobre las interacciones con el hospedador microbiano.
- 10

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de una composición que comprende un extracto o una preparación de heces humanas que comprende material fecal humano, comprendiendo el método:
5 mezclar una muestra fecal de un donante fecal con un diluyente, y
 filtrar la muestra fecal mezclada con un medio de filtro, en donde la muestra fecal mezclada se pasa a través de tamices con tamaños de tamiz progresivamente más pequeños hasta que un pase final a través de un tamiz de 0,25 mm da como resultado una composición que comprende la microbiota intestinal del donante fecal que es
10 capaz de pasar a través de un tamiz de 0,25 mm.
2. Un método según la reivindicación 1, que comprende además centrifugar un filtrado de la etapa de filtración.
3. Un método según las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además congelar o liofilizar la composición.
- 15 4. Una composición que comprende un extracto o una preparación de heces humanas, siendo dicha composición obtenible por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. La composición de la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por
20 microbiota de colon disfuncional.
6. La composición para su uso según la reivindicación 5, en donde la enfermedad está seleccionada del grupo que consiste en una colitis por *Clostridium difficile*, un síndrome metabólico, obesidad, asma, eccema, un trastorno eosinofílico del tubo GI, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del intestino irritable, colitis ulcerosa,
25 enfermedad de Crohn, colitis enterohemorrágica, diarrea crónica, estreñimiento crónico, un trastorno de la alimentación, desnutrición, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, fibromialgia, síndrome de fatiga crónica y un trastorno neurodegenerativo
7. La composición para su uso según la reivindicación 5, la enfermedad es una infección por *Clostridium difficile*.
- 30 8. La composición según la reivindicación 4 o la composición para su uso según las reivindicaciones 5 a 7, en donde la composición comprende al menos 5 clases diferentes de bacterias seleccionadas del grupo que consiste en Actinobacteria, Bacteroidia, Bacilli, Clostridia, Erysipelotrichi, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Mollicutes y Verrucomicrobiae.
- 35 9. La composición según la reivindicación 4 o la composición para su uso según las reivindicaciones 5 a 8, en donde la composición comprende no más de aproximadamente el 5 % en peso de material no vivo/peso de material biológico.
- 40 10. La composición según la reivindicación 4 o la composición para su uso según las reivindicaciones 5 a 8, en donde la composición comprende no más de aproximadamente el 1 % en peso de material no vivo/peso de material biológico.
- 45 11. La composición según la reivindicación 4 o la composición para su uso según las reivindicaciones 5 a 10, en donde la composición es una formulación para administración por vía oral, administración por tubo nasogástrico o administración por colonoscopia.
12. La composición según la reivindicación 4 o la composición para su uso según las reivindicaciones 5 a 11, en donde la composición se congela.
- 50 13. La composición según la reivindicación 4 o la composición para su uso según las reivindicaciones 5 a 11, en donde la composición es un sólido.
14. La composición según la reivindicación 4 o la composición para su uso según las reivindicaciones 5 a 13, en donde la composición se formula para administración por vía oral.
- 55 15. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en donde la composición se administra en una única dosificación de entre 1×10^{10} células y 5×10^{10} células.