

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 581**

51 Int. Cl.:

A61K 35/38 (2015.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2014** **PCT/US2014/040856**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014** **WO14197562**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2014** **E 14742388 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018** **EP 3003330**

54 Título: **Terapia de restauración de microbiota (TRM), compuestos y métodos de fabricación**

30 Prioridad:

05.06.2013 US 201361831409 P

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

22.06.2018

73 Titular/es:

REBIOTIX, INC. (100.0%)
2660 Patton Road
Roseville, Minnesota 55113, US

72 Inventor/es:

JONES, LEE A.;
JONES, COURTNEY R.;
HLAVKA, EDWIN J. y
GORDON, RYAN D.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 673 581 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

Terapia de restauración de microbiota (TRM), compuestos y métodos de fabricación

5 Campo técnico

La presente divulgación se refiere a compuestos y métodos para tratar enfermedades y / o afecciones del tracto digestivo.

10 Antecedentes

Se ha desarrollado una amplia variedad de compuestos y métodos para tratar enfermedades y / o afecciones de la vía digestiva. De los compuestos y métodos conocidos, cada uno tiene ciertas ventajas y desventajas. Existe una necesidad continua de proporcionar compuestos y métodos alternativos para tratar enfermedades y / o afecciones de la vía digestiva.

15 Breve resumen

La invención se refiere a un método para fabricar un compuesto para terapia de restauración de la microbiota, comprendiendo el método: la recolección de una muestra fecal humana, la adición de un diluyente a la muestra fecal humana para formar una muestra diluida, en el cual el diluyente incluye un crioprotector, el mezclado de la muestra diluida con un aparato de mezcla; la filtración de la muestra diluida, en el cual la filtración forma un filtrado, la transferencia del filtrado a una bolsa de muestra y el sellado de la bolsa de muestra. Se describen compuestos para terapia de restauración de la microbiota y métodos para fabricar, procesar y / o administrar compuestos para terapia de restauración de la microbiota. Un método de ejemplo para fabricar un compuesto para terapia de restauración de la microbiota puede incluir la recolección de una muestra fecal humana y la adición de un diluyente a la muestra fecal humana para formar una muestra diluida. El diluyente puede incluir un crioprotector. El método también puede incluir el mezclado de la muestra diluida con un aparato de mezcla y la filtración de la muestra diluida. La filtración puede formar un filtrado. El método también puede incluir la transferencia del filtrado a una bolsa de muestra y el sellado de la bolsa de muestra.

Un método de ejemplo para fabricar, procesar y envasar un compuesto para terapia de restauración de la microbiota puede incluir la recolección de una muestra fecal de un donante preseleccionado, la transferencia de la muestra fecal a una bolsa de filtro, y la adición de un diluyente a la bolsa de filtro. El diluyente puede incluir un crioprotector. El método también puede incluir el sellado de la bolsa de filtro, la transferencia de la bolsa de filtro sellada a una mezcladora y la transferencia del filtrado desde la bolsa de filtro a una bolsa de muestra. La transferencia del filtrado desde la bolsa de filtro a una bolsa de muestra puede definir el compuesto para terapia de restauración de la microbiota en el interior de la bolsa de muestra. El método también puede incluir el sellado de la bolsa de muestra, el enfriamiento de la bolsa de muestra y la transferencia de la bolsa de muestra enfriada a un dispositivo de almacenamiento a temperatura controlada. La transferencia de la bolsa de muestra enfriada a un dispositivo de almacenamiento a temperatura controlada puede incluir el congelamiento del compuesto para terapia de restauración de la microbiota. El método también puede incluir el descongelamiento del compuesto para terapia de restauración de la microbiota congelada, el embalaje de la bolsa de muestra en un sistema de envasado aislado y el envío de la bolsa de muestra embalada a una instalación de tratamiento.

Un método de ejemplo para el tratamiento médico puede incluir la recolección de una muestra fecal de un donante preseleccionado, la transferencia de la muestra fecal a una bolsa de filtro y la adición de un diluyente a la bolsa de filtro. El diluyente puede incluir un crioprotector. El método también puede incluir el sellado de la bolsa de filtro, la transferencia de la bolsa de filtro sellada a una mezcladora, y la transferencia del filtrado desde la bolsa de filtro a una bolsa de muestra. La transferencia del filtrado desde la bolsa de filtro a una bolsa de muestra puede definir un compuesto para terapia de restauración de la microbiota en el interior de la bolsa de muestra. El método también puede incluir el sellado de la bolsa de muestra, el enfriamiento de la bolsa de muestra y la transferencia de la bolsa de muestra enfriada a un dispositivo de almacenamiento a temperatura controlada. La transferencia de la bolsa de muestra enfriada a un dispositivo de almacenamiento a temperatura controlada puede incluir el congelamiento del compuesto para terapia de restauración de la microbiota. El método también puede incluir el descongelamiento del compuesto para terapia de restauración de la microbiota congelada, el embalaje de la bolsa de muestra en un sistema de envasado aislado, el envío de la bolsa de muestra embalada a una instalación de tratamiento y la administración del compuesto para terapia de restauración de la microbiota a un paciente. Las Figuras y la Descripción Detallada, a continuación, ejemplifican más particularmente estas realizaciones.

60 Breve descripción de los dibujos

La descripción puede entenderse más completamente tomando en consideración la siguiente descripción detallada en relación con los dibujos adjuntos, en los cuales:

a Figura 1 es un diagrama de flujo que representa esquemáticamente un proceso para recoger e inspeccionar una muestra fecal de un donante;

la Figura 2 es un diagrama de flujo que representa esquemáticamente un proceso para seleccionar un donante fecal;

las Figuras 3A y 3B son diagramas de flujo que representan un método de ejemplo para fabricar un compuesto para terapia de restauración de la microbiota;

la Figura 4 es un diagrama de flujo que representa un proceso de ejemplo para ordenar y enviar un compuesto para terapia de restauración de la microbiota;

la Figura 5 es un diagrama de flujo que representa otro proceso de ejemplo para ordenar y enviar un compuesto de terapia de restauración de la microbiota;

la Figura 6 es una vista esquemática de un sistema de envasado de ejemplo;

la Figura 7 ilustra una bolsa de muestra de ejemplo; y

la Figura 8 ilustra una unidad de tubo de ejemplo.

Si bien la divulgación es susceptible de varias modificaciones y formas alternativas, se han mostrado detalles específicos de las mismas, a modo de ejemplo, en los dibujos y se describirán en detalle. Sin embargo, debe entenderse que la intención no es limitar la invención a las realizaciones particulares descritas. Por el contrario, la intención es cubrir todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que caigan dentro del espíritu y el alcance de la divulgación.

Descripción detallada

Para los siguientes términos definidos, se aplicarán estas definiciones, a menos que se dé una definición diferente en las reivindicaciones o en otra parte de esta especificación.

Se asume que todos los valores numéricos en este documento están modificados por el término "aproximadamente", esté o no explícitamente indicado. El término "aproximadamente" se refiere de forma general a un rango de números que un experto en la técnica consideraría equivalente al valor indicado (por ejemplo, que tiene la misma función o resultado). En muchos casos, los términos "aproximadamente" pueden incluir números que están redondeados a la cifra significativa más cercana.

La enumeración de rangos numéricos por puntos extremos incluye a todos los números dentro de ese rango (por ejemplo, 1 a 5 incluye 1; 1,5; 2; 2,75; 3; 3,80; 4 y 5).

Tal como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Tal como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, el término "o" se emplea generalmente en su sentido, incluyendo "y / o", a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

Se hace notar que las referencias en la especificación a "una realización", a "algunas realizaciones", a "otras realizaciones", etc., indican que la realización descrita puede incluir uno o más aspectos, estructuras y / o características particulares. Sin embargo, tales enumeraciones no significan necesariamente que todas las realizaciones incluyen los aspectos, estructuras y / o características particulares. Además, cuando se describen aspectos, estructuras y / o características particulares en relación con una realización, se debe entender que tales aspectos, estructuras y / o características también se pueden usar en relación con otras realizaciones, ya sea descritas o no explícitamente, a menos que claramente se indique lo contrario.

La siguiente descripción detallada debe leerse con referencia a los dibujos, en los que elementos similares en diferentes dibujos están numerados de la misma manera. Los dibujos, que no están necesariamente a escala, representan realizaciones ilustrativas y no están destinadas a limitar el alcance de la invención.

El término "Mamífero", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier miembro de la clase de los mamíferos, que incluye, sin limitación, seres humanos y primates no humanos tales como chimpancés, y otros simios y especies de monos; animales de granja tales como ganado, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y conejillos de Indias, y animales similares. El término no denota una edad o sexo en particular. Por lo tanto, se pretende incluir a los sujetos adultos y recién nacidos, así como los fetos, ya sean machos o hembras, dentro del alcance de este término.

El término "criopreservación", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso de enfriamiento y almacenamiento de células, tejidos u órganos biológicos a bajas temperaturas para mantener su viabilidad. Como un ejemplo no limitativo, la criopreservación puede ser la tecnología de enfriamiento y almacenamiento de las células a

una temperatura por debajo del punto de congelación (por ejemplo, -20 ° C o menos, -80 ° C o menos, o temperaturas similares) que permita altas tasas de supervivencia de las células al descongelarse.

El término "crioprotector", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que se utiliza para proteger células o tejidos biológicos de los efectos de la congelación.

Como se usa en el presente documento, el término "microbiota" puede referirse al microbioma humano, a la microbiota humana o a la microbiota intestinal humana. El microbioma humano (o microbiota humana) se puede entender como el conjunto de microorganismos que residen en la superficie y en capas profundas de la piel, en la saliva y la mucosa oral, en la conjuntiva y en el tracto gastrointestinal de los seres humanos. El microbioma humano está compuesto por bacterias, hongos, virus y arqueas. Por lo menos algunos de estos organismos llevan a cabo tareas que son útiles para el huésped humano. Bajo circunstancias normales, estos microorganismos no causan enfermedades al huésped humano, sino que, más bien, participan en el mantenimiento de la salud. Por lo tanto, esta población de organismos con frecuencia se denomina "flora normal".

La población de microorganismos que viven en el tracto gastrointestinal humano se conoce comúnmente como "flora microbiana", "flora intestinal" y / o "microbiota intestinal". La flora microbiana del intestino humano abarca una amplia variedad de microorganismos que ayudan en la digestión, en la síntesis de vitaminas y en que crean enzimas no producidas por el cuerpo humano.

La frase "terapia de restauración de la microbiota", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que puede incluir, pero no se limita a, materia fecal humana que contiene flora intestinal viable de un paciente o donante, un diluyente y un crioprotector. Compuestos adicionales incluyen heces reconstituidas y liofilizadas equivalentes o un compuesto fecal "sintético". La materia fecal humana se analiza para detectar la presencia de microorganismos patógenos antes de su uso en la terapia de restauración de la microbiota. Se analiza la materia fecal humana para detectar la presencia de especies de *Clostridium*, incluyendo *C. difficile*, Norovirus, Adenovirus, patógenos entéricos, antígenos de especies de *Giardia*, especies de *Cryptosporidia* y otros patógenos, incluyendo bacterias ácido-resistentes, enterococos, que incluyen pero no se limitan a enterococos resistentes a la vancomicina (ERV), *Staphylococcus Aureus* resistente a la meticilina (SARM), así como cualesquiera huevos o cuerpos parasitarios, o parásitos formadores de esporas, incluyendo, pero no limitados a, *Isospora*, *Clysolella* y *Cryptospora*.

Más de 1000 especies diferentes de bacterias residen en un tracto gastrointestinal (GI) sano. Los Clostridios son bacterias anaerobias, formadoras de esporas. Ciertas especies de clostridios son patógenas, produciendo toxinas que pueden ser dañinas para los seres humanos. *Clostridium difficile* ("C diff") es una especie de Clostridium que, si está superpoblada en el tracto gastrointestinal, puede liberar toxinas que pueden causar una serie de síntomas, incluyendo hinchazón, estreñimiento, diarrea, inflamación, dolor abdominal, entre otros que, en ciertos casos, pueden conducir a la muerte.

Cuando se someten a tensión, las bacterias *Clostridium difficile* crean esporas que pueden tolerar condiciones extremas que muchas bacterias activas no pueden tolerar. En general, los clostridios no compiten bien en un tracto gastrointestinal sano. Sin embargo, los antibióticos pueden alterar la flora intestinal normal, provocando un crecimiento excesivo de *Clostridium difficile*. En ciertos ejemplos, las esporas de *Clostridium difficile* pueden ser resistentes a diversos antibióticos. Por lo tanto, a medida que se elimina la flora intestinal normal, persisten las esporas de *Clostridium difficile*, lo que lleva a una gran población de *Clostridium difficile*.

De acuerdo con los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), se informan aproximadamente 337.000 casos de infección por *Clostridium difficile* (CDI) cada año en los Estados Unidos, que ocasionan aproximadamente 14.000 muertes. El estándar actual de atención sanitaria es el tratamiento con antibióticos, de forma típica con metronidazol y / o vancomicina. Después del tratamiento antimicrobiano inicial, aproximadamente el 25% de los pacientes experimenta una recurrencia en los síntomas. En esta población recurrente de pacientes, aproximadamente el 45 – 65% desarrollaron CDI recurrente persistente. La CDI recurrente persistente se asocia con una alta morbilidad y mortalidad. Por ejemplo, las estimaciones de la incidencia de superpoblación de *Clostridium difficile* varían de 1,5 a 2,7 millones de ocurrencias en los Estados Unidos por año, y están creciendo. En una estimación, las bajas hospitalarias por *Clostridium difficile* se duplicaron entre 2001 y 2005, con una tasa de crecimiento anual compuesta estimada del 5% al 25%. Las estimaciones actuales indican que los pacientes afectados por superpoblación de *Clostridium difficile* experimentaron un aumento de las estancias hospitalarias de 3 a 36 días, y casi el 20% de los pacientes afectados fueron reingresados dentro de los 180 días, cada uno con una mayor probabilidad de ser trasladados a centros de atención de larga estancia que los pacientes no afectados. El impacto financiero de la bacteria *Clostridium difficile* se estima en 1 a 3 mil millones de dólares al año. Más aún, se estima que son atribuibles 300 muertes de pacientes por día a la superpoblación de *Clostridium difficile*, una tasa de mortalidad de 1 a 7,7%, y en aumento.

El tratamiento tradicional para *Clostridium difficile* incluye de forma típica la aplicación de antibióticos. El metronidazol ("Flagyl®") es el antibiótico de elección debido a su bajo precio y alta eficacia. Sin embargo, para casos recurrentes (hasta el 20% del los casos totales, por ejemplo, resistentes al metronidazol), pacientes embarazadas o pacientes menores de 10 años de edad, se usa típicamente vancomicina ("Vancocin®"). Sin embargo, la vancomicina, aunque de forma típica tiene menos efectos secundarios que el metronidazol, tiene un costo mucho más alto y puede conducir a la resistencia del *Clostridium difficile* existente a otros antibióticos.

En la primera aparición, el tratamiento con antibióticos para *Clostridium difficile* puede ser sumamente eficaz para tratar la diarrea dentro de 2 a 4 días a una tasa aproximadamente igual o superior al 90%. Sin embargo, la bacteria *Clostridium difficile* reaparece, de forma típica, después de la primera aparición (por ejemplo, desde varios días a 12 semanas después del cese de la toma de antibióticos) a una tasa estimada del 20% (por ejemplo, 15% -30%). Sin embargo, para cada recidiva después de la primera recurrencia, la tasa aumenta mucho, a una tasa estimada del 40% después de la segunda recurrencia, y a una tasa superior al 60% o más a partir de entonces. Se estima que aproximadamente el 5% de los pacientes tienen 6 o más recurrencias.

El tratamiento para *Clostridium difficile* generalmente varía después de cada aparición. Por ejemplo, para la primera recurrencia leve a moderada, se puede administrar metronidazol por vía oral (por ejemplo, a una dosis de 500 mg, tres veces al día ("TID") durante 10 a 14 días). Para una segunda recurrencia, puede administrarse vancomicina por vía oral en dosis reducidas o en pulsos (por ejemplo, a una dosis de 125 mg, cuatro veces al día ("QID") durante 14 días; a una dosis de 125 mg, dos veces al día ("BID")) durante 7 días; a una dosis de 125 mg, una vez al día ("QD") durante 7 días; a una dosis de 125 mg, una vez cada 2 días durante 8 días (cuatro dosis); a una dosis de 125 mg, una vez cada 3 días durante 15 días (cinco dosis), etc.). Para una tercera recurrencia, puede aplicarse vancomicina a dosis mayores (por ejemplo, a una dosis de 125 mg, cuatro veces al día ("QID") durante 14 días), combinada con cualquiera de las otras opciones para infecciones recurrentes, como la inmunoglobulina intravenosa (por ejemplo, a una dosis de 400 mg por kg de peso corporal, una vez cada tres semanas, durante un total de dos o tres dosis dependiendo del efecto), o rifamicina después de las dosis de vancomicina (p. ej., la rifamicina en una dosis de 400 mg, dos veces al día ("BID") durante 14 días), etc.

El trasplante fecal (TF), un tratamiento relacionado con la terapia de restauración de la microbiota (TRM), se ha practicado como último recurso para algunos pacientes que sufren CDI recurrente. Después del tratamiento antimicrobiano, se usa el TF para restablecer una combinación microbiana sana en la microbiota gastrointestinal del paciente. Se han informado más de 480 casos con una tasa de éxito acumulado del ~90% en la curación del CDI recurrente sin ningún suceso adverso atribuible al material de TF. La práctica institucional actual es obtener muestras fecales de miembros de la familia o voluntarios dentro de la institución de tratamiento para el trasplante en el paciente. Un problema evidente relacionado con esta técnica de tratamiento es que el material de TF no está estandarizado. Aunque generalmente se seleccionan los donantes que se consideran saludables en el momento de la donación, esto no es adecuado para asegurar tanto la calidad como la viabilidad de los microbios que se van a trasplantar. Puede existir un estado de enfermedad que afecta a la materia fecal que es desconocida para el donante. Además de la calidad de la materia fecal original, la falta de un procedimiento estandarizado para el procesamiento y manipulación en la institución receptora o tratante puede conducir a problemas con la calidad y la viabilidad del material de TF que se le proporciona al paciente. Además, cada institución debe manipular la materia fecal original, lo cual es indeseable.

Existe la necesidad de un producto para TRM estandarizado y previamente procesado que garantice la calidad y la viabilidad del producto para TRM para el paciente en el momento de la aplicación. Además es deseable tener un producto para TRM que también se pueda enviar a una instalación de tratamiento adecuada después del procesamiento en un estado fácilmente manipulable y aplicable para eliminar la manipulación de materia fecal original en cada institución. Con estas mejoras, la TRM puede convertirse en una opción de tratamiento primario deseable / viable para CDI en vez de un tratamiento de último recurso en un pequeño número de instituciones.

Este documento plantea, entre otras cosas, la recepción de una pluralidad de muestras fecales de donante de una pluralidad de donantes y el almacenamiento e indexación de cada una de las respectivas muestras fecales de donante usando al menos una característica de la respectiva muestra fecal de donante. En un ejemplo, la muestra fecal de donante puede ser analizada y procesada para su uso posterior en una bacterioterapia fecal para desplazar organismos patógenos o no deseados que se encuentran en la vía digestiva de un paciente con microbiota intestinal sana o deseable.

La divulgación proporciona un compuesto para terapia de restauración de la microbiota que comprende una mezcla de una cantidad eficaz de la microbiota fecal y una cantidad eficaz de un crioprotector. Un ejemplo de crioprotector puede incluir el polietilenglicol. Adicionalmente, en el compuesto para terapia de restauración de la microbiota de la divulgación, el polietilenglicol está presente en una concentración de aproximadamente 5 – 60 g / ml, o aproximadamente 5 – 30 g / ml, o menos de aproximadamente 30 g / ml. El compuesto puede incluir además solución salina como diluyente. Los compuestos de la descripción pueden comprender polietilenglicol con un peso molecular medio que varía desde aproximadamente 600 hasta aproximadamente 20000. Por ejemplo, se puede

utilizar PEG – 3150, que tiene un peso molecular medio de 3150. En ciertas realizaciones, los compuestos para terapia de restauración de la microbiota comprenden microbiota fecal derivada de una o más muestras de heces humanas.

- 5 Se pueden usar otros crioprotectores tales como dextrosa, betaína, glicina, sacarosa, alcohol polivinílico, Pluronic F-127, manitol, Tween 80, etilenglicol, 1,3-propanodiol, hidroxipropil celulosa, glicerol, mezcla de PEG / glicerol, leche (por ejemplo, leche desnatada) y propilenglicol.

- 10 En otras realizaciones, puede confirmarse la viabilidad de la microbiota de los compuestos de la divulgación mediante el cultivo de la microbiota (y / o el filtrado y / o un compuesto de bacteroterapia) en una placa de agar con Bilis y Esculina para Bacteroides (BBE) (disponible en *Becton, Dickinson and Company*, número de catálogo 221836, placa de agar *BBL™ Bacteroides Bile Esculin BBE*), o una placa del Centro para el Control de Enfermedades (CDC) (disponible en *Becton, Dickinson and Company*, número de catálogo 221733, *BBL™ CDC* placa de agar anaerobia al 5% de sangre de camero), o ambos. En al menos algunas realizaciones, puede confirmarse la viabilidad de la microbiota de los compuestos de la divulgación en una placa BBE y / o CDC mediante la presencia de un recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de aproximadamente 30 UFC a aproximadamente 300 UFC en una dilución en serie de 10^{-5} , o mediante la presencia de un recuento de UFC de aproximadamente 30 UFC a aproximadamente 300 UFC en una dilución en serie de 10^{-6} . Se proporcionan adicionalmente compuestos para terapia de restauración de la microbiota en las que la concentración de microbiota es del orden de aproximadamente 10^7 microbios / ml. Adicionalmente, los métodos para producir un compuesto para terapia de restauración de la microbiota pueden comprender, además, las etapas de realización de exámenes del donante tanto previo como posterior, con la recolección de la muestra de heces humana en el intervalo entre ellas.

- 25 Además de confirmar la viabilidad de los microbios, los análisis en placas de cultivo también pueden confirmar la diversidad de los microbios vivos presentes. La combinación presente de microbios, o diversidad de microbios, es una medida adicional de la calidad de la muestra de heces humanas y del producto para TRM hecho a partir de esa muestra. Las placas CDC y las placas BBE, solas o en combinación, proporcionan una medida de calidad mediante la diversidad, como se describe en la presente memoria.

- 30 La divulgación también proporciona métodos para asegurar la calidad de una muestra de heces humanas a ser procesada para obtener un compuesto para terapia de restauración de la microbiota, comprendiendo los métodos la identificación de un donante de heces humano; la realización de un examen del donante previo a la donación, que incluye un cuestionario del historial de salud, un cuestionario de dieta diaria y por lo menos un análisis de sangre; la recolección de una muestra de heces humanas del donante; el procesamiento de una muestra de heces del donante para formar uno o más compuestos para terapia de restauración de la microbiota; la realización de un examen del donante posterior a la donación en un intervalo de aproximadamente 15 – 120 días, o aproximadamente 30 – 100 días, o aproximadamente 45 – 90 días, que comprende un cuestionario del historial de salud y por lo menos un análisis de sangre; el mantenimiento en cuarentena de uno o más compuestos para terapia de restauración de la microbiota procesadas a partir de la muestra de heces del donante recogida durante el intervalo entre el examen previo a la donación y el examen posterior a la donación; la confirmación de la calidad de los compuestos para terapia de restauración de la microbiota a partir de resultados de los estudios previos y posteriores; y la liberación de los compuestos para terapia de restauración de la microbiota para uso en un ser humano que necesita terapia de restauración de la microbiota. El examen previo / posterior puede mejorar la probabilidad de recolectar una muestra sana. El intervalo se selecciona para permitir un tiempo adecuado para que un estado de enfermedad u otro factor que esté presente en el momento de la recolección de heces se manifieste con síntomas o se identifique positivamente en un análisis de heces humanas o de suero en el examen posterior. Además, el compuesto puede ponerse en cuarentena y almacenarse hasta que se confirme la validación de la salud del donante mediante tanto el examen previo como el posterior.

- 50 Los métodos de la divulgación pueden incluir además la etapa de realización de por lo menos un análisis en la muestra de heces humanas para detectar la presencia de una enfermedad infecciosa. Adicionalmente, los métodos de la divulgación pueden incluir además la etapa de análisis la muestra de heces humanas para detectar un constituyente seleccionado del grupo que consiste en: *C. difficile*, Norovirus, Adenovirus, patógenos entéricos, antígeno de *Giardia*; antígeno de *Cryptosporidium*, tinción ácido - resistente (*Clysozpora*, *Isospora*), huevos y parásitos, Enterococos resistentes a la vancomicina (ERV), *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y combinaciones de los mismos. Los métodos de la divulgación pueden incluir el análisis de la sangre del donante, en los cuales el análisis de sangre incluye por lo menos una prueba para un constituyente seleccionado del grupo que consiste en: VIH, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, RPR y combinaciones de los mismos.

- 60 Un método representativo para producir un compuesto para terapia de restauración de la microbiota a partir de una muestra de heces humanas y asegurar la viabilidad del compuesto puede incluir la recolección de una cantidad deseada de muestra de heces humanas, la adición de solución salina, la adición de un crioprotector (por ejemplo, polietilenglicol) y el mezclado del compuesto. La mezcla resultante puede luego filtrarse y recogerse el filtrado que contiene los microbios. Se puede recolectar una porción del filtrado para analizar y el resto del filtrado se puede

congelar en cuarentena hasta que los análisis verifiquen la calidad del filtrado congelado basado en el cultivo de la muestra de prueba junto con los resultados del examen previo y posterior, como se describió anteriormente.

La presente descripción se refiere a compuestos, métodos de fabricación y métodos de tratamiento que utilizan la terapia de restauración de la microbiota del tracto gastrointestinal mediante el desplazamiento de organismos patógenos y / o ineficaces con flora bacteriana sana y eficaz. Las afecciones de ejemplo y los estados de enfermedad que pueden tratarse incluyen infección por *Clostridium difficile*, síndrome de intestino irritable (SII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa (CU), colitis fulminante como resultado de una infección por estafilococos o infección por *C. diff*, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), úlceras, diabetes, cáncer de colon, estreñimiento, obesidad y otras afecciones y estados de enfermedad relacionados con un desequilibrio de la flora bacteriana intestinal.

En algunos ejemplos, se proporcionan compuestos, métodos de fabricación y métodos de tratamiento que utilizan la terapia de restauración de la microbiota (TRM) para el tratamiento de infecciones por *Clostridium difficile* (CDI). La CDI es una infección hospitalaria frecuente y se asocia con frecuencia a morbilidad y mortalidad graves, especialmente en pacientes de edad avanzada.

Cada individuo tiene una microbiota intestinal personalizada que incluye aproximadamente de 500 a 5000 o más especies de bacterias, hongos, virus, arqueas y otros microorganismos, hasta 100 trillones de organismos individuales que residen en el tracto digestivo, proporcionando una multitud de funciones simbióticas útiles que incluyen, por ejemplo, ayuda a la digestión, provisión de nutrición para el colon, producción de vitaminas, estimulación del sistema inmunitario, ayuda en la defensa contra bacterias exógenas, regulación del metabolismo energético y producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), específicamente carbohidratos alimenticios, incluyendo almidones resistentes y fibra alimenticia, que son sustratos para la fermentación que producen AGCC, principalmente acetato, propionato y butirato, como productos finales. Sin embargo, una microbiota intestinal mal equilibrada o en mal funcionamiento puede desempeñar un papel en ciertas enfermedades o afecciones, tales como la colitis pseudomembranosa, la colitis por *Clostridium difficile*, la diarrea asociada a antibióticos (AAD), la colitis ulcerosa (CU), la reservoritis, el síndrome del intestino irritable (SII), obesidad, entre otros.

Por consiguiente, el presente inventor ha reconocido, entre otras cosas, sistemas y métodos para proporcionar bacterioterapia para tratar las afecciones asociadas con la microbiota intestinal, incluida la colitis por *Clostridium difficile*, mediante el desplazamiento de los organismos patógenos presentes en la vía digestiva de un paciente, con flora bacteriana sana o flora bacteriana destinada a beneficiar a un individuo específico con una afección asociada a la microbiota intestinal. En un ejemplo, los sistemas y métodos descritos en este documento pueden proporcionar un mecanismo higiénico conveniente, capaz de combinarse con las capacidades y rutinas existentes de clínicas y hospitales existentes, para proporcionar bacterioterapia a un paciente. En ciertos ejemplos, un tratamiento similar puede ser eficaz para pacientes con otras enfermedades, como SII, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa (CU), enfermedad inflamatoria del intestino (EII), úlceras, u otras enfermedades gastrointestinales, metabólicas o relacionadas con el tracto digestivo. En otros ejemplos, la bacterioterapia puede usarse para ayudar a perder peso, desplazando flora ineficaz presente en el intestino con una microbiota más efectiva. En otros ejemplos, la bacterioterapia se puede utilizar para ayudar en una enfermedad cardiovascular y vascular periférica.

En un ejemplo, se puede proporcionar bacterioterapia para tratar *Clostridium difficile* o una o más de otras enfermedades o afecciones del tracto digestivo, usando una combinación de antibióticos y la repoblación de una flora bacteriana de mamífero sana o deseada. En ciertos ejemplos, la repoblación de flora bacteriana puede incluir bacterioterapia fecal o trasplante fecal.

El proceso de bacterioterapia fecal puede incluir la introducción de una muestra fecal de un donante sano, o un donante que tenga una o más características deseadas, en un tracto gastrointestinal de un paciente para repoblar una microbiota intestinal saludable o deseable. En ciertos ejemplos, antes de la introducción de la muestra fecal, la flora intestinal del paciente puede alterarse usando antibióticos, de modo tal que la microbiota intestinal sana o deseable, una vez introducida en el paciente, pueda poblar fácilmente el tracto gastrointestinal.

El material fecal humano opcionalmente se filtra antes de su uso en la terapia de restauración de la microbiota.

En algunos aspectos de la presente divulgación, el compuesto es una preparación microbiana fecal estandarizada procedente de donantes preseleccionados. Los donantes se someten a exámenes de detección de enfermedades infecciosas comunes tanto en las heces humanas como en el suero. Esto incluye pruebas de laboratorio, así como una revisión del historial médico del donante. Una vez que el donante haya sido calificado, se le requerirá someterse a un nuevo examen completo en intervalos seleccionados. Esto puede incluir un período de cada período de uno a tres meses, con un intervalo de ejemplo de aproximadamente cada tres meses. En algunos métodos de un sistema para la recolección de material fecal normal o de calidad, entre los exámenes completos, se les indicará a los donantes que se pongan en contacto inmediatamente con el recolector de las muestras si se producen cambios en su estado de salud. Además, esta información de salud se puede recopilar en el momento de cada donación entre

los exámenes completos a través de un cuestionario u otros medios. El donante puede continuar siendo un donante calificado siempre que continúe pasando sus pruebas de examen y cumpla con los requisitos de estado de salud.

Las heces humanas recogidas se pueden procesar como se describe en el presente documento, luego se congelan y ponen en cuarentena. El producto puede ser liberado de la cuarentena cuando se completan los exámenes médicos previo a la recolección y posterior a la recolección (por ejemplo, heces humanas y análisis de sangre junto con el estado de salud). Esto asegura la calidad de la muestra recolectada entre los exámenes. El producto se puede descongelar y enviar en un contenedor a temperatura controlada a la institución o, alternativamente, enviarse congelado y ser descongelado en la institución.

El presente compuesto es particularmente adecuado para pacientes que tienen CDI recurrente. Un paciente con CDI recurrente se define como un paciente que ha tenido un mínimo de por lo menos un episodio recurrente después del episodio primario, y habrá completado por lo menos dos cursos de antibióticos orales para tratar su CDI. El compuesto también es adecuado para el tratamiento de un episodio primario de CDI.

En un método de tratamiento en la presente TRM, un paciente puede completar un ciclo de 10 – 14 días de antibióticos orales, que incluyen por lo menos 7 días de vancomicina al final del régimen, seguido de un período de lavado de 24 – 48 horas. El compuesto para TRM puede ser entonces introducido mediante un enema. El tratamiento puede considerarse exitoso si hay una resolución de los síntomas de CDI a los 60 días después de la administración del primer enema. En algunos pacientes, se puede administrar un segundo enema con el compuesto para TRM si los síntomas regresan dentro del período de 60 días y el tratamiento puede considerarse exitoso si no hay recurrencia de los síntomas dentro de los 60 días posteriores al segundo enema.

El material fecal humano es, por naturaleza, variable entre donantes e incluso varía día a día en el mismo donante. Además, una muestra individual de materia fecal humana tiene más de 1000 microbios diferentes presentes en cualquier momento, lo que hace que no sea factible analizar y describir todo el microbioma fecal presente en una muestra, e incluso menos factible determinar el efecto de especies individuales de microbios en una determinada enfermedad, como CDI. Sin embargo, con la presente divulgación, se ha encontrado que se puede identificar y procesar una muestra estandarizada o normal de material fecal para obtener un compuesto para TRM o producto para TRM que asegure la seguridad y la viabilidad. Con una materia prima variable, el presente compuesto se realiza utilizando métodos de selección de donantes, métodos de análisis fecales, métodos de procesamiento fecal, manipulación de materiales procesados, métodos de almacenamiento y conservación y métodos de análisis para producir un compuesto consistente, reproducible y de calidad controlada procedente de heces humanas para ser aplicado como un producto terapéutico para el tratamiento de diversas afecciones y estados de enfermedad afectados por un desequilibrio microbiano dentro del tracto GI.

El presente compuesto puede comenzar con lo que se caracteriza como una muestra de heces humanas normales. Con el fin de definir una muestra de heces humanas normales, el paciente puede someterse a un examen mediante un cuestionario u otro medio de historial de salud junto con análisis de sangre y / o de heces humanas para confirmar o verificar otras características. Además, se puede manipular y procesar la muestra de heces humana de forma controlada con el producto resultante analizado para confirmar tanto que la muestra de heces humanas era normal y que el procesamiento y la manipulación se han completado de una manera que mantiene la viabilidad de los microbios en el compuesto del producto. Además de la viabilidad, se pueden realizar análisis seleccionados para confirmar la diversidad de microbios viables presentes, otra medida de heces sanas o normales. De esta forma, se puede entender y utilizar la variación de donante a donante y la variación diaria dentro de un donante, en los criterios para una muestra de heces humanas normales. Además, se puede confirmar la validez de las técnicas de procesamiento y manipulación diseñadas e implementadas. La combinación de la recolección de heces humanas normales y el uso de técnicas validadas de procesamiento y manipulación da como resultado un compuesto o producto estandarizado. Una vez que se realiza un compuesto estandarizado, debe almacenarse y manipularse desde la producción hasta la administración de una manera que mantenga la viabilidad del producto para asegurar un tratamiento exitoso. Un proceso validado que mantiene la viabilidad del producto estandarizado desde el momento de la producción hasta la administración al paciente es crítico para un tratamiento exitoso. Se apreciará que durante el procesamiento de muestras, la encapsulación de tales extractos para producir los medicamentos de la descripción, puede ser generalmente deseable para tener trazabilidad de una muestra para asegurar que los medicamentos producidos se trazan, almacenan y registran adecuadamente para su posterior procesamiento, manipulación y uso. Con el fin de facilitar dicho trazado, puede ser deseable que se utilicen etiquetas adecuadas para identificar una muestra, extracto y medicamento, y permitir que estos se asocien entre sí y con el paciente a tratar. Esto puede lograrse mediante el uso de etiquetas RFID o análisis de ADN de muestras de donantes. Un experto en la técnica estaría familiarizado con otras etiquetas adecuadas para lograr la trazabilidad de los medicamentos de la divulgación, por ejemplo, códigos de barras.

Al caracterizar la muestra de heces humanas para determinar si es normal o está dentro del rango considerado normal, se pueden utilizar datos de historial de salud, análisis de suero y / o sangre y análisis de heces humanas. Adicionalmente, se puede utilizar un conjunto constante de parámetros de procesamiento para producir un producto

que se puede cultivar en medios seleccionados para determinar la presencia de microbios seleccionados viables y grupos de microbios para confirmar la viabilidad y diversidad dentro de la muestra de heces humanas. Los parámetros de procesamiento también se pueden utilizar para producir un producto que se puede cultivar en medios seleccionados para determinar la ausencia de ciertos microbios y / o grupos de microbios. Esta parte del protocolo de procesamiento se puede usar para confirmar la seguridad de la muestra de heces para su uso en el producto para TRM.

La manipulación y el procesamiento de la muestra de heces humanas para un producto para TRM estandarizado y viable puede incluir técnicas de recolección y manipulación consistentes y comprobadas, procesos de filtración, homogeneización controlada y adición de líquidos y cantidades de estos líquidos seleccionados. Además, el compuesto producido, que es el compuesto o producto estandarizado, mediante esta manipulación y procesamiento controlados y probados, puede cultivarse en medios seleccionados para determinar la presencia de microbios y grupos de microbios seleccionados viables para confirmar la viabilidad y diversidad de microbios en el producto.

Desde el momento de la producción del producto estandarizado hasta el momento de la administración en el paciente, el producto estandarizado debe mantenerse viable para un tratamiento exitoso. Esto puede incluir el uso de una técnica de almacenamiento congelado y de un crioprotector para mantener la viabilidad. En particular, los Solicitantes han descubierto que se puede usar polietilenglicol (PEG) como un crioprotector eficaz para productos para TRM. El tiempo de almacenamiento, la técnica de descongelación, la técnica de envío y la manipulación del producto descongelado también son factores que afectan a la viabilidad y se definen en este documento. Las técnicas definidas en este documento pueden utilizarse desde el momento en que se recibe la donación de heces y a través de la producción del producto estandarizado y durante la administración al paciente. Las técnicas proporcionadas en este documento también hacen posible que se mantenga y confirme la viabilidad de la microbiota en el producto para TRM. Se proporcionan protocolos para confirmar la presencia, viabilidad y diversidad de microbios seleccionados y grupos de microbios mediante el cultivo en medios seleccionados. Además, las técnicas proporcionadas en este documento pueden usarse para confirmar la presencia, viabilidad y diversidad de microbios y grupos de microbios seleccionados en cualquier punto durante el proceso, desde la recolección hasta el procesamiento, la producción, el almacenamiento y el posterior descongelamiento hasta justo antes de la administración a un paciente y en todos los puntos intermedios. En una realización, el polietilenglicol (PEG) crioprotector puede mezclarse con la muestra de heces humanas y con solución salina isotónica en el momento del procesamiento. El PEG se puede agregar a una concentración de aproximadamente 0,1 g / ml hasta aproximadamente 70 g / ml, o desde aproximadamente 2 g / ml hasta aproximadamente 68 g / ml, o desde aproximadamente 4 g / ml hasta aproximadamente 65 g / ml, o desde aproximadamente 5 g / ml hasta aproximadamente 60 g / ml. El PEG utilizado puede tener un peso molecular medio de aproximadamente 600 a aproximadamente 20000. En algunas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular medio de aproximadamente 2000 a aproximadamente 4000, por ejemplo aproximadamente 3350, como se proporciona en la formulación de PEG 3350.

El crecimiento de cultivos para definir la muestra de heces humanas normales puede incluir las siguientes técnicas, reconociendo que las heces humanas sin procesar no se pueden cultivar sistemáticamente. Se preparó un producto de muestra procesado usando una muestra de heces humanas de 50 gramos (g) y se mezcló en condiciones consistentes con una relación de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 ml de una mezcla de PEG / solución salina a 1 g de heces humanas en una bolsa estéril mezcladora / filtradora para crear una suspensión bacteriana. En algunas realizaciones, la suspensión bacteriana se filtra, de acuerdo con técnicas estándar, antes del cultivo. El sembrado en placas y la incubación de la suspensión bacteriana se realizaron en medios de crecimiento como se describe a continuación en el presente documento, y se realizaron de acuerdo con los métodos de cultivo anaerobio estándar en la industria. Se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) resultantes, y se lograron resultados consistentes usando estos protocolos.

Se usan dos medios de cultivo para cultivar la suspensión bacteriana. La primera es la placa del Centro para el Control de Enfermedades (CDC), comúnmente conocida como "Placa anaerobia de Agar de Sangre de Carnero al 5% CAC". Esta placa es una placa anaeróbica general para microbios, que permite el aislamiento y el cultivo de una bacteria estrictamente anaeróbica planta exigente y de crecimiento lento. La segunda es la placa de Agar con Bilis y Esculina para Bacteroides (BBE), que es un medio indicador específico de especies para *Bacteroides*. Ambos tipos de medios están comúnmente disponibles para su compra a través de proveedores de laboratorio, como *Becton, Dickinson and Co.*, y *Fisher Scientific*, por ejemplo.

Mediante el cultivo en medios seleccionados, los Solicitantes son capaces de proporcionar una medida de la diversidad de microbios presentes en las heces humanas, en el producto producido y en el producto que se administra. Las técnicas descritas anteriormente pueden usarse para proporcionar una medida de la diversidad de los microbios en una muestra de heces humanas en cualquier etapa. En particular, las placas CDC están diseñadas para hacer crecer de 5 a 7 familias diferentes de microbios que pueden estar presentes en los materiales para TRM. En un ejemplo no limitante, una placa de CDC cultivada con una suspensión bacteriana debe tener al menos 3 géneros identificables de microbios creciendo sobre la misma con el fin de que la suspensión bacteriana sea

procesada y / o usada para la terapia para TRM. Además, el uso de la placa BBE puede proporcionar una medida adicional de la diversidad microbiana en el producto para TRM. La placa BBE permite el crecimiento de múltiples especies dentro del género de microbios *Bacteroides*. Las UFC suficientes en las placas BBE indican la diversidad dentro del género presente en el producto para TRM. En ciertas realizaciones, la placa CDC o la placa BBE pueden usarse solas como una medida de diversidad. En otras realizaciones, tanto la placa de CDC como la placa de BBE se pueden usar en conjunto para proporcionar una medida mejorada de diversidad a nivel del género microbio, así como a nivel de especies dentro de un género de microbio particular.

La Figura 1 es un diagrama de flujo que representa una parte de un proceso de producción para TRM de ejemplo. Más particularmente, la Figura 1 representa esquemáticamente un proceso para recoger e inspeccionar una muestra fecal de un donante. Como primer paso en el proceso de recolección / inspección, se examinan posibles donantes de heces. El examen / examen previo se describe con más detalle en este documento. Una vez que el donante pasa el examen, el segundo paso puede incluir la recolección de las heces del donante utilizando un kit de recolección de heces humanas como se define aquí, ya sea en el hogar o en una instalación de recolección. El kit puede incluir, pero no está limitado a, un recipiente de recolección de heces humano limpio con tapa, una bolsa grande que se puede cerrar / sellar, un formulario de donación y una hoja de instrucciones para la recolección de heces humanas. La fecha y hora de recolección, junto con la identidad del donante y el método de transporte, pueden registrarse para dejar trazabilidad del tiempo desde la recolección hasta el procesamiento, y las condiciones de transporte. Como un ejemplo no limitante, el recipiente de recolección puede incluir un indicador de la temperatura mínima y máxima a la que está expuesta la muestra. Como otro ejemplo no limitante, pueden fijarse al recipiente una o más pegatinas sensibles a la temperatura que cambian de color a temperaturas por debajo de aproximadamente 4°C y temperaturas mayores que aproximadamente la temperatura ambiente (aproximadamente 22 – 29 °C).

El tercer paso puede implicar el transporte de la muestra a una instalación de procesamiento. Se puede apreciar que si la muestra se recoge en la instalación de procesamiento, no es necesario el transporte de la muestra. En algunos casos, puede ser deseable recoger la muestra en la instalación de procesamiento con el fin de establecer más claramente la cadena de custodia de la muestra. Con la recepción de la primera donación de heces para cualquier individuo, se establecerá un perfil para cada donante. Las muestras de heces posteriores pueden someterse a un análisis de heces humanas, que se utiliza para hacer coincidir y confirmar la identidad del donante con la donación. Con base en muestras recolectadas previamente, se genera un perfil de heces humanas para el donante y puede mantenerse o mejorarse con donaciones repetidas. Cualquier nueva muestra se comparará con este perfil para confirmar que es el mismo donante. Se puede hacer una diferenciación para confirmar la identidad del donante en base a la representación de las especies de *Bacteroides* en las heces humanas. En un ejemplo no limitante, el conjunto básico de muestras de heces usadas para crear el perfil se recoge en la instalación de procesamiento para asegurar la identidad del donante en las muestras de perfil. En otro ejemplo no limitante, el conjunto básico de muestras de heces usadas para crear el perfil se puede recolectar en ubicaciones distintas a la instalación de procesamiento, con protocolos de aseguramiento de la identidad del donante apropiados para la situación o ubicación.

El cuarto paso del método puede incluir el etiquetado de la donación en "Cuarentena" y el mantenimiento de la donación en cuarentena a temperatura ambiente o por debajo de la misma durante no más de 24 horas antes del procesamiento. Las donaciones pueden ser rechazadas en situaciones en las que el indicador de temperatura ha sido activado o en las que el tiempo entre la donación y la recepción excede las 24 horas. Además, cuando sea aplicable, los resultados de las pruebas de heces humanas deben coincidir con el perfil del donante. Si el análisis de materia fecal humana no concuerda con el perfil del donante, la donación recolectada para ese día será descartada y el donante será descalificado.

En un método de la divulgación, la muestra de heces humanas se procesa dentro de aproximadamente 24 horas de la recolección. En otro método de la solicitud, el tiempo de recolección se registra en el momento de llegada de la muestra de heces en la instalación de procesamiento. El paso seis puede incluir la inspección de la donación de heces. La inspección visual se puede completar a la llegada de la muestra de heces en la instalación de procesamiento. En caso de que la muestra de heces humanas no sea firme, esté no formada, no tenga suficiente peso (por ejemplo, menos de aproximadamente 50 g) o por cualquier otro motivo, incluyendo, pero no limitado a, evidencia que indique mala calidad de la muestra o inquietudes sobre la salud del donante, la muestra puede ser rechazada, etiquetada como "Inspección - Rechazada" y la donación se descarta. Además, las respuestas a las preguntas del formulario de recolección de heces humanas pueden ser revisadas por personal capacitado. Ciertas respuestas en el formulario de recopilación pueden requerir un amplio rechazo. Si la muestra es aceptada, puede etiquetarse como "Inspección - Aceptada" y puede trasladarse a un proceso de fabricación.

Otro ejemplo de método para examinar donantes, obtener muestras de heces humanas y procesar las muestras de heces para obtener un producto para TRM se ilustra en el diagrama de flujo representado en la Figura 2. El primer paso puede incluir el reclutamiento de posibles donantes. El segundo paso puede incluir que los posibles donantes tengan que completar un Cuestionario del Historial de Salud Inicial del Donante (CHSID). El cuestionario puede ser similar al utilizado por la Cruz Roja para el examen de posibles donantes de sangre (con posibles preguntas de

examen adicionales, si se desea). Un resultado de "fallo" hace que el posible donante sea rechazado y eliminado del grupo de donantes. Por ejemplo, un donante recibirá un resultado de "fallo" bajo condiciones similares a las que causarían que un posible donante fallara un examen de la Cruz Roja. Un resultado de "pasa" hace que el donante sea aceptado para más análisis. El cuarto paso puede implicar más análisis y revisiones que, si el donante falla, elimina al donante del grupo. Los donantes son examinados regularmente para detectar enfermedades infecciosas comunes y otras afecciones que se detallan a continuación. Se llevará a cabo una revisión de la historia médica del donante por parte de personal capacitado, y se repetirán los análisis de examen a intervalos regulares, tal como, pero no limitado a, aproximadamente cada 15 – 90 días. El análisis puede incluir los componentes enumerados en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1: Análisis de examen de donantes

Nombre de la prueba	Material analizado	Criterios de aceptación
<i>C. difficile</i> B mediante PCR y GDH	Heces	▪ Negativo para <i>C. Difficile</i> ▪ El resultado de GDH no es un criterio de aprobado / desaprobado, solo para información.
Norovirus mediante PCR	Heces	Negativo
Rotovirus mediante PCR	Heces	Negativo
Adenovirus mediante PCR	Heces	Negativo
Patógenos entéricos (<i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> , sorbitol-negativo <i>E. coli</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Plesiomonas</i> , toxinas <i>Shiga</i>)	Heces	▪ Negativo para <i>Shigella</i>, <i>Salmonella</i>, <i>Camphylobacter</i>, sorbitol-negativo <i>E. coli</i>, <i>Aeromonas</i>, <i>Yersinia</i>, y <i>Plesiomonas</i>. ▪ No se detectaron toxinas <i>Shiga</i>
Antígeno <i>Giardia</i>	Heces	Negativo
Antígeno <i>Cryptosporidium</i>	Heces	Negativo
Tinción ácido – resistente (<i>Clysolepora</i> , <i>Isospora</i>)	Heces	Negativo
Huevos y Parásitos	Heces	Sin detección / identificación de: <i>Giardia</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> (ameba), huevos de <i>Helminth</i> , protozoos, larvas de gusanos y segmentos.
<i>Enterococci</i> resistente a la vancomicina (ERV)	Heces	No ERV aislados
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la metilicina (SARM)	Heces	No SARM aislados
Vibrio	Heces	No reactivo
Listeria	Sangre (Suero)	Negativo
Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)	Sangre (Suero)	No reactivo
Hepatitis A (IgG); debe ser + o si no debe ser vacunado	Sangre (Suero)	No reactivo
Hepatitis B: antígeno de superficie de hepatitis B debe ser + o debe ser vacunado	Sangre (Suero)	No reactivo
Anticuerpos Hepatitis C	Sangre (Suero)	No reactivo
Anticuerpos Treponema	Sangre (Suero)	Negativo
Estos son solo ejemplos. También pueden utilizarse otras pruebas.		

- El paso cinco puede implicar la aceptación que un donante pase al grupo de donantes, y el paso seis puede implicar el suministro al donante de un kit de recolección de heces. El paso siete puede implicar iniciar un cronograma de recolecciones regulares de muestras de heces del donante aceptado, y el paso ocho puede implicar la fabricación de un producto farmacéutico a partir de las muestras de heces recogidas. El paso nueve puede implicar poner en cuarentena el medicamento, y el paso diez puede implicar volver a examinar la muestra de heces del donante a los 45 días. Si la muestra no supera el examen, se descarta todo el producto farmacéutico producido de ese donante durante los últimos 45 días. Si la muestra pasa el examen, el producto farmacológico se libera de la cuarentena (paso 11).
- En otro método ejemplar, se pesa una muestra de heces humanas y se transfieren de 45 a 75 g de la muestra a una bolsa de filtro estéril. Se usa una mezcla de solución salina y un crioprotector (por ejemplo, polietilenglicol (PEG) 3350) como diluyente, y de este modo se puede añadir a la muestra de heces humanas. Como se usa en el presente documento, los términos "mezcla solución salina / PEG" y "diluyente" son intercambiables. La concentración de PEG del diluyente es de 30 – 90 g / litro. La concentración de PEG del diluyente también puede ser aproximadamente entre alrededor de 25 – 75 g / litro. En un ejemplo, la relación de la mezcla solución salina / PEG a la muestra de heces es de 2: 1, o 2 ml de solución salina / PEG en 1 gramo de heces humanas. Como ejemplo no limitativo, se pueden usar aproximadamente 100 ml de mezcla solución salina / PEG para 50 g de heces humanas. Si bien la solución salina / PEG puede ser adecuada para su uso como diluyente (y / o crioprotector), esto no pretende ser limitante. Se pueden utilizar también otros crioprotectores. Por ejemplo, se pueden utilizar como crioprotectores la dextrosa, betaína, glicina, sacarosa, alcohol polivinílico, Pluronic F-127, manitol, Tween 80, etilenglicol, 1,3-propanodiol, hidroxipropilcelulosa, glicerol, mezcla de PEG / glicerol, propilenglicol, o combinaciones de los mismos. Estos materiales pueden usarse solos o en combinación con un disolvente tal como la solución salina.
- Una vez que el diluyente se añade a la bolsa que contiene la muestra de heces humanas, la bolsa se sella. Usando una batidora de paleta, la muestra de heces se mezcla con el diluyente. El producto de la mezcla de muestra de heces y el diluyente se denomina preparación bacteriana.
- La preparación bacteriana se puede filtrar según técnicas estándar y el filtrado puede retirarse de la bolsa de mezcla y transferirse a sacos o bolsas estériles. En algunas realizaciones, la preparación bacteriana no se filtra.
- En otras realizaciones, cada bolsa que contiene la preparación bacteriana (filtrada o no filtrada) es equivalente a una dosis de producto para TRM y se trata como una dosis para TRM. En otras realizaciones, las bolsas pueden almacenarse según el protocolo apropiado y dividirse en cantidades más pequeñas en una fecha posterior. En aún otras realizaciones, las bolsas pueden almacenarse según el protocolo apropiado, y combinarse para hacer una o más dosis. Además, una o más de las bolsas de la preparación bacteriana se pueden conservar para Control de Calidad (QC).
- En un ejemplo no limitativo, se pueden etiquetar las bolsas con el número de producto y congelarse. Una vez que se realiza esto, las bolsas pueden considerarse como dosis de producto para TRM. El número de producto puede incluir una referencia a la identificación del donante y a la fecha de fabricación (fecha de procesamiento). El producto para TRM se puede congelar entre aproximadamente -20 °C y aproximadamente -80 °C o más frías. Entonces se puede poner en cuarentena al producto para TRM hasta la evaluación de los resultados del análisis de Control de Calidad y los análisis adicionales, como se describe a continuación.
- En otro ejemplo no limitativo, se pueden etiquetar las bolsas con el número de producto y congelarse. El número de producto puede incluir una referencia a la identificación del donante y a la fecha de fabricación (fecha de procesamiento). Estas bolsas etiquetadas pueden ser congeladas entre aproximadamente -20 °C y aproximadamente -80 °C o más frías (por ejemplo, enfriadas a aproximadamente -192 °C como se puede lograr congelando con nitrógeno líquido, si se desea). El contenido de las bolsas se puede poner en cuarentena hasta la evaluación de los resultados del análisis de Control de Calidad y los análisis adicionales, como se describe a continuación.
- En un análisis ejemplar de la calidad del producto para TRM fabricado (incluida la viabilidad de los microbios a medida que se procesa), se puede procesar una donación fecal o muestra de materia fecal recogida de un solo donante calificado en un solo día. En algunas realizaciones, no se realizará la agrupación de muestras entre donantes o entre muestras de un donante individual. En otras realizaciones, se agrupan o combinan las preparaciones de muestra de un donante individual. En otras realizaciones, se combinan preparaciones de muestra de más de un donante.
- Una muestra de las heces humanas procesadas o el producto para TRM se puede diluir, sembrar en placas, incubar y contar según los procedimientos estándar de la industria. Las UFC anaeróbicas se pueden contar en una placa CDC y los UFC *Bacteroides* se pueden contar en una placa BBE. El recuento de las placas se comparará con los estándares de Control de Calidad, que pueden incluir, pero no están limitados a, resultados de análisis de

donaciones anteriores para el donante en particular y otras normas establecidas y apropiadas. Si los recuentos están dentro del rango aceptable, el producto para TRM se considerará aceptable. Si los recuentos no están dentro del rango aceptable, todas las bolsas del producto para TRM fabricadas a partir de la misma muestra de heces humanas serán retiradas del congelador y destruidas. Los intervalos de recuento final aceptables pueden estar entre aproximadamente 30 y aproximadamente 300 UFC a un nivel de dilución en serie de 10^{-6} en las placas de CDC y entre aproximadamente 30 a aproximadamente 300 UFC a un nivel de dilución en serie de 10^{-5} en las placas de BBE, antes de la congelación de la preparación de muestra o producto para TRM.

En las Figuras 3A y 3B se muestra un método ejemplar para procesar una sustancia farmacológica (compuesto para TRM) desde la liberación de la cuarentena hasta el envío a un cliente. El primer paso puede incluir la liberación de una sustancia farmacológica de la cuarentena, y el paso dos puede incluir el traslado del recipiente de recolección a una cabina BioSafety de Nivel II. El paso tres puede incluir el tarado de una bolsa de filtro en un soporte de bolsa en la cabina BioSafety sobre una báscula calibrada, y luego el pesado de alrededor de $50 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$ de sustancia farmacológica en la bolsa de filtro, en el paso cuatro. El paso cinco puede incluir la adición de 3 ml / g de solución premezclada PEG / solución salina a la sustancia farmacológica en la bolsa de filtro. La solución premezclada de PEG / solución salina se puede preparar en la etapa A mediante la reconstitución de polvo de PEG a una concentración de 30 g / l en 0.9% de cloruro de sodio para irrigación USP. El paso seis puede incluir el sellado de la bolsa de filtro cargada en una bolsa de cierre y el sellado de la bolsa de cierre. El paso siete puede incluir la remoción de la unidad de bolsa sellada de la cabina BioSafety y la colocación de la bolsa en un mezclador de paletas. En el paso ocho, la bolsa puede mezclarse en el mezclador de paletas a 230 rpm durante 2 minutos, luego de lo cual se retira la bolsa del mezclador de paletas y se devuelve la bolsa a la cabina BioSafety en el paso nueve. En la etapa diez, se pueden pipetear 150 ml de la suspensión filtrada y colocar en una bolsa de enema de etileno y acetato de vinilo (EVA), seguido por el sellado de la bolsa de enema en la etapa once. Se puede reservar una muestra de la suspensión filtrada para los análisis de calidad del producto. En el paso B1, se pueden preparar las placas CDC y BBE. El paso B2 puede incluir la creación de diluciones en serie de la suspensión filtrada restante. Este paso se lleva a cabo una vez por lote. En la etapa B3, se inoculan las placas CDC y BBE con las diluciones en serie y se incuban durante 48 horas a 37°C . En la etapa B4, se cuentan las unidades formadoras de colonias (UFC) por placa.

El método ejemplar se continúa en la Figura 3B. En la etapa trece, el producto farmacéutico sellado en una bolsa de enema de EVA puede enfriarse previamente a 0°C durante 60 minutos. En el paso catorce, la bolsa de EVA puede colocarse en un congelador a -80°C en cuarentena hasta que se reciban los resultados del paso B y los análisis del donante. Si el producto farmacéutico no supera la prueba, se descartan todas las dosis afectadas del producto farmacéutico. Si el medicamento pasa la prueba, se puede trasladar la bolsa de EVA, en el paso quince, de la cuarentena a un área de almacenamiento a largo plazo en el congelador a -80°C . Mientras que el producto farmacéutico está almacenado en el congelador a -80°C , se puede recibir un pedido de un cliente. En el paso dieciséis, se puede extraer la bolsa de EVA del congelador y descongelarse a 0°C durante 60 minutos. En el paso diecisiete, puede inspeccionarse la bolsa de EVA para detectar fugas. Si la bolsa no pasa la inspección, el producto se descarta, y si la bolsa pasa la inspección, se embala la bolsa de EVA en el paso 18 y se envía al cliente.

La Figura 4 resume un ejemplo de un método de entrega en un diagrama de flujo. Un pedido de cliente o sitio de un producto para TRM desencadena que un producto liberado se extraiga del almacenamiento a largo plazo a -80°C . El sitio puede ser un consultorio médico, una clínica, un hospital u otro lugar donde se vaya a utilizar el producto para TRM. El producto es descongelado y etiquetado. Se lleva a cabo el control de calidad (CC) del proceso de etiquetado, causando un fallo en el proceso de etiquetado que el producto sea etiquetado nuevamente y pasado de nuevo por el control de calidad. La superación del CC provoca el traslado del producto a la etapa de embalaje, donde el producto se embala en cajas de envío y luego se envía al sitio.

La Figura 5 resume otro ejemplo de un método de entrega en un diagrama de flujo. Se solicita el producto, se recibe e inspecciona. Un fallo del producto al pasar la inspección hace que se deseche el producto, se envíe un informe al centro de procesamiento y se vuelve a solicitar el producto a suministrar. Si el producto pasa la inspección, se envía un informe al centro de procesamiento y el producto o bien se lleva al paciente para su tratamiento, o bien se almacena en un lugar seguro antes de llevarlo al paciente para su tratamiento. En cualquier caso, el embalaje primario se descarta después de que se le da el producto al paciente.

En la Figura 6 se muestra un ejemplo de sistema de envasado 10. El sistema de envasado 10 puede incluir una bolsa de muestra 12. Se puede usar la bolsa de muestra 12 para contener un compuesto para TRM como se describe en este documento, una caja protectora interna 14, una unidad de tubo 16, un embalaje 18 (por ejemplo, TYVEK®) para la unidad de tubo 16, una caja para estantería 20 (que alojará la bolsa de muestra 12, la caja interior protectora 14, a unidad de tubo 16 en el interior del embalaje 18, e instrucciones). La caja para estantería 20 puede colocarse en una caja de envío aislada 22 (por ejemplo, que puede incluir espuma de poliestireno) junto con bolsas de hielo, y la caja de envío 22 puede transportarse a una instalación de tratamiento. La caja de envío 22 puede

cerrarse y sellarse con cinta siguiendo un patrón en H para limitar el intercambio de aire entre el sistema de envasado 10 y la atmósfera exterior.

Se sometió luego el sistema de envasado 10 a un intervalo de temperaturas variable durante un período de tiempo prolongado. Las condiciones de análisis incluían la extracción de la bolsa de muestra 12 de un baño de descongelación (por ejemplo, a $0 \pm 0,5$ °C), la colocación del sistema de envasado 10 en un ambiente "frío" (por ejemplo, -20 ± 3 °C durante $4 \text{ h} \pm 30 \text{ min}$), el mantenimiento del sistema de envasado 10 a temperatura ambiente durante un primer período (22 ± 3 °C durante $8 \text{ h} \pm 30 \text{ min}$), la colocación del sistema de envasado 10 en un entorno "caliente" (50 ± 3 °C durante $4 \text{ h} \pm 30 \text{ min}$), el mantenimiento del sistema de envasado 10 a temperatura ambiente durante un segundo período de tiempo (22 ± 3 °C durante $8 \text{ h} \pm 30 \text{ min}$), la colocación del sistema de envasado 10 en un entorno "cálido" (35 ± 3 °C durante $4 \text{ h} \pm 30 \text{ min}$) y el mantenimiento del sistema de envasado 10 a temperatura ambiente durante un tercer período de tiempo (22 ± 3 °C durante $8 \text{ h} \pm 30 \text{ min}$). Bajo estas condiciones, la temperatura de la bolsa de muestra 12 permaneció por debajo de los 20 °C durante todo el período de tiempo (aproximadamente 36 horas). Según estos resultados de análisis, el sistema de envasado 10 proporciona una protección adecuada a la bolsa de muestra 12 frente a extremos climáticos anticipados para la entrega de los compuestos para TRM descritos en este documento.

La Figura 7 ilustra la bolsa de muestra 12. La bolsa 12 puede ser formada a partir de etilvinil acetato. Se contemplan otros materiales. Por ejemplo, la bolsa 12 puede incluir una película de poliéster de tereftalato de polietileno, un material sustancialmente impermeable a los gases, otros polímeros o similares. La bolsa 12 puede parecerse a una bolsa intravenosa y, opcionalmente, la bolsa 12 puede incluir un accesorio que permite que la bolsa 12 esté colgada en un soporte (por ejemplo, para estar posicionada / colgada por encima de un endoscopio).

La bolsa 12 puede tener una capacidad en el intervalo de aproximadamente 25-250 ml (por ejemplo, 50 ml). La bolsa 12 puede tener un orificio de llenado 24 para transportar el compuesto para TRM a la bolsa 12. El orificio de llenado 24 puede incluir un adaptador luer u otro tipo de adaptador para facilitar el transporte del compuesto para TRM. Después de llenar la bolsa 12 con el compuesto para TRM, se puede sellar el orificio de llenado 24, sellando eficazmente el compuesto para TRM en el interior de la bolsa 12. La bolsa 12 también puede incluir un orificio en punta 26. El orificio en punta 26 puede utilizarse para extraer el compuesto para TRM de la bolsa 12 en el momento de uso.

La Figura 8 ilustra la unidad de tubo 16. La unidad de tubo 16 puede incluir un miembro de punta 28 que está diseñado para perforar el orificio de punta 26 en la bolsa 12. La unidad de tubo 16 también puede incluir un cuerpo de tubo 30 con un adaptador escalonado 32. El adaptador escalonado 32 puede permitir que se acople el tubo 16 a un tubo de suministro 34.

La unidad de tubo 16 puede incluir una serie de características adicionales. Por ejemplo, puede estar acoplada una abrazadera 36 al tubo de suministro 34. Además, también puede estar dispuesto un marcador visual 38 a lo largo del tubo de suministro 34. Puede estar dispuesta una cubierta de punta 40 a lo largo del miembro de punta 28.

Los compuestos para TRM descritos en el presente documento están diseñados para permanecer estables durante largos períodos de tiempo en diversas condiciones de temperatura. Por ejemplo, cuando se almacenan a temperaturas de aproximadamente 20-25 °C, los compuestos para TRM pueden permanecer estables (por ejemplo, con una población viable de microbios) durante aproximadamente 24 horas o más, durante aproximadamente 48 horas o más, durante aproximadamente 96 horas o más, o durante aproximadamente 192 horas o más. Cuando se almacenan a temperaturas de aproximadamente 4 °C, los compuestos para TRM pueden permanecer estables (por ejemplo, con una población viable de microbios) durante aproximadamente 24 horas o más, durante aproximadamente 48 horas o más, durante aproximadamente 96 horas o más, durante aproximadamente 192 horas o más, o durante aproximadamente 240 horas o más. En otras palabras, la "vida útil descongelada" de los compuestos para TRM puede ser del orden de aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente 96 horas o más, aproximadamente 192 horas o más, o aproximadamente 240 horas o más.

Cuando se almacenan a temperaturas de aproximadamente -20 °C, los compuestos para TRM pueden permanecer estables (por ejemplo, con una población viable de microbios) durante aproximadamente 60 – 90 días o más, durante aproximadamente 4 – 6 meses o más, o durante aproximadamente 6 – 9 meses o más. Cuando se almacenan a temperaturas de aproximadamente -80 °C, los compuestos para TRM pueden permanecer estables (por ejemplo, con una población viable de microbios) durante aproximadamente 60 – 90 días o más, durante aproximadamente 4 – 6 meses o más, durante aproximadamente 6 – 9 meses o más, o durante aproximadamente 12 meses o más. En otras palabras, la "vida útil congelada" de los compuestos para TRM puede ser del orden de aproximadamente 60 – 90 días o más, aproximadamente 4 – 6 meses o más, aproximadamente 6 – 9 meses o más, o aproximadamente 12 meses o más.

Los compuestos para TRM de la presente divulgación pueden incluir bacterias 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 al menos algunas realizaciones, los compuestos para TRM de la presente divulgación pueden incluir bacterias 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 al menos algunas realizaciones, los compuestos para TRM de la presente divulgación pueden incluir bacterias 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 al menos algunas realizaciones, los compuestos para TRM de la presente divulgación pueden incluir bacterias 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, al menos 7 familias. En al menos algunas realizaciones, los compuestos para TRM de la presente divulgación pueden incluir bacterias que son miembros de al menos 5, al menos 10, al menos 20 o al menos 30 géneros diferentes de bacterias. En al menos algunas realizaciones, los compuestos para TRM de la presente divulgación pueden incluir al menos 10, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300 o al menos 400 especies diferentes de bacterias.

Por ejemplo, los compuestos para TRM pueden incluir bacterias viables de 1 o más órdenes o 2 o más órdenes, que incluyen, pero no se limitan a, *Bacteroidales* y *Clostridiales*. En algunas realizaciones, aproximadamente el 20 – 95%, o aproximadamente el 30 – 85%, o aproximadamente el 40 – 60% de las bacterias viables en los compuestos para TRM pueden ser del orden *Bacteroidales*. En algunas de estas, y en otras realizaciones, aproximadamente el 10 – 85%, o aproximadamente el 20 – 60%, o aproximadamente 30 – 40% de las bacterias viables en los compuestos para TRM pueden ser del orden *Clostridiales*.

Además o alternativamente, los compuestos para TRM pueden incluir bacterias de 5 o más familias, o aproximadamente 6 – 12 familias, o aproximadamente 7 – 10 familias. Estas pueden incluir bacterias de las familias *Bacteroidaceae*, *Burkholderiales*, *Clostridiaceae*, *Clostridiales*, *Eubacteriaceae*, *Firmicutes*, *Lachnospiraceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Ruminococcaceae* y *Streptococcaceae*. En algunas realizaciones, aproximadamente el 20 – 84%, o aproximadamente el 30 – 50%, o aproximadamente el 36 – 48% de las bacterias viables en los compuestos para TRM pueden ser de la familia *Bacteroidaceae*. En algunas de estas y en otras realizaciones, aproximadamente el 0,5 – 2% o aproximadamente el 1% de las bacterias viables en los compuestos para TRM pueden ser de la familia *Burkholderiales*. En algunas de estas y en otras realizaciones, aproximadamente el 1 – 10%, o aproximadamente el 1 – 8%, o aproximadamente el 2 – 7% de las bacterias viables en los compuestos para TRM pueden ser de la familia *Clostridiaceae*. En algunas de estas y en otras realizaciones, aproximadamente el 1 – 22%, o aproximadamente el 3 – 22%, o aproximadamente el 1 – 10%, o aproximadamente el 1 – 8%, o aproximadamente el 4 – 7% de las bacterias viables en los compuestos para TRM pueden ser de la familia *Clostridiales*. En algunas de estas y en otras realizaciones, aproximadamente el 1 – 10%, o aproximadamente el 1 – 9%, o aproximadamente el 4 – 8% de las bacterias viables en los compuestos para TRM pueden ser de la familia *Eubacteriaceae*. En algunas de estas y en otras realizaciones, aproximadamente el 0,5 – 2%, o aproximadamente el 1% de las bacterias viables en los compuestos para TRM pueden ser de la familia *Firmicutes*. En algunas de estas y en otras realizaciones, aproximadamente el 0,5 – 23%, o aproximadamente el 1 – 10%, o aproximadamente el 4 – 9% de las bacterias viables en los compuestos para TRM pueden ser de la familia *Lachnospiraceae*. En algunas de estas y en otras realizaciones, aproximadamente el 0,5 – 8%, o aproximadamente el 1 – 5%, o aproximadamente el 1 – 3% de las bacterias viables en los compuestos para TRM pueden ser de la familia *Porphyromonadaceae*. En algunas de estas y en otras realizaciones, aproximadamente el 0,5 – 2%, o aproximadamente el 1% de las bacterias viables en los compuestos para TRM pueden ser de la familia *Prevotellaceae*. En algunas de estas y en otras realizaciones, aproximadamente el 1 – 30%, o aproximadamente el 1 – 52%, o aproximadamente el 4 – 23% de las bacterias viables en los compuestos para TRM pueden ser de la familia *Rikenellaceae*. En algunos de estos y en otras realizaciones, aproximadamente 5-30%, o aproximadamente 8-25%, o aproximadamente 10-18% de las bacterias viables en los compuestos para TRM pueden ser de la familia *Ruminococcaceae*. En algunas de estas y en otras realizaciones, aproximadamente el 0,5 – 2%, o aproximadamente el 1% de las bacterias viables en los compuestos para TRM pueden ser de la familia *Streptococcaceae*.

Los compuestos para TRM de la presente divulgación pueden tener un índice de diversidad de Shannon de aproximadamente 0,4 – 2,5, o de aproximadamente 1,0 – 2,0, o de aproximadamente 1,08 – 1,89, o de aproximadamente 1,25 – 1,75. Estos números se calculan a nivel de "familia". Hacer cálculos en otros niveles (por ejemplo, filos, especies, etc.) daría como resultado números diferentes (por ejemplo, 1 – 8 aproximadamente). Por lo tanto, el índice de diversidad de Shannon puede estar en el orden de 1 – 8 cuando se calcula en filos, especies u otros niveles.

Un compuesto para TRM de la presente divulgación se puede administrar mediante un método adecuado para depositar en el tracto gastrointestinal, preferiblemente el colon, de un sujeto (por ejemplo, humano, mamífero, animal, etc.). Los ejemplos de vías de administración incluyen administración rectal mediante colonoscopia, supositorio, enema, endoscopia superior, enteroscopia de inserción superior. Además, se puede utilizar la intubación a través de la nariz o la boca por sonda nasogástrica, sonda nasoentérica o tubo yeyunal nasal. También se puede usar la administración oral mediante un sólido tal como una píldora, comprimido, una suspensión, un gel, un comprimido de gel, un semisólido, una bolsita, una pastilla o una cápsula o microcápsula, o como una formulación enteral, o reformulada para la administración final en forma de líquido, una suspensión, un gel, un comprimido de

gel, un semisólido, un comprimido, una bolsita, una pastilla o una cápsula, o como una formulación enteral. Los compuestos, que pueden ser flora fecal tratada o sin tratarse, microbiota completa (o sustancialmente completa), o bien, la flora fecal parcial, sustancial o completamente aislada o purificada, se liofilizan, criodesecan o congelan, o se procesan en forma de polvo.

Para uso terapéutico en el método de la presente divulgación, puede administrarse un compuesto convenientemente en una forma que contiene uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados son bien conocidos en la técnica y varían con la forma y el modo de administración deseados para el compuesto. Por ejemplo, estos pueden incluir diluyentes o excipientes tales como cargas, aglutinantes, agentes humectantes, disgregantes, agentes tensioactivos, deslizantes, lubricantes y similares. Típicamente, el vehículo puede ser un sólido (incluido polvo), líquido o combinaciones de los mismos. Cada vehículo es preferiblemente "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes del compuesto y no ser perjudicial para el sujeto. El vehículo puede ser biológicamente aceptable e inerte (por ejemplo, permite que el compuesto mantenga la viabilidad del material biológico hasta que se administre en el sitio apropiado).

Los compuestos orales pueden incluir un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para los fines de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usar en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Los compuestos orales también se pueden preparar mediante la combinación de un compuesto de la presente divulgación con un alimento. En una realización, se enfría un alimento utilizado para administración, por ejemplo, helado. Se pueden incluir agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y / o materiales adyuvantes, como parte del compuesto. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y otros similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de 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 Sterotex; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo, sabor a naranja u otros saborizantes adecuados. Estos se mencionan solo con fines de ejemplo y no están destinados a ser limitantes.

Los compuestos activos también se pueden preparar en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios 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 el compuesto contra una eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Tales formulaciones se pueden preparar usando técnicas estándar. Los materiales también se pueden obtener comercialmente en, por ejemplo, *Alza Corporation* y *Nova Pharmaceuticals, Inc.* Las suspensiones liposómicas también se pueden usar como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse según métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Un compuesto puede estar encapsulado. Por ejemplo, cuando el compuesto se va a administrar por vía oral, la forma de dosificación se formula de modo que el compuesto no se exponga a las condiciones prevalentes en el tracto gastrointestinal antes del colon, por ejemplo, a alta acidez y a las enzimas digestivas presentes en el estómago y / o el intestino. La encapsulación de compuestos para uso terapéutico es rutinaria en la técnica. La encapsulación puede incluir cápsulas de cubierta dura, y se puede usar para cápsulas de cubierta blanda con ingredientes secos y en polvo. Las cápsulas pueden realizarse a partir de soluciones acuosas de agentes gelificantes tales como proteína animal (por ejemplo, gelatina), polisacáridos de plantas o derivados tales como carragenanos y formas modificadas de almidón y celulosa. Se pueden añadir otros ingredientes a una solución de agente gelificante tales como plastificantes (por ejemplo, glicerina y / o sorbitol), agentes colorantes, conservantes, disgregantes, lubricantes y tratamientos de superficie.

Las formulaciones adecuadas para la administración rectal incluyen geles, cremas, lociones, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, materiales sólidos solubles, duchas y similares. Las formulaciones se proporcionan preferiblemente como supositorios de dosis unitaria que comprenden el ingrediente activo en uno o más vehículos sólidos que forman la base del supositorio, por ejemplo, manteca de cacao. Los vehículos adecuados para tales formulaciones incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes y combinaciones de los mismos. Alternativamente, se pueden formular lavados de colon con el agente de despliegue de recolonización rápida de la presente divulgación para administración colónica o rectal.

Las formulaciones adecuadas para administración oral se pueden proporcionar como unidades discretas, tales como comprimidos, cápsulas, jarabes, elixires, goma de mascar, formulaciones de "piruletas", microemulsiones, soluciones, suspensiones, pastillas, o ampollas recubiertas de gel, conteniendo, cada una, una cantidad predeterminada del compuesto activo; como polvos o gránulos; como soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; o como emulsiones de aceite en agua o agua en aceite.

Las formulaciones adecuadas para métodos transmucosos, tales como administración sublingual o bucal incluyen pastillas para chupar, comprimidos y similares que comprenden el compuesto activo y, típicamente, una base saborizada, tal como azúcar y goma arábiga o tragacanto y pastillas que comprenden el compuesto activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa de acacia.

Las formulaciones de la divulgación se pueden preparar mediante cualquier método adecuado, típicamente mezclando uniforme e íntimamente la flora intestinal predeterminada con vehículos líquidos o sólidos finamente divididos o ambos, en las proporciones requeridas y luego, si es necesario, dando forma a la mezcla resultante para obtener el formato deseado. Además, la flora intestinal predeterminada se tratará para prolongar su vida útil; preferiblemente la vida útil de la flora intestinal predeterminada se extenderá mediante liofilización.

Además, se puede preparar un comprimido mediante compresión de una mezcla íntima que comprende un polvo o gránulos del ingrediente activo y uno o más ingredientes opcionales, tales como un aglutinante, lubricante, diluyente inerte o agente dispersante tensioactivo, o mediante moldeo de una mezcla íntima del ingrediente activo en polvo de la presente divulgación. Además de los ingredientes específicamente mencionados anteriormente, las formulaciones de la presente divulgación pueden incluir otros agentes conocidos por los expertos en la técnica, teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión. Por ejemplo, las formulaciones adecuadas para administración oral pueden incluir agentes saborizantes y las formulaciones adecuadas para administración intranasal pueden incluir perfumes.

Los compuestos terapéuticos de la divulgación se pueden administrar mediante cualquier método convencional disponible para su uso en conjunto con fármacos, ya sea como agentes terapéuticos individuales o en una combinación de agentes terapéuticos. La dosificación administrada variará, por supuesto, dependiendo de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente particular y su modo y vía de administración, la edad, la salud y el peso del receptor, la naturaleza y el alcance de los síntomas, el tipo de tratamiento concurrente, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. Se puede esperar que una dosis diaria de ingrediente activo sea de aproximadamente 0,001 a 1000 miligramos (mg) por kilogramo (kg) de peso corporal.

Las formas de dosificación (compuestos adecuados para su administración) contienen de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg de ingrediente activo por unidad. En estos compuestos farmacéuticos, el ingrediente activo normalmente estará presente en una cantidad de aproximadamente 0,5 – 95% en peso basado en el peso total del compuesto.

Se apreciará que los compuestos de la combinación se pueden administrar: (1) simultáneamente por combinación de los compuestos en una co – formulación o (2) por alternancia, es decir, administrando los compuestos en serie, secuencialmente, en paralelo o simultáneamente en formulaciones farmacéuticas separadas. En la terapia de alternancia, el retraso en la administración del segundo, y opcionalmente un tercer ingrediente activo, no debe ser tal que se pierda el beneficio de un efecto terapéutico sinérgico de la combinación de los ingredientes activos. Según ciertos aspectos por cualquiera de los métodos de administración (1) o (2), idealmente la combinación debe administrarse para lograr los resultados más eficaces. En ciertas realizaciones, por cualquiera de los métodos de administración (1) o (2), idealmente la combinación se debe administrar para alcanzar las concentraciones plasmáticas máximas de cada uno de los ingredientes activos.

Los expertos en la técnica apreciarán que la cantidad de ingredientes activos en las combinaciones de la divulgación requerida para uso en el tratamiento variará según una variedad de factores, que incluyen la naturaleza de la afección que se está tratando y la edad y el estado del paciente, y en última instancia quedará a discreción del médico tratante o el profesional de la salud. Los factores a considerar incluyen la vía de administración y la naturaleza de la formulación, el peso corporal del animal, la edad y el estado general y la naturaleza y gravedad de la enfermedad a tratar.

El compuesto del fármaco de muestra puede envasarse en una caja para estantería y luego embalsarse en una caja de cartón corrugado aislada para su envío al cliente en el momento del pedido. El compuesto del fármaco de muestra se envía después de la descongelación a 0 °C desde los -80 °C del congelador de almacenamiento a largo plazo. Para garantizar que la suspensión líquida está adecuadamente protegida de las fluctuaciones de temperatura durante el envío, el sistema de envasado estuvo sujeto a temperaturas variables durante un período de 24 horas. El diseño para este proceso de prueba fue adaptado de la norma internacional ASTM F2825-10, Práctica estándar para el estrés climático de los sistemas de envasado para la entrega de envases únicos. El objetivo de la prueba era garantizar que el producto no experimentaría temperaturas por debajo de un umbral aceptable (32 °F o 0 °C) o excediera un umbral aceptable (84 °F o 29 °C).

El producto puede administrarse a pacientes que tienen una variedad de afecciones médicas diferentes y puede producir un efecto deseable en estas afecciones. Algunas de las afecciones médicas que pueden verse afectadas de forma deseable incluyen enfermedades vasculares cardiovasculares y / o vasculares periféricas, alergias, obesidad, hipoglucemia, estreñimiento, celiaquía (por ejemplo, enfermedad celíaca), cáncer gastrointestinal (por ejemplo, el cáncer gastrointestinal es al menos uno de entre el cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer

de vesícula biliar, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer anal y tumores del estroma gastrointestinal), distonía mioclónica, sacroileítis, espondiloartropatía, espondiloartritis, miopatía miotónica proximal; una enfermedad autoinmune, síndrome de nefritis, autismo, diarrea del viajero, sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado, pancreatitis crónica, una insuficiencia pancreática, síndrome de fatiga crónica, encefalomiелitis miálgica benigna, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmune, enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM), enfermedades neurológicas degenerativas, convulsiones de tipo gran mal o convulsiones de tipo petit mal, enfermedad de Steinert, mononucleosis infecciosa crónica, encefalomiелitis miálgica epidémica, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), una reacción alérgica aguda o crónica, obesidad, anorexia, síndrome del intestino irritable (SII o colon espástico) enfermedad de Crohn, enfermedad del intestino irritable (EII), colitis, colitis ulcerosa o colitis de Crohn, mononucleosis infecciosa crónica, encefalomiелitis miálgica epidémica, urticaria aguda o crónica, lupus, artritis reumatoide (AR) o artritis idiopática juvenil (AIJ), síndrome pre-diabético, fibromialgia (FM), diabetes tipo I o tipo II, insomnio agudo o crónico y el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH).

En el caso de humanos, la presente divulgación abarca métodos de tratamiento de trastornos crónicos asociados con la presencia de microflora entérica anormal. Tales trastornos incluyen, pero no se limitan a, las afecciones de las siguientes categorías: trastornos gastrointestinales incluyen el síndrome de intestino irritable o colon espástico, trastorno funcional del intestino (TFI), que incluye TFI con estreñimiento predominante, TFI predominantemente dolorosa, TFI abdominal superior, dispepsia no ulcerosa (DNU), reflujo gastroesofágico, enfermedad inflamatoria intestinal incluyendo enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis indeterminada, colitis colágena, colitis microscópica, infección crónica por *Clostridium difficile*, colitis pseudomembranosa, colitis mucosa, colitis asociada a antibióticos, estreñimiento idiopático o simple, enfermedad diverticular, enteropatía por SIDA, sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado, enfermedad celíaca, poliposis en espiral, pólipos del colon, síndrome pseudo obstructivo idiopático crónico; infecciones intestinales crónicas con patógenos específicos que incluyen bacterias, virus, hongos y protozoos; trastornos gastrointestinales virales, que incluyen gastroenteritis virales, gastroenteritis viral de Norwalk, gastroenteritis por rotavirus, gastroenteritis relacionada con el SIDA; trastornos hepáticos tales como cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, hígado graso o cirrosis criptogénica; trastornos reumáticos tales como artritis reumatoide, artritis no reumatoide, artritis sin factor reumatoide positivo, espondilitis anquilosante, enfermedad de Lyme y síndrome de Reiter; trastornos mediados por el sistema inmunitario tales como glomerulonefritis, síndrome urémico hemolítico, diabetes mellitus juvenil, crioglobulinemia mixta, poliarteritis, fiebre mediterránea familiar, amiloidosis, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico y síndrome de Behcets; trastornos autoinmunes que incluyen lupus sistémico, púrpura trombocitopénica idiopática, síndrome de Sjogren, síndrome urémico hemolítico o esclerodermia; síndromes neurológicos como síndrome de fatiga crónica, migraña, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, miastenia gravis, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, Polineuropatía Desmielinizante Inflamatoria Crónica y otros trastornos degenerativos; trastornos siquiátricos que incluyen depresión crónica, esquizofrenia, trastornos psicóticos, enfermedad maniaco depresiva; trastornos regresivos que incluyen, síndrome de Aspergers, síndrome de Rett, trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) y trastorno por déficit de atención (TDA); el trastorno regresivo, autismo; síndrome de muerte súbita del lactante (SMSL), anorexia nerviosa; afecciones dermatológicas tales como urticaria crónica, acné, dermatitis herpetiforme y trastornos de vasculitis; y trastornos y enfermedades cardiovasculares y / o vasculares.

Ejemplos

La descripción se puede clarificar adicionalmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que sirven para ejemplificar algunas realizaciones, y no para limitar la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1: Confirmación de métodos de caracterización de muestra

Se completaron análisis para confirmar los métodos para caracterizar una muestra de heces humanas normales. Se realizó un Análisis de Sistemas de Medición (ASM) para identificar los componentes de la variación en el análisis de medición descrita anteriormente. Para ello, se reclutaron 5 donantes humanos sanos de diferentes edades, géneros y masa corporal. Se recogieron muestras de heces de cada donante, y se procesaron según métodos estándar predeterminados. Las suspensiones bacterianas resultantes se sembraron en placas y crecieron en las dos placas diferentes descritas anteriormente (las placas CDC y BBE).

Las variables evaluadas incluyeron: 5 donantes diferentes, 3 proporciones de líquido a heces humanas, 2 tipos de placas, 4 niveles de dilución por placa, 6 placas por nivel de dilución, recuentos dobles (utilizados para calcular el error atribuido a los contadores humanos de placas), un total de 550 placas contadas dos veces, y 20 ejecuciones (juegos de placas).

Las mediciones de prueba se analizaron con Gage R & R anidado (repetibilidad y reproducibilidad) usando el software estadístico Minitab 15 y se evaluaron las bandas de error. Se determinó que el proceso de análisis era repetible y reproducible dentro de bandas de error especificadas. Si bien se reconoció que no todos los microbios

pueden ser cultivados y contados, este método demuestra que un subconjunto representativo de microbios en la suspensión bacteriana se puede utilizar como indicadores de muestras normales de heces humanas sanas.

Ejemplo 2: Bolsa de Enema y Durabilidad del Orificio

Se analizaron tres bolsas de etileno y acetato de vinilo (EVA) similares a la bolsa de muestra 12 para evaluar la durabilidad de los orificios cuando se congelan a -80°C . Se utilizaron las temperaturas y el tiempo por procedimiento de fabricación para simular la producción y la manipulación futuros del producto. Las bolsas se sometieron a pruebas de estanqueidad previas a la congelación, previas a la descongelación y posteriores a la descongelación. Se llenaron las bolsas con 100 ml de solución salina y se sellaron los orificios. Para determinar si las juntas a lo largo de los bordes de las bolsas tenían fugas, se invirtieron las bolsas para determinar si los orificios estaban completamente sellados. Se colocaron las bolsas en un baño de enfriamiento a 0°C durante una hora, luego se colocaron en un congelador a -80°C durante un mes en orientaciones variables. La muestra de bolsa A se colocó plana, la muestra de bolsa B se colocó sobre un lado largo, y la muestra de bolsa C se colocó sobre un lado corto. Después de un mes, se sacaron las bolsas del congelador a -80°C y se inspeccionaron en busca de roturas, grietas y fugas. Además, se realizó una prueba de caída al dejar caer las bolsas de EVA congeladas sobre esquinas, caras y orificios desde una altura de 91, 44 cm (36 pulgadas). Las pruebas de caída incluyeron hacer caer las muestras sobre las esquinas, los orificios y las superficies planas del producto para simular posibles errores de manipulación al retirar el futuro producto del almacenamiento. Las bolsas se volvieron a inspeccionar después de cada caída con los criterios anteriores. Cada prueba de caída se repitió tres veces por muestra, excepto por la inspección inicial del sello perimetral de la bolsa. Todas las bolsas de muestra pasaron todas las pruebas (no se detectó ninguna fuga).

Luego fueron sometidas las bolsas a un proceso de descongelación. Cada muestra se sumergió en un baño de glicerol / agua durante 1 hora a 0°C . Se extrajeron las muestras, se secaron y se repitió la prueba de caída. Una vez más, todas las bolsas de muestras pasaron todas las pruebas (no se detectó ninguna fuga).

Ejemplo 3: Estudio Clínico

Se administró un compuesto para TRM como se describe en el presente documento a 31 sujetos en un estudio clínico de Fase 2. No se informaron eventos adversos graves y no se asociaron eventos adversos con el producto o su administración. De los sujetos, 27 sujetos experimentaron una resolución exitosa de sus síntomas de DACDr (diarrea recurrente asociada a *Clostridium difficile*) después de recibir una o dos dosis del compuesto para TRM, definida por la no recurrencia de los síntomas de DACDr durante 56 días después de la administración. De estos 27 sujetos, 16 experimentaron la resolución completa de DACDr después de recibir una dosis del compuesto para TRM, y los otros 11 sujetos experimentaron recurrencia después de la primera administración, pero luego alcanzaron con éxito el criterio de valoración de 56 días, después de una segunda administración del compuesto para TRM. De estos sujetos, 4 sujetos se consideraron fracasos terapéuticos: 3 sujetos experimentaron recurrencia de DACDr después de recibir su segunda dosis del compuesto para TRM, y 1 sujeto experimentó recurrencia después de la primera dosis y no recibió una segunda administración.

Las dosis del compuesto para TRM se seleccionaron aleatoriamente de los lotes clínicos fabricados disponibles. Las dosis que se administraron reflejan productos hechos a partir de cuatro donantes. Ninguno de los atributos del producto (masa de la dosis, microbios viables, vida útil, vida útil descongelada, etc.) parece correlacionarse con el resultado clínico, o puede usarse para predecir si una dosis ocasionará un resultado exitoso. La información del resultado clínico se proporciona al final de este ejemplo.

Información sobre las dosis del compuesto para TRM administradas en el estudio clínico de Fase 2:

Se descongelaron, enviaron y dosificaron a pacientes humanos 45 dosis del compuesto para TRM. Se representa la edad de la dosis (AD) (que es la fecha de fabricación de las dosis hasta la fecha de administración al paciente clínico). Se proporcionan a continuación las estadísticas asociadas con los diversos atributos del compuesto para TRM:

Valor promedio de AD = 43.2 horas

Desviación estándar de AD = 14.9 horas

Valor mínimo de AD = 22.1 horas

Valor máximo de AD = 73.8 horas

Se deduce que no hay correlación o detrimento del resultado clínico (resolución de la diarrea recurrente asociada al *Clostridium difficile*) y estos atributos del producto.

Ejemplo 4: selección de un crioprotector

Se ha encontrado que el uso de un crioprotector, en particular polietilenglicol (PEG), mantiene la viabilidad (según lo determinan las UFC en placas CDC y BBE) del compuesto para TRM después de la congelación y la descongelación. Esto incluye el período de tiempo desde la descongelación, el envío en un envase a temperatura controlada y el tiempo que transcurre desde la apertura hasta el tratamiento del paciente. Al igual que con la prueba de calidad anterior, los intervalos de recuento final aceptables para los productos para TRM antes de ser congelados pueden estar entre aproximadamente 30 y aproximadamente 300 UFC en el nivel de dilución 10^{-6} en las placas CDC, y entre aproximadamente 30 y aproximadamente 300 UFC en el nivel de dilución 10^{-5} en las placas BBE. Un método para asegurar que se mantiene la viabilidad es el requisito del usuario o cliente final, que incluye, pero no se limita a, un médico o clínico, de usar el producto dentro de las 48 horas de recibir el producto. Además, se requerirá que el usuario final almacene el producto entre aproximadamente 2 y aproximadamente 29 °C hasta su uso.

Se analizó la adición de un crioprotector desde dos perspectivas. Primero, se analizaron varios crioprotectores para evaluar el efecto inicial de la adición del crioprotector al producto para TRM. Esta prueba se usó para determinar la mortalidad o la viabilidad del producto para TRM cuando se mezcló con un crioprotector particular. La segunda perspectiva analizada fue la capacidad real de protección contra congelamiento de un crioprotector particular en el producto para TRM cuando el producto para TRM se congeló y luego se descongeló para su administración al paciente. El resultado de este cultivo indicó cuán viable permaneció el producto después de la congelación / descongelación.

Se completaron pruebas para explorar los efectos de la adición de una variedad de diferentes crioprotectores para TRM potenciales a una mezcla de heces humanas homogeneizada y filtrada (o producto para TRM). Las pruebas solo pretendían cuantificar la respuesta de las bacterias a la adición inicial del crioprotector, y no incluyeron el análisis de si el crioprotector fue exitoso en la protección de las bacterias durante un ciclo de congelación – descongelación posterior. En estas pruebas, se dividieron las donaciones de heces humanas individuales entre varias pruebas, con una muestra de "control" con solo solución salina isotónica normal (es decir, sin crioprotectores agregados) utilizada como punto de referencia. Se usaron placas CDC y placas BBE. Para todas las pruebas, se utilizó un promedio ponderado de recuentos de UFC que combinaban los resultados de dos niveles de dilución diferentes. Los crioprotectores utilizados incluyeron: 10% de leche desnatada, 5% de glicerol, 10% de glicerol, 10% de DMSO y polietilenglicol (PEG) con pesos moleculares que varían de 600 a 20000.

Para las placas CDC: el 10% de leche desnatada, el 10% de glicerol y el PEG funcionaron todos razonablemente bien, con recuentos de UFC que resultaron dentro de aproximadamente el 25% del control de solución salina. Es de destacar que las concentraciones más altas de glicerol dieron como resultado una mortalidad microbiana considerable en una relación dependiente de la dosis.

Para las placas BBE: solo las formulaciones de PEG no mostraron una mortalidad microbiana significativa. Es de destacar que las formulaciones con 10% de glicerol produjeron casi un 90% de mortalidad (10% de supervivencia), y que las concentraciones más altas de glicerol arrojaron un 100% de mortalidad (como se observó usando los niveles de dilución actuales).

Teniendo en cuenta los resultados de las placas BBE de glicerol al 10%, se llevó a cabo una investigación adicional para ver si podía eliminarse la mortalidad del 90% (en la placa BBE) debida a la adición del glicerol. Se formuló la hipótesis de que la disminución de la concentración de glicerol al 5%, o el enfriamiento de la mezcla microbiana antes de la adición del glicerol (para ralentizar la actividad metabólica) podría reducir la elevada mortalidad prevista. La solución de glicerol al 5% obtuvo una mortalidad menor que el 10%, y el enfriamiento también disminuyó la mortalidad en una relación dependiente de la dosis. Sin embargo, estos efectos no fueron lo suficientemente fuertes como para superar los resultados de referencia, y se observó una mortalidad de al menos 60% en todas las pruebas en glicerol versus el control.

El mantenimiento de la viabilidad de los microbios en un producto para TRM es crítico desde el momento de la recolección de heces humanas hasta el momento de administrar la dosis del producto para TRM a un paciente. Por lo tanto, es importante que el crioprotector añadido no tenga un efecto tóxico significativo sobre los microbios cuando se añade inicialmente. De los crioprotectores analizados, solo las formulaciones de PEG dieron buenos resultados. La leche desnatada no tuvo un rendimiento particularmente bueno con respecto a los resultados de BBE. Los inconvenientes adicionales debidos al uso de leche incluyen el potencial de aumento de las posibilidades de reacción alérgica y el perfil de caracterización variable de la leche. Del mismo modo, el DMSO no dio buenos resultados en las placas BBE. Además, aunque el DMSO se usa de forma tópica en aplicaciones medicinales, actualmente no existen usos conocidos en el sistema gastrointestinal humano. El glicerol al 10% dio buenos resultados en las placas de CDC, pero exhibió un 80 – 90% de mortalidad (10 – 20% de supervivencia) en las placas de BBE.

Ejemplo 5: Crioprotectores Adicionales

Se extrajo microbiota intestinal humana de las heces humanas en una solución salina acuosa que contenía una cantidad de crioprotectores potenciales diferentes a una concentración específica. Estas soluciones se analizaron para determinar el pH y se cultivaron en placas de agar CDC y BBE para medir la carga microbiana viable, luego se congelaron a -80 °C durante 1 a 7 días, y luego se descongelaron. A continuación, se analizó el pH de una muestra de la solución descongelada y se cultivó en placas de agar CDC y BBE para medir la carga microbiana viable. Los crioprotectores con un resultado de "++" mostraron resultados de viabilidad significativamente mayores en comparación con PEG3350 (y glicerol), aquellos con "+" tuvieron resultados considerados por lo menos tan buenos como el glicerol, aquellos con "0" tuvieron resultados mixtos y pueden o pueden no ser crioprotectores adecuados, y aquellos con "-" tuvieron un desempeño peor que el glicerol y no deberían considerarse como crioprotectores efectivos para soluciones de microbiota intestinal humana. Los resultados, basados en mediciones de pH y enumeración de microbios viables usando placas de agar CDC y BBE sugirieron lo siguiente: la dextrosa, betaína, glicina, sacarosa, alcohol polivinílico y Pluronic F-127 en DMSO tuvieron un resultado calificado como "++". El Manitol, Tween 80, etilenglicol, 1,3 – propanodiol, hidroxipropilcelulosa, glicerol, mezcla PEG / glicerol y propilenglicol tuvieron un resultado calificado como "+". El propilenglicol (3% p / v) y el aceite de pescado tuvieron un resultado calificado como "0". El hidróxido de magnesio, la urea y la goma xantana tuvieron una puntuación de "-". El puntaje de "- +" se usó para indicar que se encontró que el pH no era aceptable, pero que los resultados en la placa eran aceptables.

Ejemplo 6: Ejemplo de proceso de producción

Se completaron pruebas para simular un proceso de producción completo ejemplar en el que una muestra procesada de heces humanas (diluida, homogeneizada y filtrada) se enfría, se congela para almacenamiento a largo plazo, se descongela, se envía a un sitio cliente y se calienta a la temperatura corporal antes de realizar el enema de retención. El proceso de producción simuló un proceso nominal para la recolección de heces humanas; dilución de heces humanas directamente en una solución de crioprotección (o diluyente o mezcla salina / PEG) en una relación de 2:1 a 4:1; proceso nominal de homogeneización y filtración; enfriamiento del producto envasado en un baño de fluido circulante; almacenamiento congelado a largo plazo; calentamiento del producto envasado en un baño de fluido circulante; embalaje del producto para el envío con "envases fríos" y en materiales aislantes; envío de un día para otro al cliente; calentamiento hospitalario del producto para infusión inmediata en el paciente. Como parte del estudio, se variaron tres parámetros para explorar sus efectos sobre la viabilidad o supervivencia microbiana global (medida mediante dilución en serie sobre placas CDC y BBE para incubación y recuento de UFC). Estos parámetros incluyeron el uso de un crioprotector, la temperatura de un baño de refrigeración y la temperatura de un baño de descongelación.

Para la prueba de crioprotectores, el estudio incluyó muestras sin crioprotector (solución salina normal); 10% de glicerol y PEG 3350 a 59 g / litro. Para probar el uso de un baño de enfriamiento, el estudio incluyó muestras que fueron directamente al congelador (-80 °C) y, por lo tanto, no se sometieron a un baño de enfriamiento, muestras que fueron directamente a un baño de enfriamiento a 0 °C, y muestras que fueron directamente a un baño de enfriamiento a -11 °C. El calentamiento se ensayó a 0 °C, + 10 °C y + 20 °C. Cada ensayo de permutación se normalizó a una muestra control que utilizó el mismo crioprotector, pero se sembró en placa de inmediato y NO se sometió a ninguno de los procesos de congelación – descongelación.

Los crioprotectores, si se usaron, se mezclaron con solución salina normal y se añadieron durante el proceso de homogeneización (véase la definición de diluyente y mezcla de solución salina / PEG). Por lo tanto, toda mortalidad microbiana debida a la adición del crioprotector (por ejemplo, tal como se ha visto con glicerol, especialmente en las placas BBE) solo se observará mediante comparación de las UFC de las muestras de control.

Se encontró que los parámetros de congelación y descongelación tuvieron poco efecto sobre la supervivencia microbiana global. Esto resulta generalmente claro para las placas de CDC, donde los datos generalmente se comportan bien y los resultados, para todos los parámetros de congelación – descongelación, varían bien solo dentro de un nivel de registro único de dilución. Para las placas BBE, los datos en bruto tuvieron un comportamiento mucho menos bueno, con varios casos de valores atípicos aparentes y casos en los que se incumplió la regla 10x al comparar los niveles de dilución adyacentes (es decir, niveles logarítmicos). Sin embargo, aun así no hubo una diferencia evidente debida a los parámetros de congelación – descongelación.

Los efectos debidos a los diferentes crioprotectores utilizados se observaron claramente. Para este análisis, se utilizó una media aritmética simple de los resultados de los diferentes parámetros de congelación – descongelación para comparar el rendimiento del crioprotector. Para las placas de CDC, "sin crioprotección" se obtuvo un 18% de supervivencia (82% de mortalidad) durante la congelación – descongelación, mientras que la adición de glicerol y PEG redujo un poco esta mortalidad en el orden del 30% (67% y 75% de supervivencia, respectivamente). Con respecto a las muestras tratadas con glicerol, los resultados anteriores empeoran la mortalidad desde la adición

inicial del glicerol. Cuando se hizo la adición inicial del crio protector a los efectos de la congelación / descongelación, la magnitud de este efecto fue de alrededor del 80% de mortalidad. Esto se comparó con una mortalidad de aproximadamente 32% para la muestra que usaba PEG como crio protector.

En placas BBE, el efecto de la adición de glicerol fue una mortalidad muy alta, de 80% a 90%. En contrapartida, las placas de PEG mostraron una toxicidad inicial baja o nula del crio protector y un fuerte efecto conservante durante el ciclo de congelación – descongelación. La supervivencia acumulada global al utilizar PEG es del 75% frente al control (mortalidad del 25%). Se concluyó que el glicerol al 10% tiene un rendimiento bajo en las placas de BBE, basándose en la combinación de la mortalidad inicial y las pérdidas por congelación – descongelación del orden de pérdida de 1-log (10% de supervivencia). El PEG-3350 se comporta bien tanto en placas CDC como en BBE. El PEG tiene una toxicidad inicial baja para los microbios (pérdidas mínimas o nulas debido a la adición del crio protector a las heces humanas) y ofrece una protección significativa en comparación con "sin crio protector". Se anticipa que cada dosis para TRM tendrá un mínimo de 10^7 microbios / ml de suspensión, con un mínimo de 100 ml de suspensión administrada por dosis.

Ejemplo 7: Kit de trasplante fecal

En un ejemplo, se puede crear un kit de componentes para ayudar en el trasplante fecal. En un ejemplo, se puede enviar un kit de donación a un médico. El kit de donación puede incluir equipo para muestras de sangre y fecales del paciente o, en ciertos ejemplos, un donante saludable. Debido a que gran parte de la microbiota intestinal del paciente es anaeróbica, muchos organismos pueden morir con la exposición al aire. En un ejemplo, el kit de donación puede incluir materiales para enviar las muestras de sangre y de heces sin dañar las muestras (por ejemplo, congelación rápida, hielo seco, etc.).

Una vez enviados a una instalación (por ejemplo, un emplazamiento, emplazamientos regionales, muchos emplazamientos, etc.), las muestras pueden analizarse y se puede confirmar la existencia de *Clostridium difficile* o la presencia o ausencia de una o más enfermedades o afecciones. En otros ejemplos, se puede analizar una muestra fecal saludable y prepararse para su uso como tratamiento.

En un ejemplo, una vez que las muestras del paciente se analizan para verificar la enfermedad o afección, o se analizan las muestras del donante para verificar la salubridad u otra compatibilidad (por ejemplo, la existencia de una o más condiciones deseadas, etc.), se puede preparar un tratamiento (por ejemplo, utilizando la muestra fecal de donantes sanos, al menos una porción de una o más muestras fecales sanas almacenadas, tales como material de un banco fecal, etc.) y enviar de vuelta al médico para la administración y el tratamiento del paciente. En ciertos ejemplos, el tratamiento se conserva (por ejemplo, congelado, etc.) durante el envío. El kit puede incluir la muestra fecal procesada o tratamiento en un recipiente estéril, como un tubo nasogástrico (NG), un vial (por ejemplo, para usar con un enema de retención), una cápsula gastrorresistente (por ejemplo, biorresistente al ácido para llegar al tracto intestinal, teniendo un exterior estéril), etc. En un ejemplo, una vez recibido, el médico clínico puede almacenar los contenidos de una manera tal que preserve la microbiota hasta que estén listos para insertarse en el paciente.

Ejemplo 8: Formulaciones de vida útil extendida

Se estudió la capacidad de supervivencia del contenido microbiano humano sano de las heces del donante en el almacenamiento a largo plazo. Se procesaron las muestras de heces con y sin un crioprotector y se enfriaron / descongelaron a diferentes temperaturas controladas. Luego se extrajeron las muestras después de 360 días (12 meses) de almacenamiento a -80 °C y -20 °C, se descongelaron a temperaturas controladas y se sembraron en dos tipos de placas de agar (Agar de sangre al 5% del Centro para el Control de Enfermedades (CDC) y Agar con Bilis y Esculina para Bacteroides (BBE) respectivamente). Se registró y analizó el valor global de unidades de formación de colonias por mililitro (UFC / ml). A partir del estudio, se analizaron primero las muestras conservadas sin crioprotector, seguidas por las muestras conservadas con concentraciones variables de diferentes crioprotectores.

Los recuentos de placas de CDC cultivados a partir de muestras "sin crioprotectores" demostraron que la temperatura del congelador y el tiempo de almacenamiento tuvieron un impacto significativo en los valores de UFC recuperables. Estos datos son consistentes con los datos registrados en momentos de tiempo anteriores. En este modelo, los valores de R^2 indican que aproximadamente el 59% de la variación (Adj. R^2) en los datos es explicado por el modelo, una caída de aproximadamente el 80% demostrada por el modelo después de 180 días (6 meses) de almacenamiento.

Cuando se hizo un almacenamiento a -20 °C, la mayoría de las muestras produjeron recuentos de UFC / ml que cayeron por debajo del límite inferior considerado aceptable para la especificación del producto (10^8 UFC / ml). Por el contrario, las muestras almacenadas a -80 °C demostraron recuentos que permanecieron por encima del límite inferior deseado para la especificación del producto. A partir de esto, se concluyó que el almacenamiento a largo

plazo de las muestras preparadas sin el uso de un crioprotector y almacenadas a -80 °C dio como resultado una mayor viabilidad en comparación con las muestras almacenadas a -20 °C.

Para los datos recopilados de las muestras almacenadas con crioprotector, el tiempo de almacenamiento y la temperatura del congelador fueron los factores más significativos para la respuesta de recuentos de CDC en UFC / ml. La mayor parte de la variación observada en los datos se explica por el tiempo de almacenamiento, la temperatura del congelador y la interacción entre ellos, como puede verse por los valores de R^2 obtenidos de 0,59.

Las muestras combinadas con crioprotectores y almacenadas a -20 °C continuaron demostrando una disminución más significativa en UFC / mL recuperables. Los ensayos de las muestras comienzan a caer por debajo del límite de especificación de producto de 10^8 entre los 60 y los 90 días (2 y 3 meses) para las muestras almacenadas a -20 °C. La tasa de disminución en la cantidad de UFC / mL recuperables disminuye más allá de los 60 días (2 meses) de almacenamiento. Sin embargo, a una temperatura de almacenamiento de -80 °C, los recuentos de UFC / ml recuperables permanecen relativamente estables durante 270 días (9 meses) de almacenamiento. Además, la mayoría de los recuentos se mantuvieron por encima del límite de especificación de producto mínimo de 10^8 UFC / ml.

El almacenamiento de las muestras a una temperatura del congelador más baja y por menos tiempo tiene un efecto positivo en los recuentos – a medida que el tiempo avanza desde el momento de fabricación, se vuelve más difícil de garantizar una recuperación confiable de UFC / ml que indica la población microbiana viable del producto. Sin embargo, los datos sugieren que el efecto del tiempo de almacenamiento se puede atenuar con la adición de PEG 3550 como crioprotector, así como también almacenar el material a baja temperatura (en este caso, -80 °C).

Ejemplo 9: Formulaciones de vida útil extendidas

Se procesaron heces humanas tal como se describe en el presente documento; se usó una muestra inicial de la suspensión procesada para crear diluciones en serie para la inoculación en placas de agar. Una vez que se retiró la muestra de la suspensión, la suspensión restante (aproximadamente 150 ml) se transfirió a dos (2) bolsas de almacenamiento estériles de EVA separadas. Cada bolsa se congeló a -80 °C durante una semana.

Después de una semana, se retiraron las bolsas del congelador y se descongelaron según el protocolo de lotes de compuesto para TRM. Se tomaron muestras de las bolsas para medir el recuento y diversidad de UFC / mL recuperables inmediatamente después del congelamiento; cada muestra se diluyó en serie y se sembró en placas CDC y BBE. Las bolsas se almacenaron luego a dos temperaturas diferentes, 4 °C y 25 °C, y se tomaron muestras cada 24 horas durante un total de 192 horas.

Las muestras en cada momento de tiempo fueron analizadas también por un laboratorio contratado para determinar la biodiversidad mediante el uso de la metodología 16s rRNA. Para cada muestra, se extrae el ARN de las células bacterianas y se replica ("amplifica") usando un cebador hecho a partir de una serie de pares de bases necesarias para iniciar la replicación del ARN. Después de que el ARN se amplifica, se suprime el ruido de las secuencias -un proceso que determina la probabilidad estadística de un conjunto de nucleótidos emparejados correcta o incorrectamente- y se usa para identificar cada organismo utilizando el software BLASTn de la biblioteca de programas del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Se determina la identidad de los organismos encontrados en cada muestra por la longitud de la secuencia que contiene los pares de bases más estadísticamente probables de ser consecutivos en una muestra. Los números finales (recuentos directos y porcentajes de organismos identificados de filos a especies, si corresponde) se informan a Rebiotix para su uso en la determinación del cambio en la biodiversidad a lo largo del tiempo en cada muestra.

El producto sufre una caída inicial de UFC / ml recuperables tanto en las placas CDC como BBE una vez extraídas del congelador y descongeladas (momento de tiempo $t = 0$ horas), que es consistente con las observaciones de estudios previos realizados por Rebiotix (P-006, P-007, P-009, P-012).

El producto descongelado mantenido a 25 °C mantuvo un recuento global de UFC / ml recuperables más alto que el material almacenado a 4 °C durante 192 horas.

Las UFC / ml recuperables contadas en todas las placas de CDC, independientemente del recuento total, se consideraron "estables" a ambas temperaturas a lo largo del experimento basado en el sistema de medición Rebiotix (P-001). Los resultados de UFC / ml a ambas temperaturas de almacenamiento permanecieron dentro de 1 log desde el recuento inicial en la descongelación hasta 192 horas.

Las UFC / ml recuperables contadas en las placas BBE demostraron un aumento en UFC / ml recuperables cuando se almacenaron a 25 °C en comparación con la muestra original de previamente congelada en el transcurso de 192 horas de almacenamiento. A 4 °C, sin embargo, la UFC / ml recuperable mantuvo un recuento sin cambios (cambio menor a 1 log) durante todo el tiempo de retención de 192 horas.

El producto descongelado a ambas temperaturas cumplió con la especificación de liberación del producto de Rebiotix durante el tiempo de retención de 192 horas, independientemente de una ganancia o pérdida en el recuento de UFC / ml:

- 5 Especificación de carga microbiana posterior al congelamiento en CDC: 10^7 a 10^{14} UFC / ml
 Especificación de carga microbiana posterior al congelamiento en BBE: de 10^5 a 10^{14} UFC / ml
 Los resultados actualmente recogidos de este estudio indican que la diversidad fenotípica recuperable en las placas de CDC se aproxima más a la diversidad de la muestra original antes de la congelación cuando el producto se almacena a 25 °C después de la descongelación. Además, ambas muestras cumplieron con la especificación de liberación del producto de Rebiotix para una diversidad en el tiempo de ≥ 3 fenotipos únicos de colonia.

- 15 La caracterización genética de la biodiversidad (16s rRNA) de las muestras se lleva a cabo por un laboratorio contratado que examina los tipos bacterianos totales (a especies, si es posible) así como las concentraciones porcentuales de estos tipos de bacterias presentes en las muestras a lo largo del tiempo.

- 20 La comprensión preliminar del comportamiento del producto durante un período de retención de hasta 192 horas a dos temperaturas diferentes continúa cumpliendo con los estándares de liberación de producto de Rebiotix de UFC / ml, cuando se usa para inocular placas CDC y BBE. Se necesita más trabajo para confirmar estos hallazgos. Los datos del 16s rRNA de cada momento de tiempo están actualmente bajo análisis.

Ejemplo 10: datos de 16s rRNA

- 25 La presente divulgación proporciona compuestos que incluyen microbios fecales. Como se usa en el presente documento, el término "microbios fecales" se refiere a microorganismos que están presentes en el abdomen, el intestino o el colon, preferiblemente el colon, de un ser humano adulto normal sano. Un compuesto como tal se puede preparar procesando material fecal, como se describe en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "material fecal" se refiere a heces humanas. El material fecal no procesado contiene material no vivo y material biológico. El "material no vivo" puede incluir, pero no se limita a, bacterias muertas, células huésped eliminadas, proteínas, carbohidratos, grasas, minerales, moco, bilis, fibra no digerida y otros alimentos, y otros compuestos resultantes de la alimentación y de los productos de desecho metabólicos, y la digestión parcial o completa de los materiales alimenticios. "Material biológico" se refiere al material vivo en la materia fecal, e incluye microbios que incluyen células procariotas tales como bacterias y arqueas (por ejemplo, células procariotas vivas y esporas que pueden ser esporuladas para convertirse en células procarióticas vivas), células eucariotas tales como protozoos y hongos, y virus. El "material biológico" también puede referirse al material vivo (por ejemplo, los microbios, las células eucariotas y los virus) que están presentes en el colon de un ser humano normal sano. Los ejemplos de células procariotas que pueden estar presentes en un compuesto de la presente divulgación incluyen células que son miembros de la clase *Actinobacteria*, tales como la subclase *Actinobacteridae* o *Coriobacteridae*, tales como el orden *Bifidobacteriales* o *Coriobacteriales*, y / o tales como la familia *Bifidobacteriaceae* o *Coriobacteriaceae*; miembros del filo *Bacteroidetes*, tales como clase *Bacteroidia*, tales como clase *Bacteroidales*, y / o tales como familia *Bacteroidaceae* o *Rikenellaceae*; miembros del filo *Firmicutes*, como clase *Bacilli*, *Clostridia* o *Erysipelotrichi*, tales como el orden *Bacillales* o *Lactobacillales* o *Clostridiales* o *Erysipelotrichales*, y / o tales como la familia *Paenibacillaceae* o *Aerococcaceae* o *Lactobacillaceae* o *Streptococcaceae* o *Catabacteriaceae* o *Peptococcaceae* o *Peptostreptococcaceae* o *Ruminococcaceae* o *Clostridiaceae* o *Eubacteriaceae* o *Lachnospiraceae* o *Erysipelotrichaceae*; miembros del filo *Proteobacteria*, tales como la clase *Alphaproteobacteria* o *Betaproteobacteria* o *Gammaproteobacteria*, tales como el orden *Rhizobiales* o *Burkholderiales* o *Alteromonadales* o *Enterobacteriales*, y / o tales como la familia *Rhodobiaceae* o *Burkholderiaceae* o *Shewanellaceae* o *Enterobacteriaceae*; miembros del filo *Tenericutes*, tales como la clase *Mollicutes*, tales como el orden *Entomoplasmatales*, y / o tales como la familia *Spiroplasmataceae*; y / o miembros de la clase *Verrucomicrobiae*, tales como el orden *Verrucomicrobiales*, y / o tales como la familia *Verrucomicrobiaceae*. Estos son solo ejemplos.

- Los compuestos para TRM de la presente divulgación pueden incluir bacterias 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 p filos, al menos 7 filos, en al menos 8 filos, al menos 9 filos, o al menos 10 filos. En al menos algunas realizaciones, los compuestos para TRM de la presente divulgación pueden incluir bacterias 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 al menos algunas realizaciones, los compuestos para TRM de la presente descripción pueden incluir bacterias 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 pedidos. En al menos algunas realizaciones, los compuestos para TRM de la presente divulgación pueden incluir bacterias 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, al menos 7 familias. En al menos algunas realizaciones, los compuestos para TRM de la presente descripción pueden incluir bacterias que son miembros de al menos 5, al menos 10, al menos 20 o al menos 30 géneros diferentes de bacterias. En al menos algunas

realizaciones, los compuestos para TRM de la presente descripción pueden incluir al menos 10, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300 o al menos 400 especies diferentes de bacterias.

Las muestras de compuestos para TRM fabricados (fabricados como se describe en este documento) se proporcionaron al Laboratorio de Investigación y Pruebas, Lubbock, TX para la amplificación y secuenciación de 16s RNA usando la plataforma Illumina MiSeq. El propósito de este análisis fue obtener datos útiles para: validar la potencia tentativa de los ensayos de liberación y evaluar la diversidad y consistencia bacteriana intra e inter donantes.

El análisis 16s rRNA de todos los lotes de productos demostró que el proceso descrito en el presente documento dio como resultado perfiles de diversidad bacteriana deseables consistentes. Los datos también indicaron que el proceso de fabricación conservó un nivel de diversidad bacteriana consistente con respecto las heces normales y se consideró viable para el tratamiento de *C. difficile* recurrente, incluyendo el mantenimiento de los filos predominantes, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*.

Además, el producto fabricado a partir de heces de donantes individuales a lo largo del tiempo mantuvo un perfil de diversidad muy similar. La Tabla 2 presenta una versión condensada de los datos, destacando los promedios y las desviaciones típicas para el porcentaje de bacterias por Orden para todos los lotes fabricados y probados. Estas categorías de "Orden" representan las comunidades bacterianas más comúnmente identificadas en los lotes de productos.

Tabla 2. Todos los lotes (60) comparados por orden

Reino	Filo	Clase	Orden	Promedio %	Desviación Típica
<i>Bacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	59	15
<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	0	1
<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	35	11
<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	Desconocido	Desconocido	1	1
<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	0	0
<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	0	0
Sin acierto	Sin acierto	Sin acierto	Sin acierto	5	6

Ejemplo 11: Datos de 16s rRNA – donantes individuales

Para ilustrar aún más la consistencia de la fabricación del producto, se analizaron múltiples lotes de producto elaborado a partir del mismo donante a lo largo del tiempo. Las siguientes tablas indican que, durante el período de realización del ensayo clínico, múltiples lotes de producto procedentes de un solo donante exhibieron perfiles de diversidad similares. La microbiota de cada donante fue analizada por Familia bacteriana para garantizar que las tendencias en la diversidad continúan en un nivel genético más preciso. El índice de diversidad de Shannon (también indicado por H') es un método aceptado por la industria para informar la abundancia y uniformidad de los organismos presentes en el microbioma, y se utilizó a lo largo de este ejemplo. Se ha demostrado que abarca más completamente la variación en la profundidad de muestreo y, por lo tanto, es relevante para describir una comunidad microbiana compleja.

La diversidad bacteriana del Donante 1 se resume en la Tabla 3.

Tabla 3. Donante 1 - Medias y Variaciones de Lotes por Familia de Bacterias

Familia	Promedio %	Desviación Típica
<i>Bacteroidaceae</i>	36	7
<i>Bacteroidales</i> (Desconocido)	0	0
<i>Clostridiaceae</i>	6	2
<i>Clostridiales</i> (familia)	0	0
<i>Clostridiales</i> (Desconocido)	7	3
<i>Enterobacteriaceae</i>	0	0
<i>Eubacteriaceae</i>	6	1
<i>Lachnospiraceae</i>	4	1

(continuación)

Familia	Promedio %	Desviación Típica
<i>Porphyromonadaceae</i>	2	1
<i>Prevotellaceae</i>	1	0
<i>Rikenellaceae</i>	5	2
<i>Ruminococcaceae</i>	18	3
<i>Staphylococcaceae</i>	0	6
<i>Streptococcaceae</i>	0	0
XSin acierto	15	6

El índice de diversidad de Shannon para muestras múltiples del Donante 1 se resume en la Tabla 4.

5

Tabla 4. Donante 1 – Índice de Diversidad de Shannon

Identificación del Lote	Índice de Diversidad de Shannon (H')
13000-071713	1.91
13000-072913	1.96
13000-080513	1.96
13000-080613	1.81
13000-092313	1.87
13000-092613	2.00
13000-110613	1.80
13000-021314	1.78
PROMEDIO	1.89
DESVIACIÓN TÍPICA	0.08

La diversidad bacteriana del Donante 2 se resume en la Tabla 5.

10

Tabla 5. Donante 2 – Medias y Variaciones de Lotes por Familia de Bacterias

Familia	Promedio %	Desviación Típica
<i>Bacteroidaceae</i>	43	13
<i>Clostridiaceae</i>	2	2
<i>Clostridiales (familia)</i>	4	3
<i>Eubacteriaceae</i>	6	3
<i>Firmicutes</i> (Desconocido)	0	0
<i>Lachnospiraceae</i>	1	0
<i>Porphyromonadaceae</i>	3	1
<i>Rikenellaceae</i>	23	20
<i>Ruminococcaceae</i>	14	7
<i>Streptococcaceae</i>	1	1
Sin acierto	2	1

El índice de diversidad de Shannon para muestras múltiples del Donante 2 se resume en la Tabla 6.

Tabla 6. Donante 2 – Índice de Diversidad de Shannon

Identificación del Lote	Índice de Diversidad de Shannon (H')
13001-080613	1.45
13001-080913	1.70
13001-081213	1.46
13001-112513	1.44
13001-121013	1.64
PROMEDIO	1.54
DESVIACIÓN TÍPICA	0.12

5 La diversidad bacteriana del Donante 3 se resume en la Tabla 7.

Tabla 7. Donante 3 – Medias y Variaciones de Lotes por Familia de Bacterias

Familia	Promedio %	Desviación Típica
<i>Bacteroidaceae</i>	70	11
<i>Burkholderiales</i> (Desconocido)	0	0
<i>Clostridiaceae</i>	7	3
<i>Clostridiales</i> (Desconocido)	5	2
<i>Eubacteriaceae</i>	4	2
<i>Firmicutes</i> (Desconocido)	0	0
<i>Lachnospiraceae</i>	1	1
<i>Porphyromonadaceae</i>	1	1
<i>Rikenellaceae</i>	0	0
<i>Ruminococcaceae</i>	10	5
<i>Streptococcaceae</i>	0	0
Sin acierto	1	0

10 El índice de diversidad de Shannon para muestras múltiples del Donante 3 se resume en la Tabla 8.

Tabla 8. Donante 3 – Índice de Diversidad de Shannon

Identificación del Lote	Índice de Diversidad de Shannon (H')
13003-071613	1.19
13003-081313	0.98
13003-082013	1.04
13003-082713	1.06
13003-082913	1.01
13003-090513	1.17
13003-090913	1.10

(continuación)

Identificación del Lote	Índice de Diversidad de Shannon (H')
13003-091113	0.78
13003-091213	0.76
13003-091313	1.02
13003-092513	1.21
13003-100213	0.97
13003-101013	1.23
13003-101513	0.42
13003-110513	1.70
13003-111913	1.22
13003-120213	1.28
13003-021414	1.28
13003-021714	1.18
13003-021914	1.45
PROMEDIO	1.08
DESVIACIÓN TÍPICA	0.27

La diversidad bacteriana del Donante 4 se resume en la Tabla 10.

5

Tabla 10. Donante 4 – Medias y Variaciones de Lotes por Familia de Bacterias

Familia	Promedio %	Desviación Típica
<i>Bacteroidaceae</i>	44	12
<i>Burkholderiales</i> (Desconocido)	1	1
<i>Clostridiaceae</i>	4	1
<i>Clostridiales</i> (Desconocido)	6	2
<i>Eubacteriaceae</i>	8	5
<i>Firmicutes</i> (Desconocido)	1	1
<i>Lachnospiraceae</i>	9	4
<i>Porphyromonadaceae</i>	1	0
<i>Rikenellaceae</i>	5	2
<i>Ruminococcaceae</i>	17	8
<i>Streptococcaceae</i>	0	1
Sin acierto	2	3

El índice de diversidad de Shannon para muestras múltiples del Donante 4 se resume en la Tabla 11.

Tabla 11. Donante 4 – Índice de Diversidad de Shannon

Identificación del Lote	Índice de Diversidad de Shannon (H')
13004-071513	1.65
13004-071613	1.93
13004-071813	1.75
13004-072213	1.89
13004-072313	1.97
13004-072913	1.46
13004-073113	1.34
13004-080513	1.64
13004-080713	1.79
13004-080813	1.72
13004-090313	1.64
13004-090413	1.98
13004-100913	1.46
13004-102913	1.87
13004-103113	1.80
13004-110413	1.56
13004-111913	1.77
13004-112113	1.78
13004-120213	1.84
13004-021414	2.02
13004-021814	1.56
PROMEDIO	1.73
DESVIACIÓN TÍPICA	0.18

5

La diversidad bacteriana del Donante 5 se resume en la Tabla 12.

Table 12. Donante 5 - Medias y Variaciones de Lotes por Familia de Bacterias

Familia	Promedio %	Desviación Típica
<i>Bacteroidaceae</i>	48	6
<i>Bacteroidales</i> (Desconocido)	0	0
<i>Burkholderiales</i> (Desconocido)	0	0
<i>Clostridiaceae</i>	5	2
<i>Clostridiales</i> (Desconocido)	4	1
<i>Eubacteriaceae</i>	5	2
<i>Lachnospiraceae</i>	4	0

(continuación)

Familia	Promedio %	Desviación Típica
<i>Porphyromonadaceae</i>	1	1
<i>Rikenellaceae</i>	4	1
<i>Ruminococcaceae</i>	18	5
<i>Sutterellaceae</i>	0	0
Sin acierto	9	5

El índice de diversidad de Shannon para muestras múltiples del Donante 5 se resume en la Tabla 13.

5

Tabla 13. Donante 5 – Índice de Diversidad de Shannon

Identificación del Lote	Índice de Diversidad de Shannon (H')
13005-080713	1.75
13005-081513	1.65
13005-100113	1.83
13003-110513	1.71
13005-110613	1.52
13005-120913	1.65
PROMEDIO	1.68
DESVIACIÓN TÍPICA	0.11

La diversidad bacteriana del Donante 6 se resume en la Tabla 14.

10

Tabla 14. Donante 6 - Medias y Variaciones de Lotes por Familia de Bacterias

Familia	Promedio %	Desviación Típica
<i>Bacteroidaceae</i>	48	NA
<i>Bacteroidales</i> (Desconocido)	0	NA
<i>Burkholderiales</i> (Desconocido)	0	NA
<i>Clostridiaceae</i>	5	NA
<i>Clostridiales</i> (Desconocido)	4	NA
<i>Eubacteriaceae</i>	5	NA
<i>Lachnospiraceae</i>	4	NA
<i>Porphyromonadaceae</i>	1	NA
<i>Rikenellaceae</i>	4	NA
<i>Ruminococcaceae</i>	18	NA
<i>Sutterellaceae</i>	0	NA
Sin acierto	9	NA

El índice de diversidad de Shannon para muestras múltiples del Donante 6 se resume en la Tabla 15.

Tabla 15. Donante 6 – Índice de Diversidad de Shannon

Identificación del Lote	Índice de Diversidad de Shannon (H')
13008-021314	1.59
PROMEDIO	NA
DESVIACIÓN TÍPICA	NA

- 5 Debido al hecho de que solo se fabricó un lote a partir del Donante 6, no se pudo calcular ni el Promedio (H') ni la Desviación Típica del (H') en ese momento.

La caracterización molecular 16s rRNA del compuesto para TRM, como se describe en este documento, indica que se preserva una considerable diversidad bacteriana a través del proceso de fabricación. Si bien hay fluctuaciones en las cantidades relativas de diversas bacterias entre los donantes, la variación medida por la desviación estándar de los porcentajes promedio de Órdenes bacterianas específicas es bastante pequeña. Los perfiles de diversidad del producto elaborado a partir de donantes individuales recolectado a lo largo del tiempo demostraron un alto grado de similitud a nivel de Familia (véanse las Tablas para los Donantes 1 - 5). Por el contrario, los datos de 16s para microbios comúnmente asociados con enfermedades en pacientes estaban notablemente ausentes en los compuestos para TRM hechos a partir de donantes sanos. Los lotes de productos evaluados en este análisis se usaron en el estudio clínico de Fase 2, que demostró una tasa de curación del 87% con casos adversos aceptables leves a moderados. Estos datos son importantes ya que también corroboran que el nivel de diversidad bacteriana en el compuesto para TRM como se describe en este documento proporcionó un beneficio terapéutico.

20 Experimento 12: Éxito / Fracaso por Género de Donante

El éxito de los tratamientos que usan los compuestos para TRM descritos en este documento se tabularon teniendo en cuenta el género del donante. Se observó que el éxito del tratamiento después de una dosis única del compuesto para TRM era mayor cuando el donante fecal (cuya muestra fecal se utilizó en la fabricación del compuesto para TRM) era de sexo masculino. Dado que la respuesta a la dosis 2 es más similar entre los donantes y estas dosis se administraron a pacientes no medicados con antibióticos (sin tratamiento previo con antibióticos y con enfermedad activa), es posible que la flora de las mujeres donantes sea más susceptible a los antibióticos.

Tabla 16. Éxito / Fracaso por Género del Donante

	Paciente		Paciente	
Donante	Dosis 1		Dosis 2	
	Éxito	Fracaso	Éxito	Fracaso
F	2/11 (18%)	9/11 (82%)	3/4 (75%)	1/4(25%)
M	7/10 (70%)	3/10 (30%)	3/5 (60%)	2/5 (40 %)
F	4/9 (44%)	5/9 (56%)	4/4 (100%)	
M	3/3 (100%)		1/1 (100%)	

30

Se incorpora en este documento como referencia la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 61 / 337.283.

35 Se incorpora en este documento como referencia la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 61 / 351.184.

Se incorpora en este documento como referencia la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 13 / 576.573, publicada como solicitud de patente de los EE.UU. No. US 2013/0045274.

40 Se incorpora en este documento como referencia la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 14 / 093.913, publicada como Solicitud de Patente de los EE. UU. Pub. No. US 2014/0086877.

Debe entenderse que esta descripción es, en muchos aspectos, solo ilustrativa. El alcance de la invención está, por supuesto, definido en el lenguaje en el que se expresan las reivindicaciones adjuntas.

45

REIVINDICACIONES

1. Un método para fabricar un compuesto para terapia de restauración de la microbiota, comprendiendo el método:
5 la recolección de una muestra fecal humana;
 la adición de un diluyente a la muestra fecal humana para formar una muestra diluida;
 en el cual el diluyente incluye polietilenglicol con una concentración de 30 – 90 g / l;
 el mezclado de la muestra diluida con un aparato de mezclado;
10 la filtración de la muestra diluida;
 en el cual la filtración forma un filtrado;
 la transferencia del filtrado a una bolsa de muestra; y
 el sellado de la bolsa de muestra.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el cual la adición de un diluyente a la muestra fecal humana para formar una muestra diluida incluye la adición de una mezcla de solución salina y el polietilenglicol a la muestra fecal humana.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el cual el filtrado de la muestra diluida incluye el filtrado de la muestra diluida con una bolsa de filtro.
4. El método de la reivindicación 3, en el cual el mezclado de la muestra diluida con un aparato de mezclado incluye la disposición de la bolsa de filtro en el interior del aparato de mezclado.
- 25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4, que comprende además el almacenamiento de la bolsa de muestra a una temperatura de -20 °C a -80 °C.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4, que comprende además el almacenamiento de la bolsa de muestra a una temperatura de -80 °C.
- 30 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 6, que comprende además el enfriamiento previo de la bolsa de muestra a una temperatura de 4 °C a -4 °C.
8. El método de la reivindicación 7, que comprende además la congelación de la muestra previamente enfriada y el almacenamiento de la muestra congelada a una temperatura de -20 °C a -80 °C.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, que comprende además la descongelación de la muestra congelada.
10. El método de la reivindicación 9, en el que la descongelación de la muestra congelada incluye la descongelación de la muestra congelada a una temperatura de 4 °C a -4 °C.
- 40 11. El método de la reivindicación 10, que comprende además el envasado de la muestra descongelada en una unidad de envasado aislado.
- 45 12. El método de la reivindicación 11, en el cual la bolsa de muestra contiene el compuesto para terapia de restauración de la microbiota, y que comprende además la administración del compuesto para terapia de restauración de la microbiota a un paciente.
- 50 13. Un método para fabricar, procesar y envasar un compuesto para terapia de restauración de la microbiota, comprendiendo el método:
 la recolección de una muestra fecal de un donante preseleccionado;
 la transferencia de la muestra fecal a una bolsa de filtro;
 la adición de un diluyente a la bolsa de filtro;
55 en el cual el diluyente incluye un polietilenglicol a una concentración de 30 – 90 g / l;
 el sellado de la bolsa de filtro;
 la transferencia de la bolsa de filtro sellada a un mezclador;
 la transferencia del filtrado desde la bolsa de filtro a una bolsa de muestra;
 en el cual la transferencia del filtrado desde la bolsa de filtro a una bolsa de muestra define el compuesto
60 para terapia de restauración de la microbiota dentro de la bolsa de muestra;
 el sellado de la bolsa de muestra;
 el enfriamiento de la bolsa de muestra;
 la transferencia de la bolsa de muestra enfriada a un dispositivo de almacenamiento a temperatura controlada;

en el cual la transferencia de la bolsa de muestra enfriada a un dispositivo de almacenamiento a temperatura controlada incluye la congelación del compuesto para terapia de restauración de la microbiota;

- 5 la descongelación del compuesto para terapia de restauración de la microbiota congelado;
el envasado de la bolsa de muestra en un sistema de envasado aislado; y
el envío de la bolsa de muestra embalada a una instalación de tratamiento.

- 10 **14.** El método de la reivindicación 13, en el cual la adición de un diluyente a la bolsa de filtro incluye la adición de una mezcla de solución salina y polietilenglicol a la bolsa de filtro.

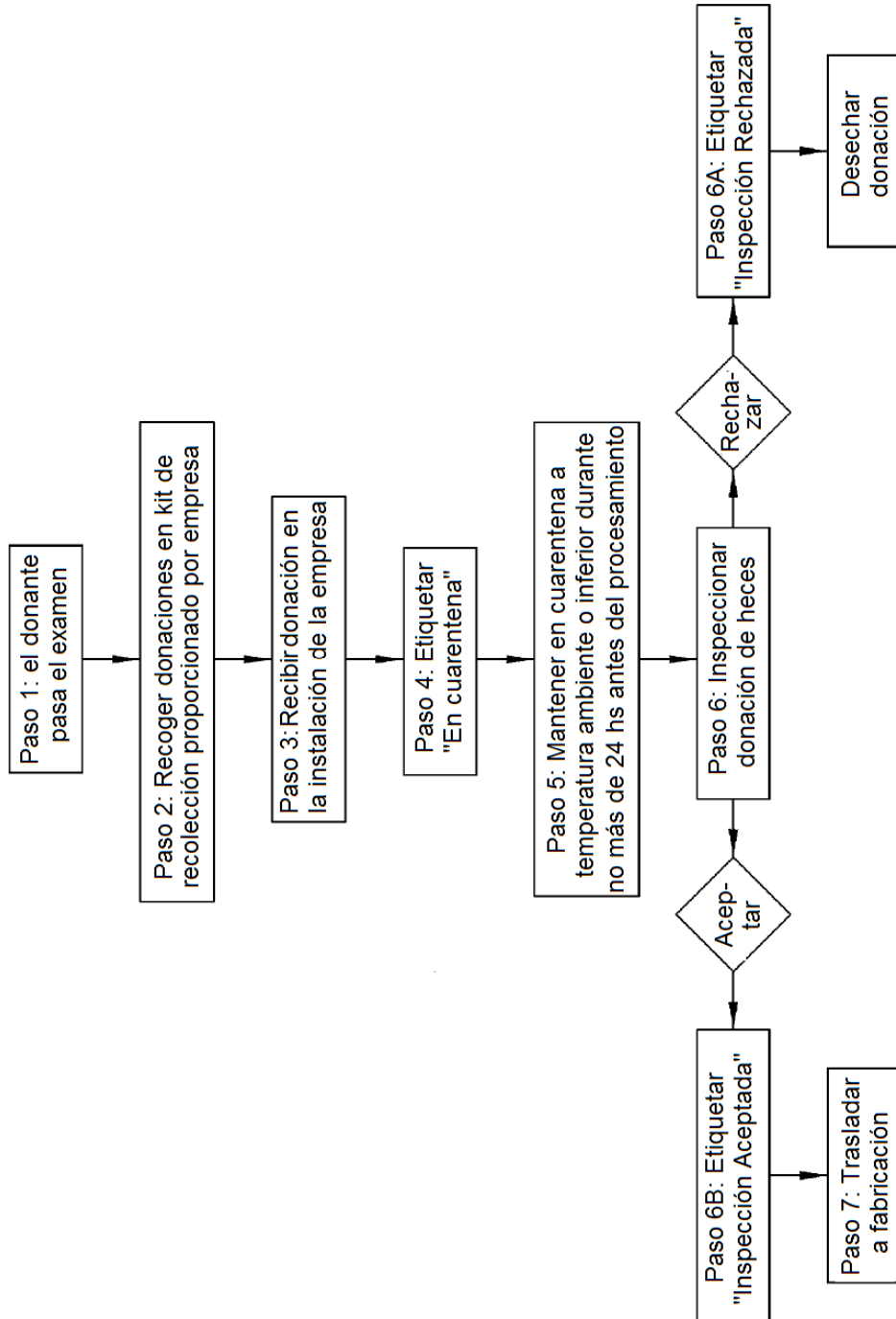


FIG. 1

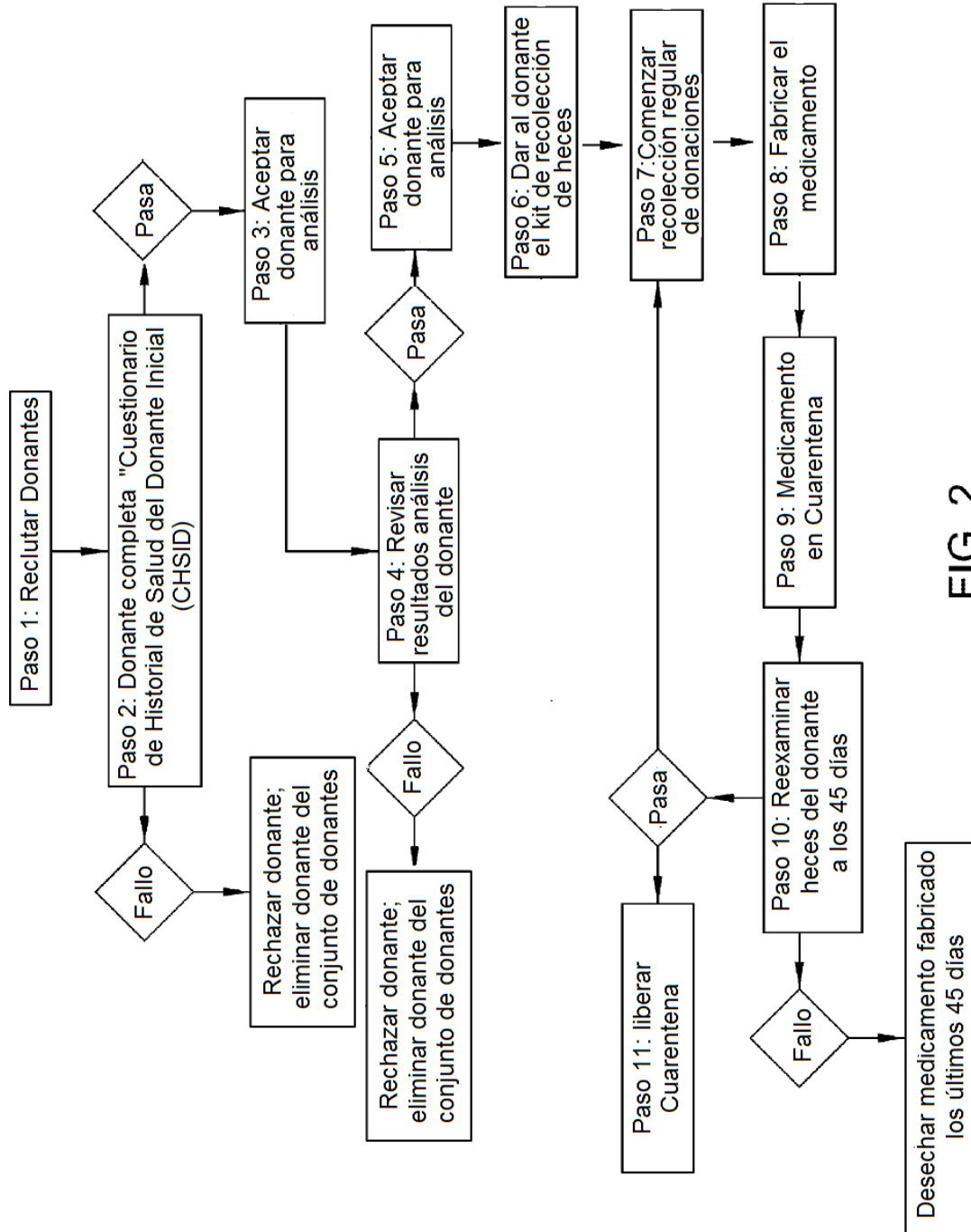


FIG. 2

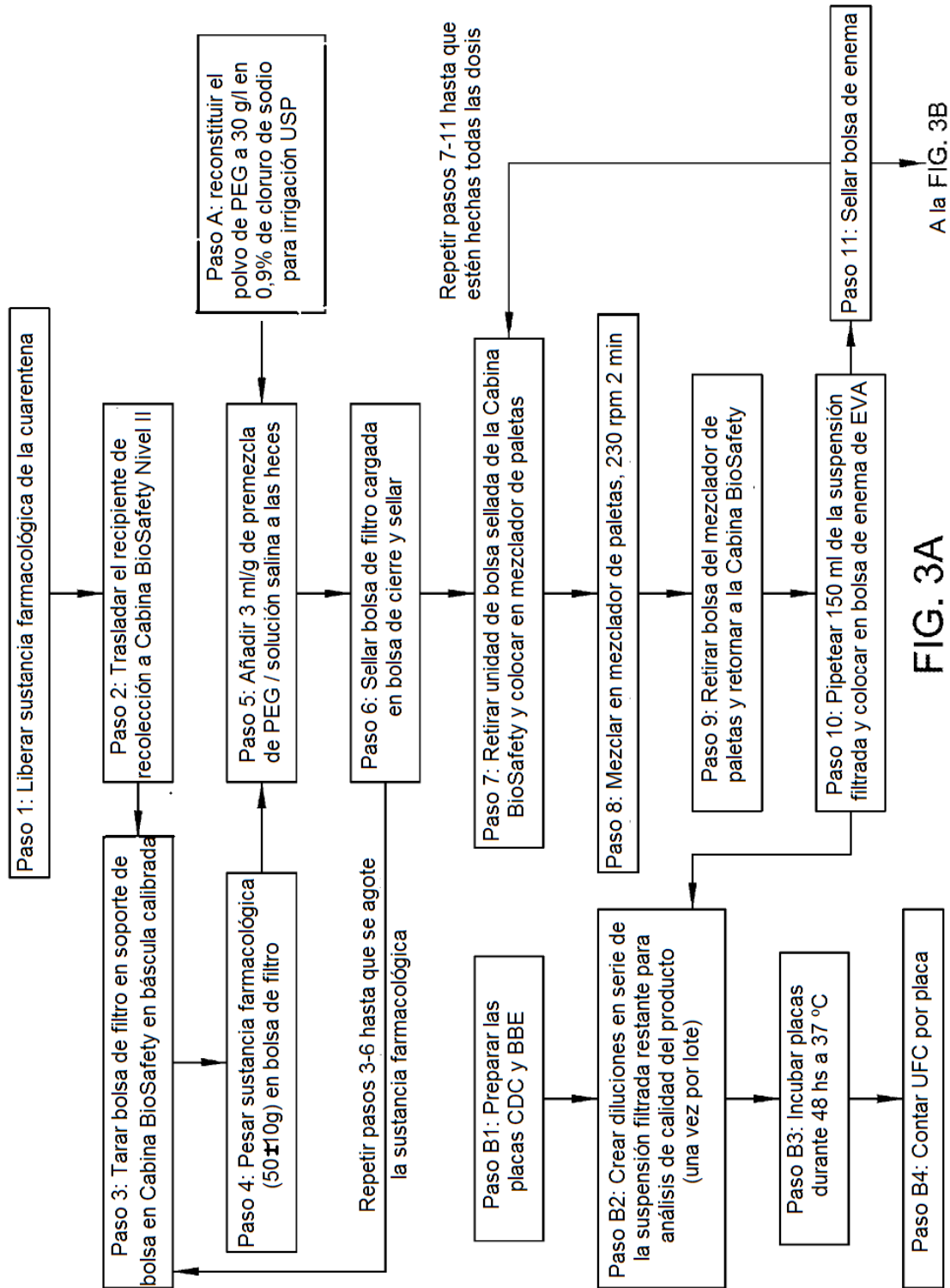
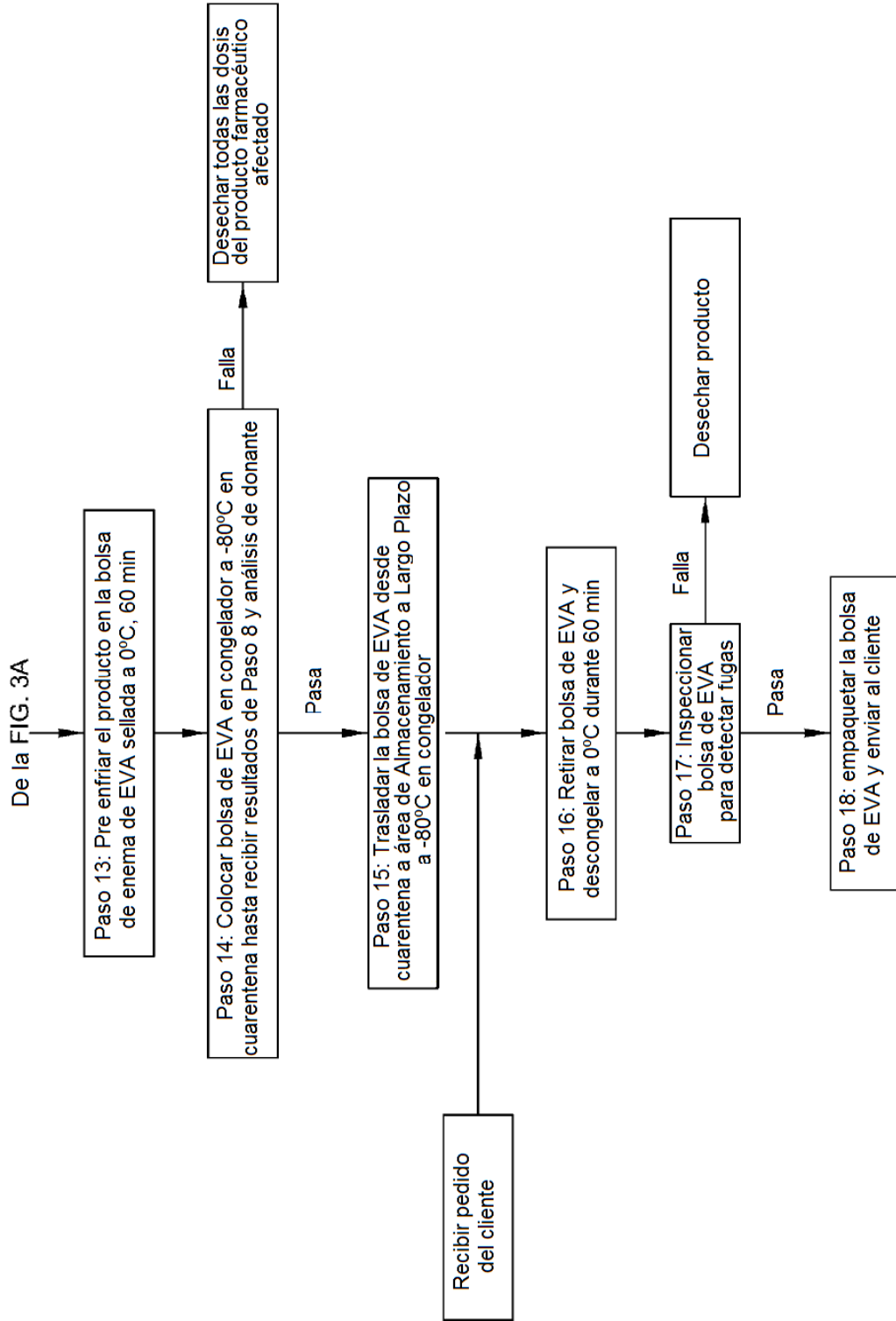


FIG. 3A



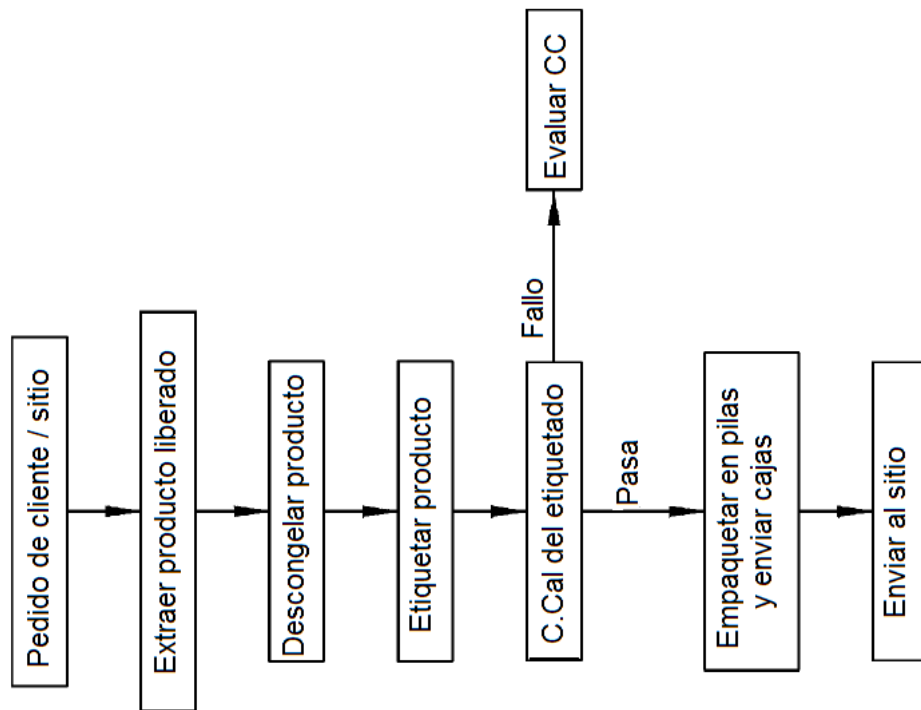


FIG. 4

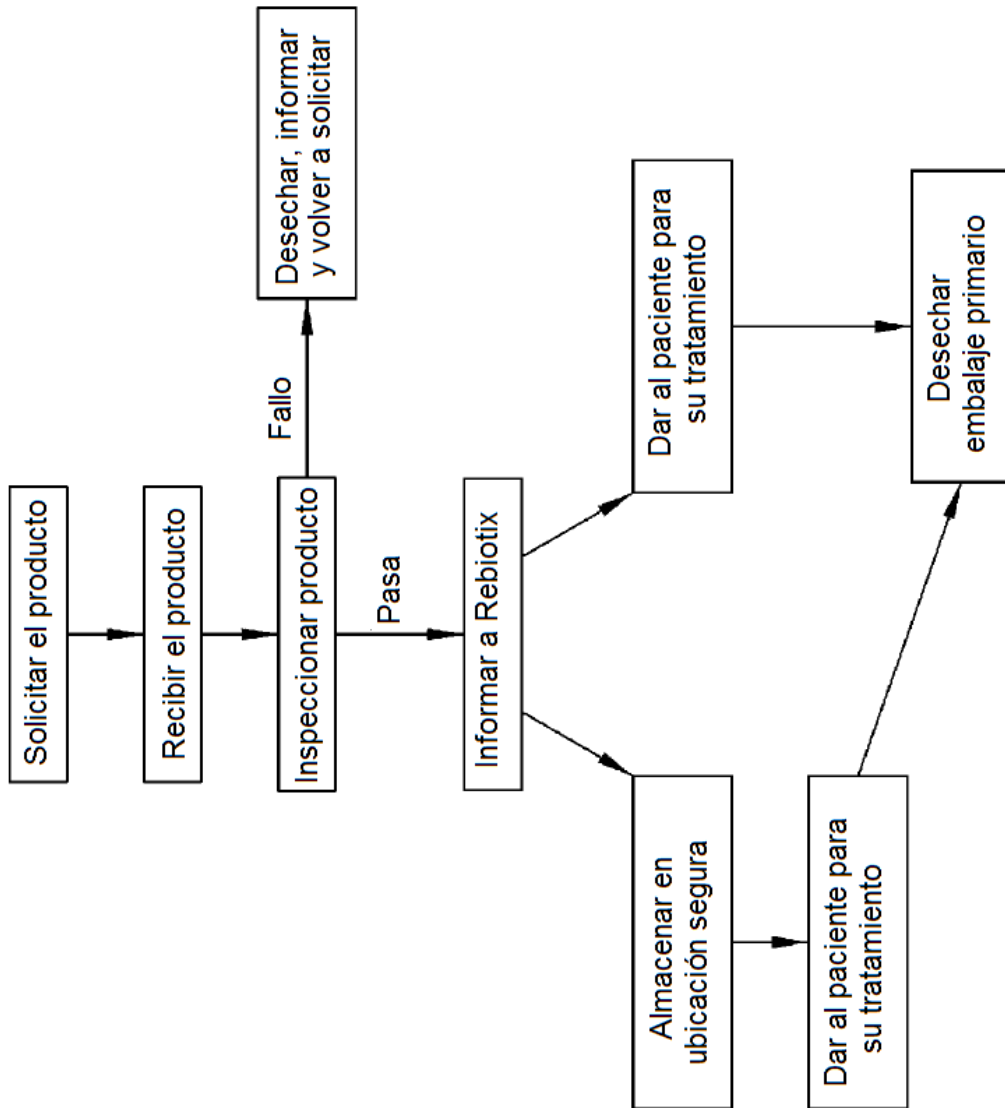


FIG. 5

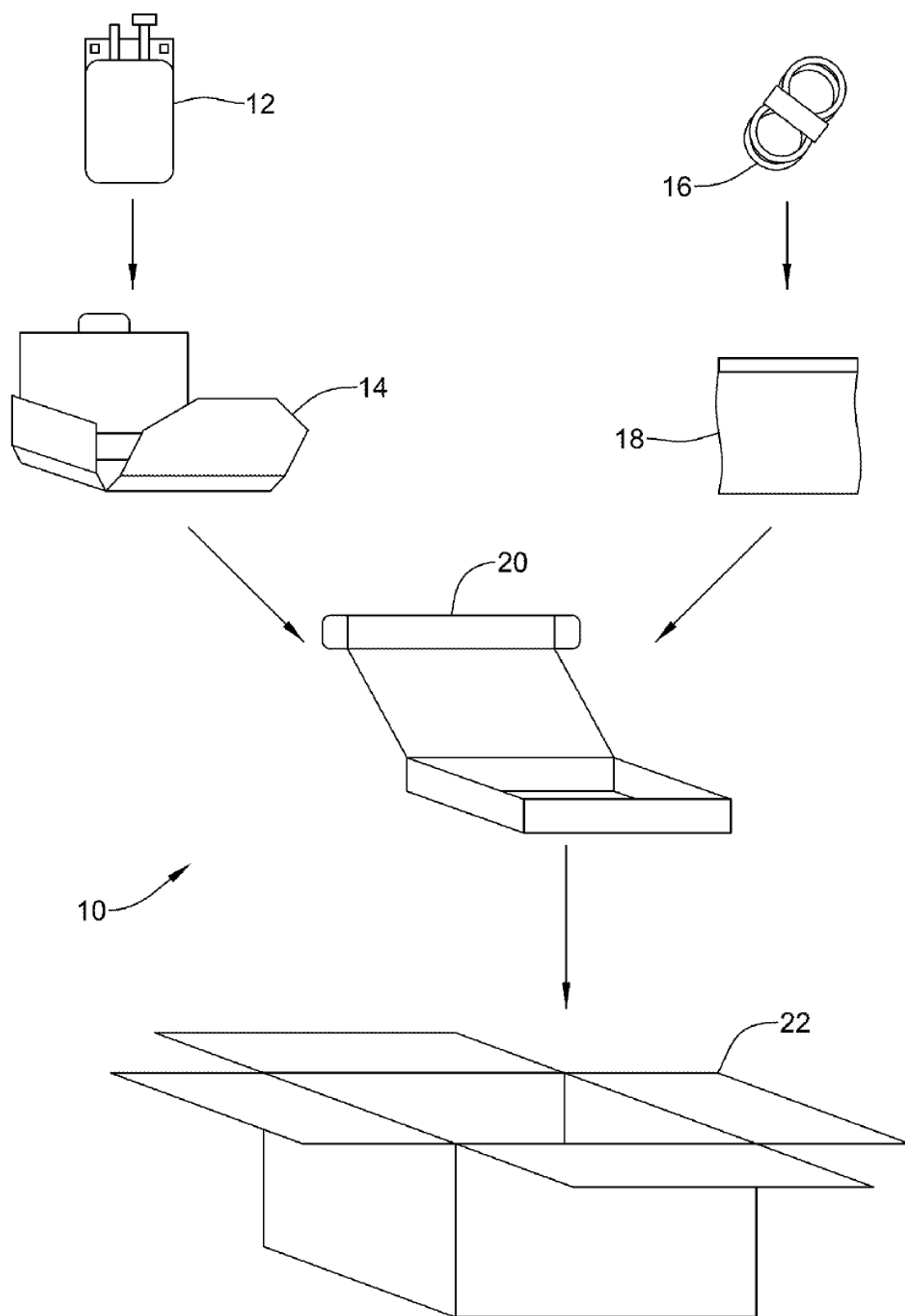


FIG. 6

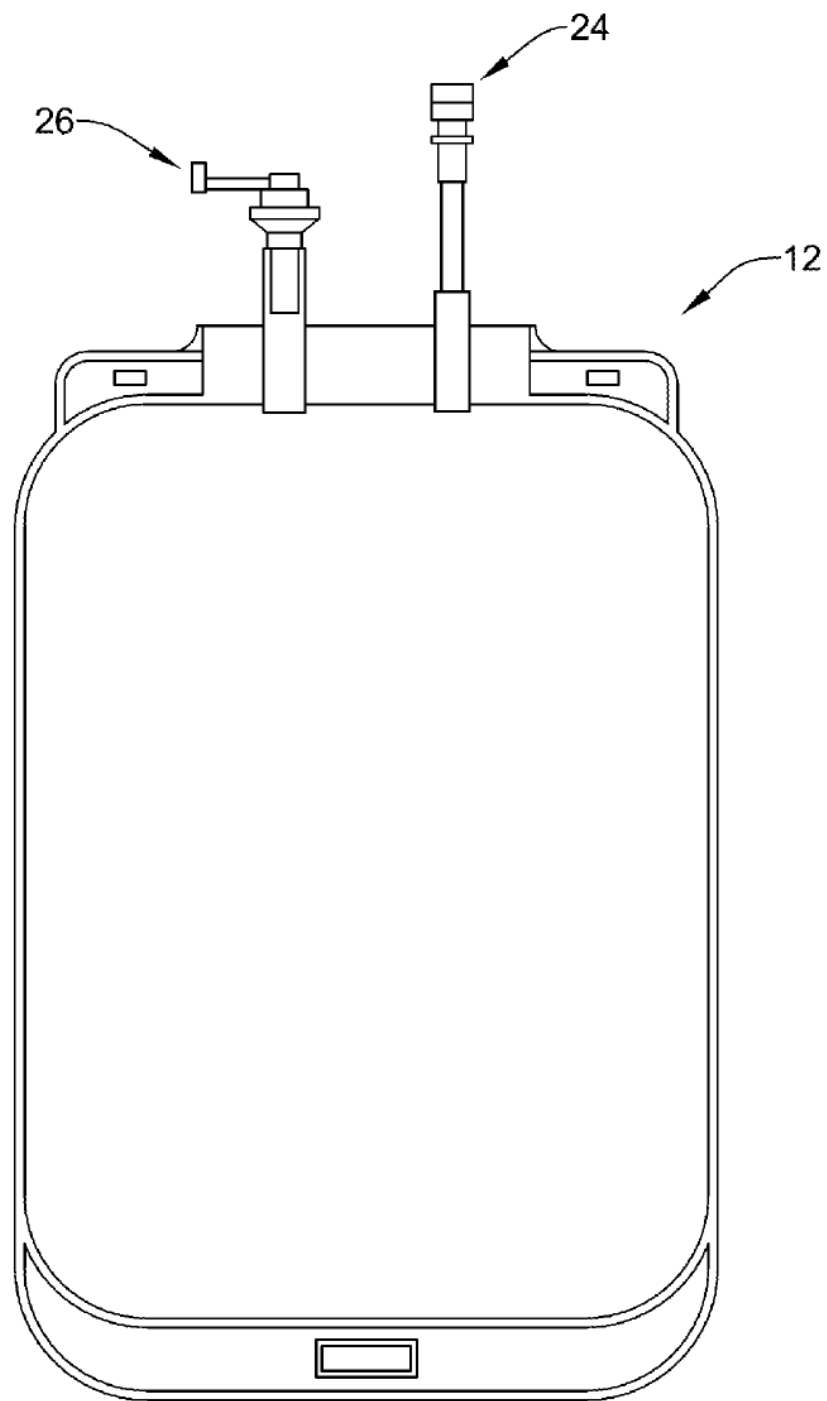


FIG. 7

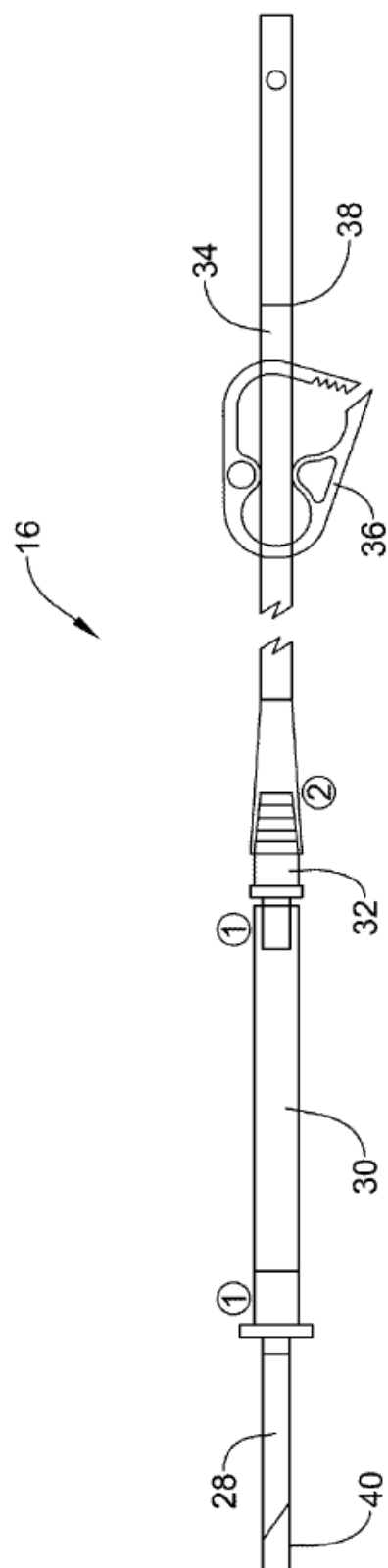


FIG. 8