

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 624**

51 Int. Cl.:

A61K 35/37	(2015.01)
C12N 1/04	(2006.01)
C12Q 1/02	(2006.01)
A61K 47/10	(2007.01)
A61K 35/74	(2015.01)
A61P 1/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2016 PCT/FR2016/053550**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017 WO17103550**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2016 E 16826115 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3389679**

54 Título: **Proceso de liofilización de una muestra de microbiota fecal**

30 Prioridad:

18.12.2015 FR 1562750

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

05.08.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**AFFAGARD, HERVÉ;
SCHWINTNER, CAROLE;
JUSTE, CATHERINE;
DORE, JOËL;
CHAPRON, AUDREY;
FONSECA, FERNANDA y
DAVID, OLIVIER**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 777 624 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

Proceso de liofilización de una muestra de microbiota fecal

5 La presente invención se refiere a un proceso de liofilización de una muestra de microbiota fecal. La invención también se refiere al uso del liofilizado obtenido en el trasplante de microbiota fecal, preferiblemente para el tratamiento de la disbiosis intestinal, en particular las infecciones por *Clostridium difficile*.

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

15 Estéril en el útero, el intestino es colonizado desde los primeros días de vida hasta que evoluciona en una microbiota individual única. Cada persona tiene bacterias relativamente similares en términos de especies, pero la composición exacta de su microbiota (especies, proporciones) es en gran medida (más de 2/3 de las especies) específica del huésped.

20 Así, la microbiota intestinal humana es un ecosistema muy diverso, complejo y específico de cada individuo.

Es esencial para la salud de un individuo mantener una microbiota estable que sea capaz de volver a su estado original después de un cambio y que sea resistente a la invasión. El mantenimiento de una gran diversidad de la microbiota promueve su estabilidad. Sin embargo, ciertas patologías o tratamientos desequilibran la microbiota: los antibióticos, por ejemplo, así como las enfermedades con un componente inflamatorio, como la enfermedad intestinal inflamatoria crónica (EIIc), pueden limitar la diversidad de la microbiota en el intestino.

25 Los tratamientos con antibióticos (o terapia con antibióticos), en particular, dan lugar a una alteración de la microbiota y a una pérdida de sus funciones de barrera, lo que puede promover la proliferación de organismos patógenos como el *Clostridium difficile*.

30 Las infecciones por *Clostridium difficile* son responsables de la diarrea nosocomial; esta bacteria puede ser resistente a la terapia antibiótica convencional (de amplio espectro, como la vancomicina o el metronidazol). Con el fin de restablecer la microbiota intestinal y luchar contra las infecciones de tipo *Clostridium difficile*, y restablecer así la homeostasis (es decir, la simbiosis), se está considerando y probando el trasplante de microbiota fecal. Consiste en introducir las heces de un sujeto donante sano en el tracto digestivo de un paciente receptor para reequilibrar la microbiota intestinal alterada del huésped. Este trasplante de microbiota fecal suele ser alogénico (es decir, de un individuo donante sano a un paciente). Los resultados obtenidos en las infecciones por *Clostridium difficile* son alentadores, y algunos pacientes han sido tratados con éxito (Tauxe et al., Lab Medicine, invierno de 2015, volumen 46, número 1 o van Nood E, Speelman P, Nieuwdorp M, Keller J. 2014. Fecal microbiota transplantation: facts and controversies. Curr Opin Gastroenterol 30(1):34-9).

35 Sin embargo, el procedimiento de trasplante actual es empírico y no toma precauciones particulares para preservar mejor la viabilidad de las bacterias anaeróbicas, que son los componentes mayoritarios de la microbiota intestinal. Además, la eficacia del trasplante de microbiota fecal es variable y puede requerir más de un tratamiento.

45 Por lo tanto, es necesario contar con muestras de microbiota fecal seguras, eficaces y fáciles de obtener, especialmente a escala industrial. Además, se necesitan muestras de microbiota fecal en las que se conserve la viabilidad de las bacterias y que tengan una larga vida útil.

50 La presente invención permite satisfacer estas necesidades.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un proceso para la preparación de un liofilizado de microbiota fecal de un sujeto donante, que comprende las siguientes etapas:

- 55
- A) mezclar una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante con un diluyente que es una solución salina acuosa que comprende i) al menos un crioprotector seleccionado entre polioles, di- a pentasacáridos, o sus mezclas, y ii) maltodextrinas, y
 - 60 B) congelar la mezcla obtenida en A) a una temperatura inferior a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferiblemente entre $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$, y a continuación someterla a liofilización.

En otro modo de realización que puede combinarse con el modo de realización anterior, el diluyente es una solución salina acuosa que contiene al menos galactosa-lactosa o trehalosa como crioprotector.

65 En otro modo de realización que puede combinarse con uno de los modos de realización anteriores, el diluyente es una solución salina acuosa que comprende al menos una mezcla de maltodextrinas como agente de carga,

preferiblemente en una cantidad entre el 4 y el 20 % en relación con el volumen total de la solución.

En otro modo de realización que puede combinarse con uno de los modos de realización anteriores, la cantidad total de crioprotector en la solución salina acuosa está comprendida entre el 3 y el 30 % en peso con respecto al volumen total de la solución, preferiblemente entre el 4 y el 20 % en peso con respecto al volumen total de la solución.

Preferiblemente, la muestra de microbiota fecal utilizada en la etapa A) se purifica de antemano.

Preferiblemente, la presente invención se refiere a un proceso para preparar un liofilizado de microbiota fecal de un sujeto donante, que comprende las siguientes etapas:

A1) Preparar opcionalmente un gradiente continuo de yodixanol o de 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida formado por congelación-descongelación,

A2) Mezclar al menos una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante con un tampón salino que comprende opcionalmente yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida, en condiciones anaeróbicas,

A3) opcionalmente, la deposición de la mezcla obtenida en A2) bajo el gradiente obtenido en A1),

A4) centrifugación secuencial a baja aceleración en condiciones anaeróbicas, o ultracentrifugación de la mezcla obtenida en A2) o A3),

A5) recuperación del anillo bacteriano o sobrenadante formado en la etapa A4), en condiciones anaeróbicas,

A6) mezcla del anillo bacteriano o sobrenadante recuperado en A5) con un diluyente que es una solución salina acuosa que comprende i) al menos un crioprotector seleccionado entre polioles, di- a pentasacáridos, o sus mezclas, y ii) maltodextrinas, y

B) Congelar la mezcla obtenida en A6) a una temperatura inferior a -50 °C, preferiblemente entre -70 °C y -100 °C, y a continuación someterla a liofilización.

En dicho proceso, la etapa A1), así como de hecho la etapa A3), son opcionales.

Ese proceso es, en efecto, fácil de aplicar, y su eficacia puede estimarse comparando la población microbiana obtenida tras el proceso, con la muestra inicial.

La presente invención también se refiere al uso de un liofilizado de microbiota fecal que se puede obtener mediante el proceso según la invención, como herramienta de investigación en genómica funcional, metaproteómica o inmunología.

Por ejemplo, el liofilizado que se puede obtener mediante el proceso según la invención puede utilizarse para generar sedimentos bacterianos que, al inmovilizarse en matrices de agarosa (u otros geles), permiten la extracción de fragmentos muy grandes de ADN utilizados para la clonación y estudios funcionales. También puede utilizarse para preparar extractos de proteínas citosólicas o proteínas de recubrimiento de comunidades bacterianas para análisis metaproteómicos. Por último, puede utilizarse para estudiar el reconocimiento de bacterias intactas por el sistema inmunológico del huésped.

La presente invención también se refiere al uso de un liofilizado de microbiota fecal de un sujeto donante que se puede obtener mediante el proceso según la invención, en el trasplante de microbiota fecal autóloga o alogénica.

La presente invención también se refiere al uso de un liofilizado de microbiota fecal de un sujeto donante que se puede obtener mediante el proceso según la invención, para el tratamiento de las disbiosis intestinales, debidas a infecciones y en particular a infecciones por *Clostridium difficile*, disbiosis inducidas por tratamientos farmacológicos, por tratamientos físicos (en particular la radiación), por intervenciones quirúrgicas (en particular intestinales), por colonoscopias o por suplementos nutricionales. La presente invención también se refiere al uso de un liofilizado de microbiota fecal de un sujeto donante que se puede obtener mediante el proceso según la invención, para el tratamiento de una patología seleccionada entre enfermedades inflamatorias intestinales crónicas (EIIc), trastornos funcionales intestinales, obesidad, enfermedades metabólicas (por ejemplo, diabetes de tipo 2, síndrome metabólico) y enfermedades autoinmunes (por ejemplo, diabetes de tipo 1), alergias, enfermedades hepáticas (por ejemplo, esteatosis, cirrosis), ciertas enfermedades neurológicas (por ejemplo, autismo) y ciertos cánceres (por ejemplo, cáncer colorrectal).

La disbiosis intestinal es cualquier desequilibrio sostenido en la microbiota intestinal. Por desequilibrio sostenido de la microbiota intestinal se entiende toda pérdida de microorganismos beneficiosos, y/o toda pérdida de diversidad de microorganismos, y/o toda expansión o desarrollo de microorganismos agresivos entre comensales (patobiotas), y/o

5 toda proliferación de microorganismos patógenos (por ejemplo, *C. difficile*). Cualquier alteración sostenida de la microbiota intestinal humana puede causar o acompañar crónicamente un estado patológico. En particular, la reducción de la diversidad dentro de la microbiota es característica de las enfermedades asociadas a la disbiosis (obesidad, enfermedad de Crohn, diabetes o alergia, en particular) (Sansone, Collège de France, 22 de enero de 2014).

Preferiblemente, la patología a tratar es la disbiosis intestinal.

10 La enfermedad inflamatoria intestinal crónica (EII) incluye la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa.

Los trastornos intestinales funcionales incluyen el síndrome del intestino irritable y la colitis espástica.

15 El proceso para preparar un liofilizado de microbiota fecal de un sujeto donante según la invención comprende, pues, las siguientes etapas:

A) mezclar una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante con un diluyente que es una solución salina acuosa que comprende i) al menos un crioprotector seleccionado entre polioles, di- a pentasacáridos, o sus mezclas, y ii) maltodextrinas, y

20 B) congelar la mezcla obtenida en A) a una temperatura inferior a -50 °C, preferiblemente entre -70 °C y -100 °C, y a continuación someterla a liofilización.

25 Preferiblemente, la muestra de microbiota fecal del sujeto donante es una muestra de heces de dicho donante. Esto se debe a que la muestra de heces contiene microbiota fecal del sujeto donante. Preferiblemente, según la invención, el sujeto donante es un sujeto humano sano. Un sujeto "sano" es aquel que no sufre un desequilibrio de la microbiota intestinal o una patología diagnosticada/reconocida por la profesión médica. Preferiblemente, la muestra de microbiota fecal del sujeto donante se purifica de antemano. Alternativamente, preferiblemente, dependiendo de la invención, el sujeto donante es un sujeto humano enfermo.

30 Preferiblemente, la muestra de heces debe tener una masa de al menos 20 g. La muestra de microbiota fecal siempre se obtiene y se mezcla anaeróbicamente (es decir, bajo una atmósfera desprovista de oxígeno). En condiciones anaeróbicas, se preserva la viabilidad de las bacterias constituyentes de la microbiota fecal presentes en la muestra.

35 Preferiblemente, antes de su uso, la muestra de microbiota fecal se filtra anaeróbicamente. La etapa preliminar de filtración puede incluir la filtración anaeróbica utilizando una bolsa de Seward provista de un filtro.

40 Preferiblemente, la muestra de microbiota fecal se recoge en condiciones anaeróbicas, utilizando un dispositivo de recogida hermético. Preferiblemente, este dispositivo es del tipo que comprende:

– un contenedor que comprende un cuerpo que tiene un espacio interior adaptado para recibir la muestra de microbiota fecal del sujeto donante, y un cuello que define una abertura de acceso al espacio interior del cuerpo, y

45 – una cubierta adaptada para ser montada de forma desmontable y hermética en el cuello del contenedor, de manera que se cierre la abertura de acceso del cuello y se cierre el espacio interior del cuerpo,

50 en el que el cuerpo del contenedor consiste en una bolsa flexible, y en el que al menos uno del contenedor y la cubierta está provisto de un miembro de evacuación adaptado para evacuar al menos parte de los gases contenidos en el espacio interior del cuerpo del contenedor.

Alternativamente, el dispositivo de recolección hermético está en una forma del tipo que comprende:

55 – un contenedor que comprende un cuerpo que tiene un espacio interior adaptado para recibir la muestra de microbiota fecal del sujeto donante, y un cuello que define una abertura de acceso al espacio interior del cuerpo, y

60 – una cubierta adaptada para ser montada de forma desmontable y hermética en el cuello del contenedor, de manera que se cierre la abertura de acceso del cuello y se cierre el espacio interior del cuerpo,

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

65 El diluyente puede seleccionarse entre los siguientes compuestos:

- crioprotectores como di- a pentasacáridos, es decir, disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos y pentasacáridos; o polioles, como glicerol, manitol, sorbitol, propilenglicol o etilenglicol,
- 5 – agentes de carga, como hidrolizados parciales de almidón, en particular de trigo o maíz, o de almidón, que comprenden una gran cantidad de maltodextrinas,
- y sus mezclas.

10 Preferiblemente, el diluyente es una solución salina acuosa que comprende al menos un crioprotector y/o un agente de carga. Así pues, habitualmente, la solución salina acuosa comprende agua y sales fisiológicamente aceptables. Habitualmente, las sales son sales de calcio, sodio, potasio o magnesio con iones de cloruro, gluconato, acetato o carbonato de hidrógeno.

15 La solución salina acuosa también puede incluir opcionalmente al menos un antioxidante. El antioxidante se selecciona en particular a partir del ácido ascórbico y sus sales (ascorbato), los tocoferoles (en particular el α -tocoferol), la cisteína y sus formas salificadas (en particular el clorhidrato) y sus mezclas.

Preferiblemente, la solución salina acuosa incluye:

- 20 – al menos una sal seleccionada entre cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, gluconato de sodio y acetato de sodio, y
- opcionalmente al menos un antioxidante, preferiblemente seleccionado entre l-ascorbato de sodio, tocoferoles, clorhidrato de l-cisteína monohidratado y sus mezclas.

25 Habitualmente, la sal está presente en la solución salina acuosa en una concentración de entre 5 y 20 g/l, preferiblemente entre 7 y 10 g/l.

30 Habitualmente, el antioxidante está presente en la solución salina acuosa en una cantidad de entre el 0,3 y el 1 % en peso con respecto al volumen total de la solución, preferiblemente en una cantidad de entre el 0,4 y el 0,6 % en peso con respecto al volumen total de la solución. Preferiblemente, cuando el antioxidante es una mezcla de l-ascorbato de sodio y clorhidrato de l-cisteína monohidratado, el l-ascorbato de sodio está presente en una cantidad de entre el 0,4 y el 0,6 % en peso con respecto al volumen total de la solución, y el clorhidrato de l-cisteína monohidratado está presente en una cantidad de entre el 0,01 y el 0,1 % en peso con respecto al volumen total de la solución.

35 La solución salina acuosa contiene al menos un crioprotector. Un crioprotector es una sustancia que se utiliza para proteger la muestra de daños por congelación, especialmente debido a la formación de cristales de hielo.

40 Preferiblemente, el crioprotector se selecciona a partir de polioles, di- a pentasacáridos (es decir, disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos y pentasacáridos), y sus mezclas. Preferiblemente, el crioprotector se selecciona entre polioles, tri- y disacáridos y sus mezclas. Preferiblemente, el crioprotector presente en la solución salina acuosa es un disacárido o un trisacárido.

45 Entre los polialcoholes que se pueden utilizar se encuentran el glicerol, el manitol, el sorbitol, pero también el propilenglicol o el etilenglicol.

Entre los di- a pentasacáridos que se pueden utilizar están los dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros de unidades idénticas o diferentes, dichas unidades se seleccionan a partir de la glucosa, la fructosa, la galactosa, la fucosa y el ácido N-acetilneuramínico.

50 Los disacáridos que se pueden utilizar incluyen la trehalosa o uno de sus análogos, o la sacarosa.

Estos crioprotectores se pueden utilizar solos o en una mezcla.

55 Normalmente, la cantidad total de crioprotector presente en la solución salina acuosa está comprendida entre el 3 y el 30 % en peso con respecto al volumen total de la solución, preferiblemente entre el 4 y el 20 % en peso con respecto al volumen total de la solución.

60 Preferiblemente, el crioprotector se selecciona a partir de glicerol, manitol, sorbitol, propilenglicol, etilenglicol, trehalosa y sus análogos, sacarosa, galactosa-lactosa y sus mezclas. Más preferiblemente, el crioprotector es la galactosa-lactosa o la trehalosa.

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

65 El agente de carga se selecciona preferiblemente a partir de hidrolizados parciales de almidón o de fécula. Los

hidrolizados parciales de almidón, por ejemplo de trigo o maíz, y los hidrolizados parciales de fécula, por ejemplo de patatas, incluyen una gran cantidad de maltodextrinas. Las maltodextrinas son el resultado de la hidrólisis parcial del almidón o la fécula y están compuestas por diferentes azúcares (glucosa, maltosa, maltotriosa, oligo- y polisacáridos), cuyas proporciones varían según el grado de hidrólisis.

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

10 La etapa A) se lleva a cabo preferiblemente mezclando la muestra de microbiota fecal con el diluyente en una relación de peso de microbiota, preferiblemente purificada, en (g)/volumen de diluyente (ml) de entre 1:1 y 1:10.

A continuación la mezcla obtenida en A) se congela a una temperatura inferior a -50 °C, preferiblemente entre -70 °C y -100 °C, y a continuación se somete a liofilización: esta es la etapa B). Se lleva a cabo preferiblemente en las
15 siguientes condiciones:

B1) Congelando la mezcla obtenida en A) a una temperatura inferior a -50 °C, preferiblemente entre -70 °C y -100 °C, preferiblemente a unos -80 °C,

20 B2) cargando la mezcla congelada obtenida en B1) en un liofilizador preenfriado a una temperatura entre -50 °C y -30 °C, a presión atmosférica, y a continuación

B3) al menos una etapa de desecación primaria de la mezcla cargada en B2) que comprende la reducción de la presión a un valor de entre 80 y 200 µbares (preferiblemente entre 100 y 150 µbar) y a continuación el aumento de la temperatura de los estantes a un valor de entre -20 °C y +25 °C (preferiblemente -10 °C) aplicando una velocidad de calentamiento de entre 0,2 y 0,5 °C/min. Los valores de presión y temperatura de los estantes se seleccionan de manera que la temperatura del producto se mantenga por debajo de la temperatura de colapso durante todo el proceso de sublimación. Los parámetros se mantienen constantes hasta que el hielo es completamente eliminado de la mezcla, y a continuación
25

B4) Desecación secundaria de la mezcla obtenida en B3) que comprende la disminución de la presión a un valor inferior o igual a 80 µbares, preferiblemente al valor mínimo posible para el equipo, y el aumento de la temperatura de los estantes a un valor de entre +25 °C y +35 °C, preferiblemente 25 °C a una velocidad de calentamiento de entre 0,1 y 0,3 °C/min, y su mantenimiento entre 8 y 15 horas.
30

La congelación en la etapa B1) se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura inferior a -50 °C, preferiblemente entre -70 °C y -100 °C. Preferiblemente la temperatura de congelación se encuentra entre -70 °C y -100 °C; más preferiblemente está aproximadamente de -80 °C o aproximadamente de -100 °C. A fin de congelarla, la mezcla obtenida en A) se puede tomar en alícuotas previamente para asegurar que los especímenes tengan un volumen constante.
35

La muestra congelada se carga entonces en un liofilizador preenfriado a una temperatura de entre -50 °C y -30 °C, a presión atmosférica; esta es la etapa B2).

45 A continuación, se lleva a cabo la desecación primaria de la mezcla cargada en B2); esta es la etapa B3). Comprende al menos una etapa de desecación primaria de la mezcla cargada a B2) que consiste en bajar la presión a un valor de entre 80 y 200 µbares (preferiblemente entre 100 y 150 µbar) y a continuación elevar la temperatura de los estantes a un valor de entre -20 °C y +25 °C (preferiblemente -10 °C) aplicando una velocidad de calentamiento de entre 0,2 y 0,5 °C/min. Los valores de presión y temperatura de almacenamiento se seleccionan de manera que la temperatura del producto se mantenga por debajo de la temperatura de colapso durante todo el proceso de sublimación. Los parámetros se mantienen constantes hasta que el hielo se elimina completamente de la mezcla.
50

Finalmente, se lleva a cabo la desecación secundaria de la mezcla obtenida en B3). Comprende la reducción de la presión a un valor inferior o igual a 80 µbares, preferiblemente el valor mínimo posible para el equipo, y el aumento de la temperatura de los estantes a un valor de entre +25 °C y +35 °C, preferiblemente 25 °C a una velocidad de calentamiento de entre 0,1 y 0,3 °C/min, y su mantenimiento entre 8 y 15 horas.
55

El resultado final es un liofilizado según la invención.

60 Preferiblemente, el proceso según la invención comprende, en la etapa A), las etapas preliminares del tratamiento de la muestra de microbiota fecal antes de mezclarla con el diluyente.

Así, preferiblemente la etapa A) incluye las siguientes sub-etapas:

65 A1) Preparar opcionalmente un gradiente continuo de yodixanol o de 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida formado por congelación-descongelación,

A2) Mezclar al menos una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante con un tampón salino que comprende opcionalmente yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida, en condiciones anaeróbicas,

5 A3) opcionalmente, la deposición de la mezcla obtenida en A2) bajo el gradiente obtenido en A1),
 A4) la centrifugación secuencial a baja aceleración en condiciones anaeróbicas, o ultracentrifugación de la mezcla obtenida en A2) o A3),

10 A5) la recuperación del anillo bacteriano o del sobrenadante formado en la etapa A4) en condiciones anaeróbicas, y

15 A6) la mezcla del anillo bacteriano o el sobrenadante recuperado en A5) con un diluyente que es una solución salina acuosa que comprende i) al menos un crioprotector seleccionado a partir de polioles, di- a pentasacáridos, o sus mezclas, y ii) maltodextrinas.

En dicho proceso, la etapa A1), así como de hecho la etapa A3), son opcionales.

20 Preferiblemente, el tampón salino utilizado en las diferentes sub-etapas descritas anteriormente es una solución acuosa de HEPES que comprende cloruro de sodio, preferiblemente en una concentración de entre 7 y 15 g/l. El HEPES está presente preferiblemente en una concentración de entre 8 y 50 mM, preferiblemente entre 9 y 42 mM.

Primera alternativa

25 Preferiblemente, según una primera alternativa, el procedimiento según la invención comprende las siguientes etapas:

30 A1) Preparar un gradiente continuo de yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida formado por congelación-descongelación,

35 A2) Mezclar al menos una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante con un tampón salino al que se le ha añadido una solución acuosa que contiene yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida, dicho tampón salino que es preferiblemente una solución acuosa de HEPES que contiene cloruro de sodio, en condiciones anaeróbicas,

A3) la deposición de la mezcla obtenida en A2) bajo el gradiente obtenido en A1),

40 A4) la ultracentrifugación de la mezcla obtenida en A3) durante un periodo de entre 40 y 50 minutos a una temperatura de entre 2 °C y 6 °C, a una aceleración de entre 13.000 y 16.000 x g,

A5) la recuperación del anillo bacteriano formado en la etapa A4), en condiciones anaeróbicas,

45 A6) la mezcla del anillo bacteriano recuperado en A5) con un diluyente que es una solución salina acuosa que comprende i) al menos un crioprotector seleccionado entre polioles, di- a pentasacáridos, o sus mezclas, y ii) maltodextrinas, y

50 B) la congelación de la mezcla obtenida en A6) a una temperatura inferior a -50 °C, preferiblemente entre -70 °C y -100 °C, y a continuación someterla a liofilización.

Así pues, la etapa A1) comprende la preparación de un gradiente continuo de yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis(2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida formado por congelación-descongelación.

55 Gradiente continuo de yodixanol significa un gradiente continuo de yodixanol con una densidad que oscila entre 1,03 y 1,24, preferiblemente de 1,06 a 1,24.

60 Gradiente continuo de 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida significa un gradiente continuo de 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida con una densidad que oscila entre 1,03 y 1,22.

Preferiblemente, esta etapa A1) se lleva a cabo según las siguientes etapas:

65 A1.a) Congelar una solución de yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida a una temperatura comprendida entre -70 °C y -100 °C durante al menos 12 horas. Preferiblemente, dicha solución se desgasifica. Una solución de yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-

2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida desgasificada significa una solución de yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida en la que se reduce la concentración de aire disuelto, por ejemplo al vacío. Esto crea una microanaerobiosis favorable a la supervivencia de la bacteria durante el proceso de purificación; y a continuación

5 A1.b) Descongelar la solución obtenida en A1.a) a temperatura ambiente durante 2 a 4 horas para obtener un gradiente continuo de yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida.

10 Preferiblemente la solución de yodixanol utilizada en la etapa A1) es una solución con una concentración de entre el 15 y el 25 %, preferiblemente de aproximadamente del 20 %, en peso de yodixanol por volumen de solución (p/v). Más preferiblemente, la solución de yodixanol utilizada se obtiene diluyendo 3 veces una solución acuosa comercial de yodixanol al 60 %, comercializada bajo el nombre de OptiPrep (solución acuosa estéril al 60 % en p/v de yodixanol), en un tampón salino, preferiblemente un tampón que contiene HEPES 15 mM y 9 g/l de NaCl con un pH de 7,0.

15 Preferiblemente la solución de 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida es una solución que contiene un 20 % en peso de 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida por volumen de solución (p/v). Más preferiblemente, la 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida utilizada es comercializada por Progen Biotechnik bajo el nombre de Nycodenz.

20 Preferiblemente, en la etapa A1.a), la congelación de la solución de yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida puede llevarse a cabo durante varios días o incluso un mes.

25 Después del gradiente continuo de yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida obtenido en la etapa A1), se llevan a cabo las siguientes etapas A2), A4) y A5) en condiciones anaeróbicas.

30 La etapa A2) consiste en mezclar al menos una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante con un tampón salino al que se le añade anaeróticamente una solución acuosa que contiene yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida. Preferiblemente dicho tampón salino es una solución acuosa de HEPES que contiene cloruro de sodio. Preferiblemente, el HEPES está presente en una concentración de entre 30 y 50 mM en el tampón salino. Preferiblemente, el cloruro de sodio está presente en una concentración de entre 7 y 15 g/l en el tampón salino. Preferiblemente, la solución acuosa de yodixanol está en una concentración de entre el 50 % y el 70 %, preferiblemente aproximadamente al 60 % (p/v). Preferiblemente, la proporción de tampón salino a la solución acuosa de yodixanol es de aproximadamente 1:3.

35 Preferiblemente la solución acuosa de 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida se encuentra a una concentración del 60 % (p/v). Preferiblemente, la proporción de tampón salino a solución acuosa de 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida es de aproximadamente 1:3.

40 Así, según la etapa A2), el tampón salino se mezcla previamente con una solución acuosa de yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida; se obtiene así un tampón salino compuesto de yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis(2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida. A continuación la mezcla resultante se mezcla con la muestra de microbiota fecal.

45 Preferiblemente, la mezcla de la muestra de microbiota fecal con un tampón salino que contiene yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida se lleva a cabo en una proporción de 3 a 4 gramos de muestra por 22 a 30 ml de tampón salino que contiene yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida.

50 Preferiblemente, cuando la muestra de microbiota fecal se filtra entre las etapas A2) y A3), se somete a una etapa de filtrado de la mezcla obtenida en A2) en condiciones anaeróbicas, en particular utilizando una bolsa de Seward provista de un filtro.

55 A continuación la mezcla obtenida en A2), opcionalmente filtrada, se deposita bajo el gradiente obtenido en A1): esta es la etapa A3). La etapa A3) puede realizarse de forma aeróbica o anaeróbica.

60 Preferiblemente, la mezcla obtenida en A2) está presente en una jeringa provista de una aguja, y el gradiente de yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida está presente en un contenedor con forma de tubo. En este caso, la mezcla obtenida en A2) se deposita sumergiendo la aguja de la jeringa en el fondo del tubo que contiene el gradiente de yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida, y vaciando el contenido de la jeringa.

5 A continuación la preparación obtenida en A3) se centrifuga bajo vacío en una ultracentrífuga a baja aceleración: esta es la etapa A4). Esta ultracentrifugación se lleva a cabo durante un periodo de entre 40 y 50 minutos, a una temperatura de entre 2 °C y 6 °C, a una velocidad de entre 13.000 y 16.000 x g. Preferiblemente, la ultracentrifugación se lleva a cabo durante un periodo de entre 40 y 50 minutos, a una temperatura de aproximadamente 4 °C, a una velocidad de aproximadamente 14500-14600 x g.

Al final de esta etapa, se forma un anillo bacteriano dentro del gradiente. Este anillo se recupera anaeróbicamente en la etapa A5). Contiene la microbiota de interés.

10 Segunda alternativa

Preferiblemente, según una segunda alternativa, el proceso de preparación comprende las siguientes etapas:

15 A2) La mezcla de al menos una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante con un tampón salino en condiciones anaeróbicas,

A4) la centrifugación secuencial a baja aceleración de la mezcla obtenida en A2) en condiciones anaeróbicas,

20 A5) la recuperación del sobrenadante formado en la etapa A4), en condiciones anaeróbicas,

A6) la mezcla del sobrenadante recuperado en A5) con un diluyente que es una solución salina acuosa que comprende i) al menos un crioprotector seleccionado entre polioles, di- a pentasacáridos, o sus mezclas, y ii) maltodextrinas, y

25 B) Congelar la mezcla obtenida en A6) a una temperatura inferior a -50 °C, preferiblemente entre -70 °C y -100 °C, y a continuación someterla a liofilización.

30 Esta segunda alternativa incluye una etapa de centrifugación secuencial a baja aceleración. Una baja aceleración significa una aceleración de entre 200 y 500 x g. Así, las diversas partículas presentes en la muestra de microbiota fecal (restos y células bacterianas) se sedimentarán.

35 La etapa A2) consiste en mezclar al menos una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante con un tampón salino en condiciones anaeróbicas. Preferiblemente dicho tampón salino es una solución acuosa de HEPES que contiene cloruro de sodio. Preferiblemente, el HEPES está presente a una concentración de entre 5 y 15 mM. Preferiblemente, el cloruro de sodio está presente a una concentración de entre 7 y 15 g/l.

Preferiblemente, la mezcla de la muestra de microbiota fecal con un tampón salino se lleva a cabo en una proporción en peso de muestra a tampón de 1:20 a 1:25.

40 Preferiblemente, cuando la muestra de microbiota fecal se filtra entre las etapas A2) y A4), se somete a una etapa de filtrado de la mezcla obtenida en A2) en condiciones anaeróbicas, en particular utilizando una bolsa de Seward provista de un filtro.

45 A continuación la mezcla obtenida en A2), opcionalmente filtrada, se somete a centrifugación secuencial a baja aceleración, en condiciones anaeróbicas: esta es la etapa A4).

50 La centrifugación secuencial a baja aceleración de la etapa A4) se lleva a cabo preferiblemente a una aceleración de entre 200 y 500 x g durante un periodo de tiempo de entre 5 y 15 minutos a una temperatura de entre 20 y 30 °C. Más preferiblemente, la centrifugación secuencial a baja aceleración se lleva a cabo a una aceleración de aproximadamente 300 x g durante un periodo de tiempo de entre 5 y 15 minutos, a una temperatura entre 20 y 25 °C.

Al final de esta etapa, el sobrenadante se recupera anaeróbicamente (etapa A5)). Contiene la microbiota de interés.

55 Preferiblemente, la centrifugación secuencial a baja aceleración de la etapa d) y la subsiguiente etapa de recuperación del sobrenadante e) se llevan a cabo varias veces, preferiblemente al menos dos veces, cada etapa d) se lleva a cabo a una aceleración de entre 200 y 500 x g durante un periodo de tiempo de entre 5 y 15 minutos y a una temperatura de entre 20 y 30 °C.

60 Así, preferiblemente en la etapa A5):

A5.1) el sobrenadante formado en la etapa A4) se recupera,

65 A5.2) el sedimento obtenido en A4) se mezcla con un tampón salino (el mismo de la etapa A2)) y a continuación se somete a una centrifugación secuencial a baja aceleración como se describe en la etapa A4)), y el sobrenadante resultante se mezcla con el sobrenadante de la fracción A5.1). Este lavado del sedimento puede

repetirse a voluntad hasta que el sedimento se haya agotado de bacterias. En la práctica y para ahorrar tiempo y volúmenes de extracción, se suele practicar un solo lavado del sedimento.

5 Cualquiera que sea el procedimiento según la invención (primera o segunda alternativa), ésta puede incluir las siguientes etapas, en condiciones anaeróbicas, como etapa A6):

10 a) la centrifugación del anillo bacteriano resuspendido en un tampón salino o del sobrenadante obtenido en A5), a una aceleración de entre 3000 y 4000 x g durante un periodo de tiempo de entre 5 y 15 minutos, a una temperatura de entre 20 y 30 °C,

15 b) la recuperación del sedimento obtenido al final de la etapa a), y su resuspensión en un tampón salino, seguida de centrifugación a una aceleración de entre 200 y 500 x g durante un periodo de tiempo de entre 5 y 15 minutos, a una temperatura de entre 20 y 30 °C,

20 c) la recuperación del sobrenadante obtenido al final de la etapa b), y su resuspensión en un tampón salino, seguida de centrifugación a una aceleración de entre 3000 y 4000 x g durante un periodo de tiempo de entre 5 y 15 minutos, a una temperatura de entre 20 y 30 °C,

25 d) la recuperación del sedimento obtenido en la etapa c), y

e) la mezcla del sedimento recuperado en d) con un diluyente que es una solución salina acuosa que comprende i) al menos un crioprotector seleccionado a partir de polioles, di- a pentasacáridos, o sus mezclas, y ii) maltodextrinas.

Estas etapas a) a e) pueden ser, por lo tanto, subetapas de la etapa A6). Las etapas a) a d) están diseñadas para lavar la microbiota obtenida en A5). Preferiblemente, la temperatura de las etapas a) a d) se encuentra entre 20 y 25 °C.

Preferiblemente, en estas etapas a) a d), el tampón salino es una solución acuosa de HEPES que contiene cloruro de sodio, preferiblemente a una concentración de entre 7 y 15 g/l. Preferiblemente, el HEPES está presente a una concentración de entre 8 y 15 mM.

El sedimento obtenido en la etapa d) contiene la microbiota de interés. A continuación se puede mezclar con el diluyente como se describe en la etapa e).

Al final de la etapa A5) o d) (cualquiera de los procesos según la primera o segunda alternativa), la fracción recuperada se mezcla con un diluyente que es una solución salina acuosa que comprende i) al menos un crioprotector seleccionado entre polioles, di- a pentasacáridos, o sus mezclas, y ii) maltodextrinas.

A continuación, se lleva a cabo la etapa B) de congelación y liofilización, como se describió anteriormente.

La presente invención también se refiere al uso de un liofilizado que se puede obtener mediante el proceso según la invención, como herramienta de investigación, en particular como se ha descrito anteriormente, en genómica funcional, metaproteómica o inmunología.

La presente invención también se refiere a un liofilizado de microbiota fecal de un sujeto donante que se puede obtener mediante el proceso según la invención, para su uso en el trasplante de microbiota fecal autóloga o alogénica. En efecto, el liofilizado de microbiota fecal purificada según el proceso de la invención se puede administrar al paciente receptor.

El paciente receptor puede ser diferente del sujeto donante, y el trasplante entonces es alogénico.

El paciente receptor también puede ser idéntico al sujeto donante, y el trasplante entonces es autólogo; este tipo de trasplante puede tener lugar cuando el sujeto, entonces sano, da una muestra antes de la alteración de su microbiota. El liofilizado se conserva y se trasplanta al mismo sujeto (paciente receptor) si tiene una infección por *Clostridium difficile*. El trasplante de microbiota fecal autóloga tiene la ventaja de evitar la transmisión de patógenos de otro donante.

La presente invención también se refiere a un liofilizado de microbiota fecal de un sujeto donante que se puede obtener mediante el proceso según la invención, para su uso en el tratamiento de infecciones por *Clostridium difficile*. La presente invención también se refiere a un liofilizado de microbiota fecal de un sujeto donante que se puede obtener mediante el proceso según la invención, para su uso a fin de acompañar el tratamiento o para tratar una patología seleccionada entre enfermedades inflamatorias crónicas del intestino (EIIc), trastornos funcionales intestinales, obesidad, enfermedades metabólicas y autoinmunes, alergias, enfermedades neurológicas y cánceres. La presente invención también se refiere a un liofilizado que se puede obtener mediante el proceso según la invención, para su uso en la limitación de los efectos secundarios de un tratamiento seleccionado entre las terapias con antibióticos, quimioterapias, radioterapias y cirugías, en particular del tracto digestivo.

El liofilizado que se puede obtener mediante el proceso según la invención exhibe una buena viabilidad de bacterias presentes, como se muestra en el Ejemplo 4.

- 5 Habitualmente, la viabilidad de las bacterias en la microbiota fecal se mide usando el marcador LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit comercializado por ThermoFisher Scientific. Este kit permite distinguir entre bacterias vivas y muertas en base a la integridad de sus membranas, utilizando dos fluoróforos, SYTO9® y yoduro de propidio (PI). El primero penetra en todas las células, integrales o no, se une al ADN y emite a 540 nm (verde) después de la excitación a 470 nm (láser azul). El PI también se dirige al ADN, pero sólo penetra en las células con
 10 membranas dañadas; emite a 635 nm (rojo) después de la excitación a 470 nm. Este equipo puede combinarse con la citometría de flujo o la microscopía de epifluorescencia.

Preferiblemente, el marcaje de las bacterias con la mezcla de los dos fluoróforos SYTO9®/PI se lleva a cabo en condiciones anaeróbicas.

- 15 La invención se ejemplificará ahora con los siguientes ejemplos, que no son exhaustivos.

Descripción de las figuras:

- 20 La Figura 1 es un diagrama que ilustra las correlaciones de Pearson entre los liofilizados y las heces en bruto.

Ejemplo 1: Purificación de una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante por gradiente continuo de yodixanol (OptiPrep) según la invención

25 **Principio:**

Separación de la fracción bacteriana total por flotación dentro de un gradiente continuo de OptiPrep autoformado por congelación-descongelación. La dilución fecal ponderada en OptiPrep se deposita bajo un gradiente continuo de OptiPrep, preformado por congelación-descongelación. Durante la centrifugación, las bacterias suben por el
 30 gradiente hasta su densidad de flotación (1,110-1,190), mientras que los desechos alimentarios y endógenos se hunden en el fondo del gradiente. Todo el proceso está en un estado de anaerobiosis.

Materiales y métodos:

35 **Tampones Hepes-NaCl**

	NaCl	Hepes	QSP MilliQ
Para el diluyente para las suspensiones fecales Hepes 40 mM/NaCl 9 g/l El diluyente de la suspensión fecal consiste en los siguientes componentes finamente divididos por 100 ml: - 25 ml Hepes 40 mM/NaCl 9 g/l y - 75 ml OptiPrep-60 (solución comercial al 60 % de yodixanol en agua)	0,9 g	953,2 mg	QSP < 100 ml a continuación ajustar el pH a 7,0 y a continuación QSP 100 ml
Para los gradientes Hepes 15 mM/NaCl 9 g/l El diluyente por gradientes ("OptiPrep-20") es en última instancia una dilución triple de OptiPrep-60 en Hepes 15 mM/NaCl 9 g/l	0,9 g	357,5	QSP < 100 ml a continuación ajustar el pH a 7,0 y a continuación QSP 100 ml
Para los lavados de la fase bacteriana Hepes 10 mM/NaCl 9 g/l	18,0 g	4,766 g	QSP < 2 l y a continuación ajustar el pH a 7,0 y a continuación QSP 2 l

Preparación de gradientes continuos por congelación-descongelación (etapa A1):

- 40 – Pipetear 16 ml de solución desgasificada OptiPrep-20 y transfírela a un tubo, evitando la aireación de la solución
- Congelar los tubos durante la noche a -80 °C
- 45 – Descongelar los tubos inmóviles y sin perturbar a temperatura ambiente 2-3 horas antes de su uso; se forma automáticamente un gradiente continuo de densidad 1,03-1,22.

Preparación de diluciones fecales en una cámara anaeróbica (etapa A2):

ES 2 777 624 T3

- Devolver la muestra de heces a la cámara anaeróbica
- 5 – Pesar en la balanza el peso deseado de las heces (máximo 3,5 g para 1 gradiente, opcionalmente menos; en este caso completar hasta 3,5 g con tampón Hepes 10 mM/NaCl 9 g/l), en la que se coloca una bolsa estéril de doble filtro Seward.
- Añadir 24 ml de diluyente de suspensión fecal al filtro de la bolsa de Seward.
- 10 – Homogeneizar la mezcla
- Transferir la suspensión fecal filtrada y homogeneizada a un tubo Falcon de 50 ml.
- A partir de este tubo, llenar una jeringa de 20 ml equipada con una aguja con la dilución fecal
- 15 **Realización del gradiente fuera de la cámara anaeróbica (etapas A3) y A4):**
- Sumergir la aguja de la jeringa obtenida en A2) en el fondo del gradiente de congelación-descongelación preformado obtenido en A1)
- 20 – Cargar suavemente los 20 ml de dilución fecal bajo el gradiente preformado
- Repetir para otros gradientes
- 25 – Pesar todos los tubos y ajustar los tubos 2 a 2 con tampón Hepes 10 mM/NaCl 9 g/l exactamente al mismo peso
- Insertar cuidadosamente los tubos en los bloques de centrifugación fríos para el rotor oscilante.
- Centrifugar 45 min a 4 °C y 14.567 x g
- 30 **Recuperación y lavado de las células bacterianas en una cámara anaeróbica (etapas A5), A6) y a) a d):**
- Introducir los bloques de centrifugación en la cámara anaeróbica sin abrirlos
- 35 – Abrir un bloque
- Usar una pipeta para eliminar la fase superior
- Pipetear la fase de células intermedias en tubos Falcon de 2 x 50 ml
- 40 – Añadir tampón de lavado (Hepes 10 mM/NaCl 9 g/l) hasta la graduación 50 de los 2 tubos Falcon
- Tomar las fases bacterianas de todos los gradientes de la misma manera.
- 45 – Centrifugar 10 min a 4000 x g y 22 °C en un rotor oscilante
- Eliminar el sobrenadante por aspiración
- Añadir el tampón de lavado a la graduación de ~25 ml de los tubos Falcon
- 50 – Resuspender suavemente las bacterias con la pipeta; completar hasta 50 ml
- Centrifugar 5 min a 300 x g y 22 °C en un rotor oscilante para eliminar los residuos
- 55 – Pipetear el sobrenadante (que contiene bacterias sin residuos) en 2 nuevos tubos Falcon de 50 ml; desechar los sedimentos de residuos
- Centrifugar 10 min a 3500 x g y 22 °C en un rotor oscilante
- 60 – Eliminar los sobrenadantes

El sedimento bacteriano resultante, libre de residuos, se puede resuspender en el vehículo seleccionado.

Ejemplo 2: Purificación de una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante mediante centrifugación

secuencial a baja aceleración según la invención

Principio:

5 Separación de la fracción bacteriana total por centrifugación secuencial a baja aceleración.

Materiales y métodos:

Tampón Hepes-NaCl

	NaCl	Hepes	QSP MilliQ
para las suspensiones fecales y los lavados de la fase bacteriana			QSP < 2 l
Hepes 10 mM/NaCl 9G/l	18,0 g	4,766 g	a continuación ajustar el pH a 7,0 y a continuación QSP 2 l

10

Preparación de diluciones fecales en una cámara anaeróbica:

- Devolver la muestra de heces a la cámara anaeróbica
- 15 – Transferir el peso de las heces deseadas al filtro de la bolsa de Seward.
- Completar QSP 350 g con Hepes 10 mM/NaCl 9 g/l para 14 g de heces (es decir, una dilución de 1:25) y homogeneizar (etapa b)).
- 20 – Transferir 50 ml de suspensión fecal filtrada y homogeneizada a 6 tubos Falcon de 50 ml
- Centrifugar 10 min a 300 x g y 22 °C en un rotor oscilante para eliminar los desechos (etapa d))
- Dispensar los sobrenadantes (que contienen bacterias) en 12 nuevos tubos de 50 ml (~25 ml/tubo)
- 25 – Resuspender los 6 sedimentos en 50 ml de Hepes 10 mM/NaCl 9 g/l y centrifugar 10 min a 300 x g y 22 °C en un rotor oscilante (etapa d))
- Dispensar los 6 nuevos sobrenadantes en los 12 tubos de reserva que ya contienen los primeros sobrenadantes; QSP 50 ml para los 12 tubos con Hepes 10 mM/NaCl 9 g/l
- 30 – Centrifugar los 12 tubos 10 min a 3500 x g y 22 °C en un rotor oscilante para cultivar las bacterias
- Retirar suavemente el sobrenadante con una pipeta
- 35 Finalmente, los sedimentos bacterianos libres de residuos resultantes son resuspendidos en el vehículo seleccionado.

Ejemplo 3: Obtención de los liofilizados de microbiota fecal obtenidos en los Ejemplos 1 y 2

40

Las fracciones obtenidas al final de los procesos de los Ejemplos 1 y 2 se mezclaron con los siguientes diluyentes:

- NaCl: 9 g/l
- 45 – Maltodextrinas: trehalosa 15/5 o 5/15 en NaCl 9 g/l
- Yodixanol: solución acuosa comercial al 60 % diluida 3 veces en tampón HEPES 40 mM/NaCl 9 g/l.

A continuación se congelaron a -80 °C o -100 °C.

50

A continuación se sometieron al siguiente ciclo de liofilización:

Etapas	Temperatura de los estantes	Rampa en min	Presión en µbar	Tiempo de espera en min
Pre-enfriamiento	-40 °C	60	Atm.	Hasta la carga
Desecación al aire	-10 °C	360	150	1080
Desecación al aire	+25 °C	120	150	720

La desecación secundaria se lleva a cabo a +25 °C, a una presión de 80 µbares durante unos 900 minutos.

55 El liofilizador fue preenfriado a -40 °C antes de cargarlo. Al recibir las muestras, los viales almacenados en el hielo

seco se cargaron en el aparato y el liofilizador se sometió a vacío tan pronto como se completó la carga. Se colocaron dos sensores de temperatura PT100 en dos viales. Como los productos se congelan antes de cargarlos, las sondas están sobre el producto y no en el producto.

- 5 El tiempo del ciclo es de 45 horas. Al final del ciclo, los viales se sellan al vacío en el liofilizador y se tapan después de la descarga.

Ejemplo 4: Viabilidad de las bacterias en los liofilizados de microbiota fecal obtenidos en el Ejemplo 3

10 **Protocolo:**

La viabilidad de las bacterias presentes en los liofilizados de microbiota fecal obtenidos en el Ejemplo 3 se midió según el siguiente protocolo:

- 15 – diluciones decimales sucesivas en una atmósfera anaeróbica hasta un nivel final de unas 10⁶ bacterias/ml en la muestra destinada al marcaje; esta operación debe realizarse inmediatamente después de la resuspensión de los sedimentos bacterianos sin residuos en el vehículo elegido; el marcaje de la última dilución también debe ser inmediato,
- 20 – contar menos de 30 minutos entre la resuspensión y el marcaje, porque las poblaciones vivas proliferan rápidamente si el vehículo contiene un sustrato nutritivo: en 4 horas de espera a temperatura ambiente, en condiciones anaeróbicas y en presencia de un solo sustrato nutritivo, la población crece medio log y el porcentaje de bacterias vivas aumenta en un 10 %,
- marcaje bacteriano, usando el Kit de Viabilidad Bacteriana LIVE/DEAD® BacLight™ según las instrucciones del fabricante,
- 25 – cuantificación de bacterias vivas y muertas en citometría de flujo: el tiempo entre el marcaje y la cuantificación no supera los 20 minutos, con las muestras marcadas en reposo (siempre protegidas de la luz) a temperatura ambiente o sobre hielo picado.

Resultados:

30

Los resultados se muestran en la tabla siguiente:

Muestra	Viabilidad 1 semana después de la liofilización	Desviación típica	Viabilidad 1 mes después de la liofilización	Desviación típica	Viabilidad 3 meses después de la liofilización	Desviación típica
Liofilizado con NaCl	8,50 %	2,50 %	5,70 %	3,00 %	12,10 %	3,10 %
Liofilizado con maltodextrinas	44,80 %	8,00 %	48,10 %	5,80 %	50,20 %	2,20 %
Liofilizado con trehalosa	31,10 %	6,80 %	37,60 %	6,90 %	40,30 %	9,80 %
Liofilizado con yodixanol	45,30 %	6,60 %	32,50 %	15,40 %	22,20 %	9,70 %

Así, los resultados muestran que la viabilidad de las bacterias presentes en las muestras purificadas según la invención es muy buena cuando las bacterias son liofilizadas con maltodextrinas.

35

Ejemplo 5: Obtención y viabilidad de bacterias en liofilizados de microbiota fecal no purificados

Se recogió una microbiota y se suspendió en las siguientes soluciones:

- 40 – NaCl: 9 g/l
- Maltodextrinas: trehalosa 15/5 o 5/15 en NaCl 9 g/l

A continuación las suspensiones se congelaron a -80 °C o -100 °C.

45

A continuación se sometieron al siguiente ciclo de liofilización:

Etapas	Temperatura de los estantes	Rampa en min	Presión en µbar	Tiempo de espera en min
Pre-enfriamiento	-40 °C	60	Atm.	Hasta la carga
Desecación al aire	-10 °C	360	150	1080
Desecación al aire	+25 °C	60	150	480

(continuación)

Etapas	Temperatura de los estantes	Rampa en min	Presión en μ bar	Tiempo de espera en min
Desecación al aire	+25 °C	1	80	960

El liofilizador fue preenfriado a -45 °C antes de cargarlo. Al recibir las muestras, los productos almacenados en el hielo seco se cargaron en el aparato y el liofilizador se sometió a vacío tan pronto como se completó la carga.

5 El tiempo del ciclo es de 48 horas. Al final del ciclo, los viales se sellan al vacío en el liofilizador y se tapan después de la descarga.

10 La calidad de las poblaciones bacterianas se evaluó en términos de diversidad mediante la extracción de ADN y su análisis mediante la secuenciación del gen ADNr 16S. A continuación se realizó un análisis filogenético para establecer perfiles de las diferentes muestras para su comparación. Los resultados se presentan en la Figura 1.

15 Así, los resultados muestran que los niveles de correlación entre los perfiles taxonómicos son muy altos para las 3 formulaciones, lo que demuestra que el proceso conserva eficazmente aproximadamente el 90 % de las poblaciones bacterianas.

La viabilidad se evaluó de la misma manera que en el ejemplo 4 y los resultados después de 10 meses de almacenamiento se presentan a continuación:

	Sujeto A	Sujeto B
Liofilizado con trehalosa	24,90 %	31,20 %
Liofilizado con NaCl	11,30 %	20,20 %
Liofilizado con maltodextrinas	33,80 %	30,70 %

20 Después de 10 meses, las suspensiones preparadas con NaCl muestran viabilidades significativamente menores que las otras dos.

25 Así pues, las microbiotas obtenidas mediante el proceso permiten mantener las poblaciones bacterianas, ya que las correlaciones de los perfiles filogenéticos son muy elevadas, pero también mantienen la bacteria viva durante más tiempo que la formulación de NaCl.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para preparar un liofilizado de microbiota fecal de un sujeto donante, que comprende las siguientes etapas:
- 5 A) mezclar una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante con un diluyente que es una solución salina acuosa que comprende i) al menos un crioprotector seleccionado entre polioles, di- a pentasacáridos, o sus mezclas, y ii) maltodextrinas, y
- 10 B) congelar la mezcla obtenida en A) a una temperatura inferior a -50 °C, preferiblemente entre -70 °C y -100 °C, y a continuación someterla a liofilización.
2. Proceso para la preparación de un liofilizado según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el diluyente es una solución salina acuosa que contiene al menos galactosa-lactosa o trehalosa como crioprotector.
- 15 3. Proceso para la preparación de un liofilizado según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** el diluyente es una solución salina acuosa que comprende al menos una mezcla de maltodextrinas, preferiblemente en una cantidad de entre el 4 y el 20 % en relación con el volumen total de la solución.
- 20 4. Proceso para la preparación de un liofilizado según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** la cantidad total de crioprotector en la solución salina acuosa se encuentra entre el 3 y el 30 % en peso con respecto al volumen total de la solución, preferiblemente entre el 4 y el 20 % en peso con respecto al volumen total de la solución.
- 25 5. Proceso según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** la etapa A) comprende las siguientes etapas:
- A1) Preparar opcionalmente un gradiente continuo de yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida formado por congelación-descongelación,
- 30 A2) Mezclar al menos una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante con un tampón salino que comprende eventualmente yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida, en condiciones anaeróbicas,
- A3) opcionalmente, la deposición de la mezcla obtenida en A2) bajo el gradiente obtenido en A1),
- A4) la centrifugación secuencial a baja aceleración en condiciones anaeróbicas, o la ultracentrifugación de la mezcla obtenida en A2) o A3),
- 35 A5) la recuperación del anillo bacteriano o del sobrenadante formado en la etapa A4) en condiciones anaeróbicas,
- A6) la mezcla del anillo bacteriano o del sobrenadante recuperado en A5) con el diluyente.
- 40 6. Proceso según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** comprende, como etapa A6), las siguientes etapas en anaerobiosis:
- a) la centrifugación del anillo bacteriano resuspendido en un tampón salino o del sobrenadante obtenido en A5), a una aceleración de entre 3000 y 4000 x g durante un periodo de tiempo de entre 5 y 15 minutos, a una temperatura de entre 20 y 30 °C,
- 45 b) la recuperación del sedimento obtenido en la etapa a) y su resuspensión en un tampón salino, seguida de centrifugación a una aceleración de entre 200 y 500 x g durante un periodo de tiempo de entre 5 y 15 minutos, a una temperatura entre 20 y 30 °C,
- c) la recuperación del sobrenadante obtenido al final de la etapa b), y su resuspensión en un tampón salino, seguida de centrifugación a una aceleración de entre 3000 y 4000 x g durante un periodo de tiempo de entre 5 y
- 50 15 minutos, a una temperatura de entre 20 y 30 °C,
- d) la recuperación del sedimento obtenido al final de la etapa c), y
- e) la mezcla del sedimento recuperado en d) con el diluyente.
7. Proceso según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la liofilización de la etapa B) se lleva a cabo según las siguientes condiciones:
- 55 B1) Congelando la mezcla obtenida en A) a una temperatura inferior a -50 °C, preferiblemente entre -70 °C y -100 °C,
- B2) cargando la mezcla congelada obtenida en B1) en un liofilizador preenfriado a una temperatura de entre -50 °C y -30 °C, a presión atmosférica, y a continuación
- 60 B3) al menos una etapa de desecación primaria de la mezcla cargada en B2) que comprende la reducción de la presión a un valor de entre 80 y 200 µbares y a continuación el aumento de la temperatura de los estantes a un valor entre -20 °C y +25 °C, aplicando una velocidad de calentamiento de entre 0,2 y 0,5 °C/min, y a continuación
- B4) la desecación secundaria de la mezcla obtenida en B3) que comprende la reducción de la presión a un valor inferior o igual a 80 µbares, y el aumento de la temperatura de los estantes a un valor entre +25 °C y +35 °C, a una velocidad de calentamiento de entre 0,1 y 0,3 °C/min, y su mantenimiento entre 8 y 15 horas.
- 65

8. Proceso según una de las reivindicaciones 5 a 7, **caracterizado por que** el tampón salino es una solución acuosa de HEPES que contiene cloruro de sodio, preferiblemente a una concentración de entre 7 y 15 g/l.

5 9. Proceso según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** comprende las siguientes etapas:

A1) la preparación de un gradiente continuo de yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida formado por congelación-descongelación,

10 A2) la mezcla de al menos una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante con un tampón salino al que se le ha añadido una solución acuosa que contiene yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida, siendo dicho tampón salino preferiblemente una solución acuosa de HEPES que contiene cloruro de sodio, en condiciones anaeróbicas,

A3) la deposición de la mezcla obtenida en A2) bajo el gradiente obtenido en A1),

15 A4) la ultracentrifugación de la mezcla obtenida en A3) durante un periodo de entre 40 y 50 minutos a una temperatura de entre 2 °C y 6 °C a una velocidad de entre 13.000 y 16.000 x g,

A5) la recuperación del anillo bacteriano formado en la etapa A4), en condiciones anaeróbicas,

A6) la mezcla del anillo bacteriano recuperado en A5) con el diluyente, y

20 B) la congelación de la mezcla obtenida en A6) a una temperatura inferior a -50 °C, preferiblemente de entre -70 °C y -100 °C, y a continuación someterla a liofilización.

10. Proceso según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado por que** la preparación de un gradiente continuo de yodixanol formado por la etapa de congelación-descongelación A1) se lleva a cabo de acuerdo con las siguientes etapas:

25 A1.a) congelar una solución de yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida a una temperatura comprendida entre -70 °C y -100 °C durante al menos 12 horas; y a continuación

30 A1.b) descongelar la solución obtenida en A1.a) a temperatura ambiente durante 2 a 4 horas para obtener un gradiente continuo de yodixanol o 5-(N-2,3-dihidroxiopropilacetamido)-2,4,6-tri-yodo-N,N'-bis (2,3-dihidroxiopropil) isoftalamida.

11. Proceso según una de las reivindicaciones 1 a 8 o 10, **caracterizado por que** comprende las siguientes etapas en anaerobiosis:

35 A2) la mezcla de al menos una muestra de microbiota fecal de un sujeto donante con un tampón salino,

A4) la centrifugación secuencial a baja aceleración de la mezcla obtenida en A2),

A5) la recuperación del sobrenadante formado al final de la etapa A4),

A6) la mezcla del sobrenadante recuperado en A5) con el diluyente, y

40 B) la congelación de la mezcla obtenida en A6) a una temperatura inferior a -50 °C, preferiblemente de entre -70 °C y -100 °C, y a continuación someterla a liofilización.

12. Proceso según la reivindicación 11, **caracterizado por que** la centrifugación secuencial a baja aceleración de la etapa A4) se lleva a cabo a una aceleración de entre 200 y 500 x g durante un periodo de tiempo de entre 5 y 15 minutos, a una temperatura de entre 20 y 30 °C.

45 13. Un liofilizado de microbiota fecal de un sujeto donante que se puede obtener mediante el proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en el trasplante de microbiota fecal autóloga o alogénica, o para el tratamiento de la disbiosis intestinal.

50 14. Utilización *in vitro* de un liofilizado que se puede obtener mediante el proceso según una de las reivindicaciones 1 a 12 como instrumento de investigación, preferiblemente en genómica funcional, metaproteómica o inmunología.

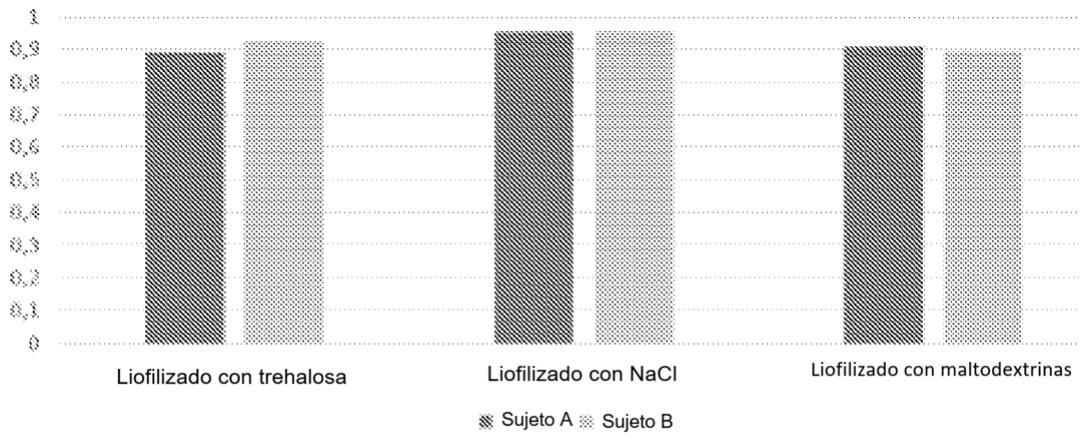


FIGURA 1