

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 411**

51 Int. Cl.:
A61K 35/74 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07855628 .9**
96 Fecha de presentación: **21.12.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2124976**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.12.2009**

54 Título: **INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO Y ELIMINACIÓN DEL STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE A LA METICILINA POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.**

30 Prioridad:
22.12.2006 US 876460 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.02.2012

73 Titular/es:
**BIO-K PLUS INTERNATIONAL INC.
495 BOULEVARD ARMAND-FRAPPIER
LAVAL, QUÉBEC H7V 4B3, CA**

72 Inventor/es:
**SMORAGIEWICZ, Wanda;
KARSKA-WYSOCKI, Barbara;
BAZO, Mari;
RUIZ, Marcia, T. y
LUQUET, François-Marie**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 373 411 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

Inhibición del crecimiento y eliminación del *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina por bacterias ácido lácticas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se relaciona con la inhibición del crecimiento del *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina por bacterias ácido lácticas.

Antecedentes de la invención

- 10 Las bacterias ácido lácticas (LAB) son bacterias Gram-positivas que producen ácido láctico, mediante la fermentación de la glucosa. Las bacterias ácido lácticas han sido ampliamente utilizadas en productos alimenticios fermentados en todo el mundo durante muchos siglos y se ha demostrado que muestran diferentes funciones biológicas benéficas. Algunas bacterias ácido lácticas también se conocen como probióticos. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el término "probióticos" describe los microorganismos vivos que confieren un beneficio de salud a un huésped. Las especies más frecuentemente utilizadas son *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. y *Saccharomyces* spp. Un número de mecanismos de acción han sido propuestos para explicar la eficacia de los probióticos. Estos mecanismos incluyen la producción de sustancias antimicrobianas, competencia para la colonización gastro-intestinal así como para nutrientes disponibles, producción de bacteriocinas antimicrobianas, inmunomodulación y promoción de digestión de la lactosa (Lu et al., 2001; D'Souza et al., 2002; Alvarez-Olmos et al., 2001).

- 20 Los antibióticos han disminuido sustancialmente la morbilidad y mortalidad a partir de infecciones bacterianas en el siglo 20. Sin embargo, los microorganismos están mostrando más y más resistencia a los antibióticos existentes. Este fenómeno de resistencia a los antibióticos es una grave amenaza para la salud pública. Los probióticos pueden actuar como agentes bioterapéuticos y ayudar a resolver los problemas de salud pública relacionados con la resistencia a los multifármacos. El *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) es una cepa específica de bacterias que muestra resistencia a muchos antibióticos incluyendo la meticilina. Las infecciones con MRSA por lo general se adquieren en la atención sanitaria (infecciones nosocomiales) y entornos comunitarios. Aunque las cepas de *Staphylococcus aureus* usualmente utilizan tres proteínas de enlace de la penicilina (PBP) en la síntesis de su pared celular, aquellas que son resistentes a la meticilina (MRSA) posee una PBP complementaria, PBP2a, codificada por el gen *mecA* que permite a las células crecer en la presencia de meticilina, oxacilina y otros antibióticos beta-lactámicos (Martins et al., 2007).

- 30 Se estima que más del 90% de las infecciones por *Staphylococcus aureus* son resistentes a la meticilina y otros antibióticos (Mathur and Singh, 2005). La falta de eficacia de varios antibióticos y la mayor prevalencia de MRSA se ha convertido un importante problema de salud pública y la resistencia del *Staphylococci* a la meticilina es un problema de proporciones mundiales. Existe una clara necesidad de nuevos agentes antibacterianos para controlar la resistente a la meticilina del *Staphylococcus aureus*. Tales agentes proporcionarían significativo valor terapéutico para la prevención, reducción y/o tratamiento de infecciones de MRSA. La presente invención tiene por objeto satisfacer estas y otras necesidades.

La presente descripción se refiere a un número de documentos, cuyo contenido se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

Resumen de la invención

- 40 En un aspecto de esta, la presente invención se relaciona con el uso de al menos una cepa de bacterias ácido lácticas para inhibir (reducir, disminuir, descender, aliviar, eliminar) el crecimiento de un *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y/o para tratar una infección con *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.

- 45 En un segundo aspecto de esta, la presente invención se relaciona con un método para inhibir el crecimiento de un *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y/o tratar una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. El método puede comprender la administración de una cantidad efectiva de al menos una cepa de bacterias ácido lácticas a un sujeto con necesidad de esta.

- 50 En un tercer aspecto de esta, la presente invención se relaciona con un kit para inhibir el crecimiento de un *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y/o tratar una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. El kit puede comprender al menos un contenedor que contiene al menos una cepa de bacterias ácido lácticas.

En un cuarto aspecto de esta, la presente invención se relaciona con una composición para utilizar en la inhibición del crecimiento de un *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. La composición puede comprender una cantidad efectiva de al menos una cepa de bacterias ácido lácticas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un quinto aspecto de esta, la presente invención se relaciona con el uso de una composición que comprende una cantidad efectiva de al menos una cepa de bacterias ácido lácticas y un vehículo farmacéuticamente aceptable para inhibir el crecimiento de un *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y/o para tratar una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.

5 Breve descripción de los dibujos

En los dibujos que ilustran las modalidades ejemplares no-limitativas de la presente invención,

FIG. 1 muestra la detección de los genes *coa* (117bp) y *mecA* (214bp) en todos los aislados clínicos evaluados y la cepa control *S. aureus*, C+ representan un control positivo de PCR, C- representa un control negativo de PCR, M representa un marcador de peso molecular y S representa el Estándar ATCC de la cepa de MRSA, ATCC 43300;

10 FIG. 2 muestra la actividad antibacteriana del *Lactobacillus casei* en aislado clínico de MRSA #43 (panel A) o Estándar ATCC de MRSA 43300 (panel B);

FIG. 3 muestra la actividad antibacteriana del *Lactobacillus casei* (panel A) y *Lactobacillus acidophilus* (panel B) en el aislado clínico de MRSA #43.

Descripción detallada de la invención

15 Con el fin de proporcionar una comprensión clara y consistente de los términos utilizados en la presente divulgación, un número de definiciones se proporcionan a continuación. Por otra parte, a menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en este documento tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por un experto en el oficio al que pertenece esta investigación.

20 Como se utiliza en la especificación y la(s) reivindicación(s), las palabras "que comprende" (y cualquier forma de que comprende, tal como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de que tiene, tal como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de incluyendo, tal como "incluyen" y "incluye") o "que contiene" (y cualquier forma de que contiene, tal como "contienen" y "contiene"), se incluyen o son abiertas y no excluyen otros, elementos no referidos.

25 En un aspecto de esta, la presente invención se relaciona con el uso de al menos una cepa de bacterias ácido lácticas para inhibir (reducir, disminuir, descender, aliviar) el crecimiento de un *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y/o para tratar una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.

30 En la presente invención, una cepa de bacterias ácido lácticas puede ser un *Lactobacillus*. En otra modalidad, una cepa de bacterias ácido lácticas puede ser *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y/o una mezcla de estas. Cualquiera de las cepas de *Lactobacillus acidophilus* o *Lactobacillus casei* puede ser utilizada siempre y cuando no muestre efectos nocivos. Estas cepas pueden ser de origen comercial y se pueden comprar a los fabricantes de fermentos lácticos. En otra modalidad, una cepa de *Lactobacillus acidophilus* puede comprender la cepa I-1492 depositada el 15 de Noviembre, 1994 en Collection Nationale of Cultures of Microorganismes (CNCM; Institut Pasteur, 28 Rue du Docteur Roux, F-75724, Paris, CEDEX 15) de acuerdo con las condiciones del Tratado de Budapest.

35 Por "mezcla" se entiende la combinación de las cepas de las bacterias ácido lácticas en cualquiera de las proporciones dadas. La mezcla de la presente invención puede comprender la cepa *L. acidophilus* I-1492. Por ejemplo dicha mezcla puede comprender aproximadamente 95% de la cepa *L. acidophilus* I-1492 y/o aproximadamente 5% de *L. casei*. En otro ejemplo, una mezcla puede comprender por ejemplo y sin limitación, de aproximadamente 25% a aproximadamente 100% (25% a 75%, 33% a 75%, 50% a 75%, 65% a 75%, 75% a 99% de *L. acidophilus*- tal como la cepa I-1492). En una modalidad de la invención, la proporción de *L. acidophilus* es superior de 60%. La presente invención se relaciona con, y se incorpora explícitamente en este documento, cada uno y todos los miembros específicos y la combinación de las proporciones de la cepa de bacterias ácido lácticas que sea.

45 Se debe entender en este documento que por "inhibición" se entiende un proceso por el cual los microorganismos (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina) y/o las infecciones (por ejemplo, una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina) se puede reducir, retrasar, prevenir y/o impedir. Dicha inhibición puede ocurrir en cualquier momento después del contacto de una cepa de bacterias ácido lácticas con MRSA. Por ejemplo, la inhibición puede ocurrir de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 72h después del contacto. La presente invención se relaciona con, y se incorpora explícitamente en este documento, cada uno y todos los miembros específicos y la combinación de los sub-rangos del tiempo de contacto que sean. La inhibición del (crecimiento de) microorganismos (MRSA) puede ser parcial y/o completa (erradicación). Por ejemplo, la inhibición puede ser al menos 50% de la inhibición (o al menos 60%, o al menos 65%, o al menos 70%, o al menos 75%, o al menos 80%, o al menos 85%, o al menos 90%, o al menos 95%, o al menos 99%). En una modalidad de la presente invención, el crecimiento de MRSA se inhibe al menos en 99% (inhibición completa; erradicación). La presente invención se relaciona con, y se incorpora explícitamente en este documento, cada uno y todos los miembros específicos y los sub-rangos de combinación de inhibición que sean. También se debe entender en este documento que por "tratar"

se entiende un proceso por el cual los síntomas de infecciones (por ejemplo, una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina; una infección con una y/o más de una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina) no puede empeorar, puede permanecer estable, se puede reducir (reducir una infección por MRSA) y/o se puede eliminar completamente (eliminar y/o erradicar una infección por MRSA).

- 5 En un segundo aspecto de esta, la presente invención se relaciona con un método para inhibir el crecimiento de un *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y/o para tratar una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. El método puede comprender la administración de una cantidad efectiva de al menos una cepa de bacterias ácido lácticas a un sujeto con necesidad de esta.

10 Un sujeto con necesidad de esta puede ser un mamífero (tal como un humano) infectado con, sospecha de estar infectado con y/o con riesgo de estar infectado con un MRSA. Un sujeto con riesgo de estar infectado con un MRSA puede incluir miembros de la familia o cualquier sujeto (mamífero; humano) que han estado cerca a un sujeto infectado (mamífero; humano). La cantidad y/o concentración de al menos una cepa de bacterias ácido lácticas que puede ser administrada a un sujeto con necesidad de esta puede ser una "cantidad efectiva". Una cantidad efectiva de una cepa de bacterias ácido lácticas es la cantidad necesaria para obtener resultados positivos sin causar efectos excesivamente negativos en el sujeto al cual se le administra la cepa de bacterias ácido lácticas (o una composición de estas). Una cantidad efectiva de una cepa de bacterias ácido lácticas para inhibir el crecimiento de un MRSA es una cantidad que es suficiente para inhibir de cualquier manera el crecimiento de MRSA ya sea total o parcialmente. Una cantidad efectiva también puede abarcar tanto una "cantidad terapéuticamente efectiva" y/o una "cantidad profilácticamente efectiva". Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a 15 dosificaciones y por periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado, tal como una reducción en la progresión de la enfermedad (por ejemplo, una infección por MRSA) y/o alivio de los síntomas asociados con una enfermedad. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar en función de los factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso de un sujeto, y la capacidad de un agente para obtener una respuesta deseada en un sujeto. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente efectiva también aquella en la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial del agente se compensa por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a 20 dosificaciones y por periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado, tal como la prevención y/o reducción de la velocidad de la aparición o progresión de la enfermedad (por ejemplo, una infección por MRSA). Una cantidad profilácticamente efectiva se puede determinar, según se describe anteriormente para la cantidad terapéuticamente efectiva. Para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se pueden ajustar con el tiempo de acuerdo con la necesidad del sujeto y el juicio profesional de la persona que administra las composiciones.

25 Una cantidad efectiva puede ser administrada (a un sujeto con necesidad de esta) en una o más administraciones, de acuerdo con un régimen. El método de administración privilegiado y la cantidad que preferiblemente puede ser administrada pueden ser una función de muchos factores. Entre los factores que pueden influenciar esta elección son, por ejemplo, la naturaleza exacta de los ingredientes, activos o no, que entran en una composición y/o la condición, la edad y el peso de un sujeto con necesidad de esta. En una modalidad de la presente invención, la administración puede ser administración por vía oral. En otra modalidad de la presente invención, la administración puede ser por administración (rectal) con supositorio. Como resultado de la administración, las bacterias ácido 30 lácticas se pueden encontrar en el tracto digestivo de un sujeto.

35 En un tercer aspecto de esta, la presente invención se relaciona con un kit para inhibir el crecimiento de un *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y/o para tratar una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. El kit puede comprender al menos un (uno o más de un) contenedor que contiene al menos una cepa de bacterias ácido lácticas. El kit de la presente invención adicionalmente puede incluir, si se desea, uno o muchos componentes farmacéuticos convencionales, por ejemplo, contenedores que pueden comprender uno o muchos vehículos farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro contenedor adicional que puede ser evidente para alguien de habilidad en el oficio. Un kit de acuerdo con la presente invención ventajosamente puede incluir instrucciones en la forma de un folleto o de cualquier otro soporte, indicando las cantidades de la cepa de bacterias ácido lácticas y/o 40 composiciones que se administran, las instrucciones para la administración y/o las instrucciones para mezclar los componentes dados.

45 En un cuarto aspecto de esta, la presente invención se relaciona con una composición para utilizar en la inhibición del crecimiento de un *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. La composición puede comprender una cantidad efectiva de al menos una cepa de bacterias ácido lácticas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 Una "composición" de acuerdo con la presente invención puede ser en una forma sólida y/o una líquida, usual para la administración farmacéutica y/o nutricional. Más particularmente, una composición de acuerdo con la presente invención se puede presentar en una variedad de formas ingeribles, por ejemplo, leche, yogur, cuajada, leches fermentadas, productos fermentados basados en leche, productos fermentados basados en soja, productos basados en cereales fermentados, polvos basados en leche y/o fórmulas para bebés. La composición puede ser administrada en la forma de alimentos y/o suplementos alimenticios. Tales alimentos pueden ser concentrados de proteína tales como aquellos utilizados en hospitales. En caso de una preparación farmacéutica, el producto puede ser preparado 55 en formas de cápsulas, comprimidos, suspensiones bacterianas líquidas, suplementos orales secos, suplementos

orales húmedos, alimentación de tubo seco, alimentación de tubo húmedo, etc. En una modalidad de la invención, la composición se puede obtener por la fermentación de bacterias ácido lácticas en un medio basado en leche. En otra modalidad ejemplar de esta invención, la composición comprende productos Bio-K Plus™. Los productos Bio-K Plus™ son productos de fermentación láctica fácilmente disponibles en el mercado y vendidos por la compañía Bio-K Plus™ International Inc. Para este propósito, el siguiente proceso puede ser utilizado.

En primer lugar, las cepas del *Lactobacillus acidophilus* (incluyendo cepa I-1492) y *Lactobacillus casei* se incuban en un medio de fermentación del tipo MRS de acuerdo con un programa estándar que comprende varias etapas. La base láctea recombinada, que es parcialmente libre de lactosa y se desgasifica, se pasteuriza durante 1.5 minutos a 95°C y se inoculan a 10%. Finalmente, se incuba de acuerdo con el siguiente programa:

- 1) la cepa I-1492: 2 horas a 37°C
- 2) la cepa de *acidophilus*: 2 horas a 37°C y
- 3) la cepa *casei*: 1 hora a 37°C

El producto luego se co-fermenta en un medio y una atmósfera anaeróbica durante 15 horas a 37°C (des gasificado bajo CO₂).

Aunque el contenido de aminoácido total en dicha composición es similar a la leche, los aminoácidos libres son significativamente superiores. El nivel de péptidos comprendidos en la composición de la invención, que tiene un peso molecular entre 1000 y 5000Da es alrededor 30% y el nivel de péptidos pequeños que tienen menos de 10 residuos es aproximadamente 15%. Se conoce que dichos niveles de péptidos fortalecen, de una manera sorprendente, los sistemas inmunes y digestivos.

Por "vehículo farmacéuticamente aceptable" se entiende un vehículo que puede ser administrado a un sujeto, en particular a un humano, con efectos secundarios poco o nada-negativo (tóxico). Tal vehículo puede ser utilizado para diferentes funciones. Por ejemplo, puede ser utilizado como un agente de conservación, solubilización, estabilización, emulsificante, suavizante, colorante, odorización y/o como un antioxidante. El vehículo farmacéuticamente aceptable de la invención abarca vehículos nutricionalmente aceptables, es decir, cualquier forma líquida y/o sólida de nutrición que un organismo (tal como un mamífero; en particular un humano) puede asimilar.

La presente invención también se relaciona con el uso de una composición que comprende una cantidad efectiva de al menos una cepa de bacterias ácido lácticas y un vehículo farmacéuticamente aceptable en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de un *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y/o para tratar una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.

Los siguientes ejemplos ilustran las potenciales aplicaciones de la invención y no tienen la intención de limitar su alcance. Se pueden hacer modificaciones y variaciones en esta sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

EJEMPLO 1

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS CLÍNICAS DEL STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE A LA METICILINA (MRSA)

Diez aislados de *S. aureus* resistente a la meticilina clínicos fueron obtenidos (Shabnam Y, 2002) de diferentes infecciones clínicas como se muestra en la **TABLA 1**.

TABLA 1 AISLAMIENTO DE CEPAS CLÍNICAS DEL MRSA

Aislado Clínico #	Sitio de Infección Clínica
18	Nariz
22	Herida de pantorrilla
27	Herida del muslo
36	Pus abdominal
43	Pulmones
61	Vagina
64	Ojos
69	Nariz
75	Lengua
80	Pus de herida

La sensibilidad a los antibióticos de todas las cepas aisladas, fue evaluada de acuerdo con la metodología estándar sugerida por el Canadian Committee on Antibiotic Resistance (Shabnam Y, 2002). Todas las cepas se mostraron que eran sensibles a la vancomicina pero resistentes a los antibióticos meticilina, oxacilina, eritromicina y cefazolina. Las especies de *Staphylococcus* se dividen en *Staphylococci* positivo a la coagulasa, representadas por *S. aureus*, y *Staphylococci* negativo a la coagulasa, que comprenden diferentes especies. La resistencia a la meticilina se codifica por el gen *mecA*. Para confirmar la identidad de los aislados clínicos, su ADN genómico fue aislado (kit de aislamiento de ADN, Roche Applied Science) después de un cultivo de 24h en presencia de oxacilina a una concentración de 8µg/mL. El ADN genómico fue evaluado para la presencia o ausencia de los genes *mecA* y *coa* por PCR (Novocastra kit-primer set NCL-SA-PS, Vision BioSystems Inc.). Los resultados se muestran en la **FIG. 1**. Todos los aislados clínicos aislados fueron *coa* y *mecA* positivos.

EJEMPLO 2

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL *L. ACIDOPHILUS* I-1492 Y *L. CASEI* EN AISLADO CLÍNICO DE MRSA #43 EN CULTIVOS LÍQUIDOS MEZCLADOS

El efecto biológico del *Lactobacillus acidophilus* 1-1492 y *Lactobacillus casei* en el aislado clínico resistente a la meticilina #43 fue estudiado en cultivos líquidos mezclados. El protocolo experimental fue de la siguiente manera. Un pre-cultivo se preparó por incubación de 500µl de bacterias en 10ml de leche peptonada (Sigma) a 37°C durante 24h. La viabilidad de monocultivos con el tiempo se registró como se muestra en la **TABLA 2** mediante la realización de condiciones de cultivo continuo. Las unidades formadoras de colonias fueron determinadas por métodos estándar mediante el recuento de las colonias formadas en el medio sólido de leche peptonada. Estos pre-cultivos sirvieron como material inicial para cultivos mixtos.

TABLA 2 VIABILIDAD DE MONOCULTIVOS COMO UNA FUNCIÓN DEL TIEMPO

TIEMPO DE INCUBACIÓN (h)	<i>L. ACIDOPHILUS</i> I-1492 X 10 ⁸ CFU/mL	<i>L. CASEI</i> X 10 ⁸ CFU/mL	MRSA #43 X 10 ⁸ CFU/mL
24	1.29	3.20	3.76

(continuación)

TIEMPO DE INCUBACIÓN (h)	<i>L. ACIDOPHILUS</i> I-1492 X 10 ⁸ CFU/mL	<i>L. CASEI</i> X 10 ⁸ CFU/mL	MRSA #43 X 10 ⁸ CFU/mL
48	3.54	2.33	3.80
72	1.34	2.26	2.30

Los cultivos mixtos se prepararon en medio líquido por la mezcla de 100µl de *L. acidophilus* (1.3 X 10⁶ células), 100µl de *L. casei* (3.2 X 10⁶ células) y 100µl de MRSA, #43 (3.8 X 10⁶ células) en 10ml de leche peptonada. Los cultivos mixtos se cultivan por 24h, 48h y 72h y las CFU fueron determinadas utilizando agar de leche peptonada o medio selectivo de MRSA (Agar de Manitol Salado-MSA). Como se muestra en la **TABLA 3**, después de 24h de incubación en la presencia de bacterias de *L. casei* y *L. acidophilus*, MRSA fueron inhibidos por más del 99% (eliminados). Estos resultados mostraron claramente el efecto inhibitorio de una mezcla de bacterias ácido lácticas (*L. acidophilus* y *L. casei*) en MRSA.

TABLA 3 RECUENTO DE MRSA VIABLE DESPUÉS DE LOS CULTIVOS MEZCLADOS

Tiempo de incubación (h)	Medio de Leche Peptona X 10 ⁸ CFU/mL	MSA X 10 ³ CFU/mL
24	3.65	2.99
48	2.12	0
72	1.07	0

EJEMPLO 3**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL *LACTOBACILLUS CASEI* EN MRSA ATCC STD 43300 Y AISLADO CLÍNICO DE MRSA #43**

En la **FIG. 2**, el efecto inhibitor del crecimiento de *Lactobacillus casei* en, ya sea el aislado clínico de MRSA #43 o Estándar de MRSA ATCC 43300 se comparó con la cepa de las bacterias ácido lácticas de *Lactococcus lactis ssp cremoris* utilizando el método de prueba de susceptibilidad antimicrobiana (discutido en Jacobsen et al. 1999 and Schellenberg et al. 2006). El protocolo experimental fue de la siguiente manera. 3µl de un cultivo de 24h de *Lactobacillus casei* o una mezcla de estos se colocaron en una caja de Petri que contiene 7ml de agar Monn-Rogosa-Sharpe (MRS) y se incubó a 37°C durante 24h en condiciones anaeróbicas. El siguiente día, 200µl de un cultivo de 24h del aislado clínico de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina #43, se adicionaron a una mezcla 1:1 de Brain Heart Infusion (BHI) y MRS que contiene 0.7% de agar y fueron vertidos en la caja de Petri previamente manchada. La caja de Petri fue incubada otra vez por 24h a 48h bajo condiciones aeróbicas. Los diámetros de inhibición luego se podrían calcular y la caja de Petri fue fotografiada para registrar los resultados. Solo los agentes de inhibición del crecimiento de MRSA pueden formar zonas de inhibición al rededor de la región inoculada. *Lactobacillus casei* mostró un efecto inhibitor del crecimiento, como se observa con una zona de inhibición de 2cm (panel A) y un efecto inhibitor del crecimiento en el Estándar de MRSA ATCC 43300 como se muestra con una zona de inhibición de 3cm (panel B). Por lo tanto *Lactobacillus casei* es efectiva en la inhibición del crecimiento de ambas la cepa de estándar de MRSA ATCC 43300 y el aislado clínico de MRSA. En los dos paneles, la inoculación del cultivo de bacterias ácido lácticas del *Lactococcus lactis spp cremoris* no dieron lugar a la inhibición del crecimiento y ninguna zona de inhibición se detectó (flecha, **FIG. 2**). Por lo tanto, no todas las bacterias ácido lácticas inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina y *L. casei* inhibe ambos el estándar y el MRSA clínico.

EJEMPLO 4**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *L. ACIDOPHILUS* I-1492 Y *L. CASEI* EN EL AISLADO CLÍNICO DE MRSA #43**

El efecto biológico de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* en el aislado clínico resistente a la metilina #43 fue estudiado utilizando pruebas de susceptibilidad antimicrobiana como se describe anteriormente para *L. casei*. Como se muestra en la **FIG. 3**, ambos *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* inhibieron el crecimiento del aislado clínico de MRSA #43 como se muestra por una zona de inhibición de 2cm para el *Lactobacillus casei* (panel A) y una zona de inhibición de 3cm para el *Lactobacillus acidophilus* (panel B). Por lo tanto, ambas cepas de las bacterias ácido lácticas muestran un efecto inhibitor en el crecimiento de MRSA.

EJEMPLO 5**ACTIVIDADES ANTIBACTERIANAS DEL *LACTOBACILLUS CASEI* Y *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* EN VARIOS AISLADOS CLÍNICOS DE MRSA**

El efecto inhibitor del crecimiento de *L. casei* y *L. acidophilus* fue evaluado en diez diferentes aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina. Tres experimentos independientes se realizaron y el diámetro de inhibición promedio (med.) se muestra en la **TABLA 4**.

TABLA 4 EFECTO INHIBIDOR DE *L. CASEI* O *L. ACIDOPHILUS* EN AISLADOS CLÍNICOS DE MRSA

Aislado Clínico #	Diámetro de inhibición (cm)								
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> I- 1492				<i>Lactobacillus casei</i>				<i>Lactococcus cremoris</i>
	Exp1	Exp2	Exp3	Media	Exp1	Exp2	Exp3	Media	
43	3	2.8	3	2.9	2	2.2	2	2	0
64	2.5	2.7	2.4	2.5	2	2.1	2.2	2.1	0
75	2	2	1.8	1.9	1.2	1.6	1.5	1.4	0
27	2.5	2.3	2.5	2.4	2	2.1	2	2	0
61	1.6	2	1.5	1.7	1.8	2	2	1.9	0
22	2.2	1.7	2	1.9	2	2.3	2.1	2.1	0
18	2	1.8	2	1.9	2.5	2.3	2	2.2	0
69	2.2	2	2	2	2.3	2.5	2.5	2.4	0
80	2	2.1	2	2	2.5	2.4	2.5	2.4	0
36	3	3	2.9	2.9	3	2.8	2.9	2.9	0

No se detectó inhibición utilizando el *Lactococcus cremoris* lo que demuestra que no todas las bacterias ácido lácticas tienen la propiedad de inhibición del crecimiento en *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. El efecto de inhibición del crecimiento fue visto utilizando ya sea el *Lactobacillus acidophilus* o el *Lactobacillus casei* y varió, dependiendo del aislado clínico de MRSA, de 1.7cm a 2.9cm para el *Lactobacillus acidophilus*, y de 1.4cm a 2.9cm para el *Lactobacillus casei*. En conjunto, estos datos mostraron claramente el efecto inhibitorio del crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* en múltiples aislados clínicos de MRSA.

EJEMPLO 6

ACTIVIDADES ANTIBACTERIANAS DE MEZCLAS DE L. CASEI Y L. ACIDOPHILUS EN AISLADO CLÍNICO DE MRSA #43

El efecto inhibitorio del crecimiento de mezclas de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* fue evaluado en aislado clínico MRSA #43. Las mezclas comprendieron diferentes concentraciones de las dos cepas de *lactobacilli* como se indica en la **TABLA 5**. Tres experimentos independientes se realizaron y los diámetros de inhibición promedios (media) en centímetros se muestran en la **TABLA 5**. *L. cremoris* fue utilizada, como un control negativo.

TABLA 5 ACTIVIDADES ANTIBACTERIANAS DE LAS MEZCLAS DE L. CASEI Y L. ACIDOPHILUS EN AISLADO CLÍNICO DE MRSA #43

Relaciones de Cepas	Diámetro de inhibición (cm)				
	Exp1	Exp2	Exp3	Media	
L.a.:L.c.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> I-1492 (L.a) <i>Lactobacillus casei</i> (L. c)				<i>Lactococcus cremoris</i>
2:3 (4µl L.a.:6µl L.c)	2.5	3.3	3.0	2.9	0
4:1 (8µl L.a.:2µl L.c.)	3.0	3.5	3.3	3.2	0
3:2 (6µl L.a.:4µl L.c.)	3.0	2.5	3.5	3.0	0
1:1 (5µl L.a.:5µl L.c.)	3.5	3.3	3.6	3.4	0
1:4 (2µl L.a.:8µl L.c.)	2.6	3.0	2.7	2.7	0
*3µl de <i>L. acidophilus</i> representa 9×10^6 células					
*3µl de <i>L. casei</i> representa 5×10^6 células.					

Los diámetros de inhibición variaron de 2.9cm a 3.4cm. La relación que se obtiene de la zona de inhibición más alta fue la relación 1:1 (volumen) en donde la mezcla consistió de aproximadamente 64% (de células totales) de células de *L. acidophilus* y aproximadamente 36% de células de *L. casei* (de células totales). Estos resultados mostraron claramente que las concentraciones relativas de las cepas de bacterias ácido lácticas en una composición puede jugar un papel en favor de la inhibición máxima y que la combinación de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* es claramente inhibitoria para el crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.

EJEMPLO 7

ACTIVIDADES ANTIBACTERIANAS DE L. CASEI Y L. ACIDOPHILUS EN MÚLTIPLES AISLADOS CLÍNICOS DE MRSA

El efecto inhibitorio del crecimiento de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* fue evaluado en una mezcla de los diez aislados clínicos de MRSA. Los pre-cultivos se prepararon por incubación de *L. acidophilus*, *L. casei* y todas las cepas de MRSA durante 24h a 37°C. La actividad antibacteriana fue evaluada como se describe anteriormente. 3µl de *L. acidophilus* I-1492 representaron 3.8×10^6 células, 3µl de *L. casei* representaron 9.6×10^6 células y la mezcla de ambas cepas representó 6.7×10^6 células (3µl de alícuota de una mezcla de 6µl). Los aislados de MRSA se combinaron por la mezcla de 500µl de cada uno de los pre-cultivos aislados juntos, para un volumen final total de 5ml. 200µl de la mezcla de 5ml, se adicionaron a 0.7% de agar-BHI adicionado a la capa de bacteria láctica (para un total de 1.46×10^7 células). La placa se incubó durante 24h a 37°C y los diámetros de inhibición fueron determinados. *L. cremoris* fue utilizada como un control negativo mientras que MRSA ATCC 43300 sirvió como un control positivo. Tres experimentos independientes se realizaron; las medias de los diámetros de inhibición en centímetros, se muestran en la **TABLA 6**.

TABLA 6 ACTIVIDADES ANTIBACTERIANAS DE *L. CASEI* Y *L. ACIDOPHILUS* EN MÚLTIPLES AISLADOS CLÍNICOS DE MRSA

<u>CEPA(S) DE LAB.</u>	<u>DIÁMETRO DE INHIBICIÓN (cm)</u>							
	<u>Aislados Clínicos de MRSA (10)</u>				<u>MRSA A TCC 43300</u>			
	Exp1	Exp2	Exp3	Media	Exp1	Exp2	Exp3	Media
<i>L. casei</i> + <i>L. acidophilus</i> I-1492 1:1	3.2	3.5	3.3	3.3	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> I-1492	3.0	3.2	3.0	3.0	3.0	2.6	2.7	2.7
<i>L. casei</i>	2.2	2.5	2.3	2.3	2.0	2.5	2.4	2.3
<i>Lactococcus cremoris</i>	0	0	0	0	-	-	-	-

5 Los diámetros de inhibición variaron de 2.3 a 3.3cm. Estos resultados mostraron claramente que las cepas de las bacterias ácido lácticas (solas o en combinación) inhiben más de uno de los (múltiples) aislados clínicos de MRSA y que la combinación de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* también es inhibidora del crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina múltiple clínico.

EJEMPLO 8**10 ACTIVIDADES ANTIBACTERIANAS DE PREPARACIONES COMERCIALES BIO-K PLUS™ EN AISLADO CLÍNICO DE MRSA #43**

15 Los productos Bio-K Plus™, son productos de fermentos lácticos fácilmente disponibles en el mercado y vendidos por la compañía Bio-K Plus™ International Inc. La actividad antibacteriana de dos productos comerciales Bio-K Plus™ que comprenden *L. acidophilus* y *L. casei*, fue evaluada. Los productos fueron productos basados tanto en leche fermentada como basados en soja fermentada. 3µl de cada producto fueron depositados en medio MRS y se incubaron en condiciones anaeróbicas durante 24h a 37°C (3µl de producto basado en leche: 9.9×10^5 células; 3µl de de producto basado en soja: 4.5×10^5 células). MRSA #43 se preparó como se describe anteriormente. 200µl del pre-cultivo de MRSA #43 fueron transferidos a 7ml de 0.7% de BHI y se vierte en la parte superior de una capa que comprende bacteria del producto Bio-K Plus™ (MRSA #43 total: 8.7×10^6 células). Tres experimentos independientes se realizaron y las medias de los diámetros de inhibición en centímetros se muestran en la **TABLA 7**. *L. cremoris* fue utilizada como un control negativo mientras que MRSA ATCC 43300 sirvió como un control positivo.

TABLA 7 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS PRODUCTOS BIO-K PLUS™ EN MRSA #43

<u>Productos Bio-K Plus</u>	<u>DIÁMETRO DE INHIBICIÓN (cm)</u>							
	<u>MRSA #43</u>				<u>MRSA ATCC 43300</u>			
	Exp1	Exp2	Exp3	Media	Exp1	Exp2	Exp3	Media
Producto basado en la leche	3.2	2.9	3.0	3.0	2.8	3.0	2.7	2.8
Producto basado en soja	2.5	2.3	2.5	2.4	2.0	2.3	1.8	2.0
Lactococcus cremoris	0	0	0	0	-	-	-	-

25 Estos resultados muestran que ambos productos mostraron actividad inhibidora contra un aislado de MRSA clínico y que las bacterias ácido lácticas, incluso en preparaciones de alimentos, inhiben el MRSA.

Aunque la presente invención ha sido descrita por medio de modalidades ejemplares, se debería entender por aquellos de habilidad en el oficio que los cambios precedentes y otros, omisiones y adiciones se pueden hacer de esta y en la misma, sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención.

REFERENCIAS

30 Alvarez-Olmos et al. 2001 Clin Infect Dis. 32(11):1567-76.

D'Souza et al. 2002 BMJ 324(7350):1361.

Jacobsen et al. 1999 Appl Environ Microbiol. 65(11):4949-56.

Lu et al. Am J Clin Nutr. 2001 73(6):1124-1130.

Martins et al. 2007 Microbiology and Immunology Vol. 51 No. 9 pp.787-795.

Mathur S and Singh R, 2005, Journal of Food Microbiology, 105, 281-295.

5 Schellenberg et al. 2006 J Microbiol Methods 65(1):1-9.

Shabnam Y., 2002. Characterisation of Methicillin resistant Staphylococcus aureus by phenotyping and genotyping método, M.Sc. thesis, Université de Montréal.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para utilizar en un método para inhibir el crecimiento *in vivo* de un *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, que comprende una cantidad efectiva de al menos una cepa de bacterias ácido lácticas seleccionada del grupo que consiste de *Lactobacillus acidophilus* I-1492, *Lactobacillus casei* y una mezcla de estas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
2. Una composición para utilizar en el tratamiento de una infección por el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, que comprende una cantidad efectiva de al menos una cepa de bacterias ácido lácticas seleccionada del grupo que consiste de *Lactobacillus acidophilus* I-1492, *Lactobacillus casei* y una mezcla de estas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la mezcla comprende 25% a 75% del *Lactobacillus acidophilus*.
4. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la mezcla comprende 33% a 75% del *Lactobacillus acidophilus*.
- 15 5. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la mezcla comprende 50% a 75% del *Lactobacillus acidophilus*.
6. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la mezcla comprende 65% a 75% del *Lactobacillus acidophilus*.
7. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la mezcla comprende 75% a 100% del *Lactobacillus acidophilus*.
- 20 8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha composición es para administración oral.
- 25 9. Uso de una composición que comprende una cantidad efectiva de al menos una cepa de bacterias ácido lácticas seleccionada del grupo que consiste de *Lactobacillus acidophilus* I-1492, *Lactobacillus casei* y una mezcla de estas y un vehículo farmacéuticamente aceptable en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de un *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.
10. Uso de una composición que comprende una cantidad efectiva de al menos una cepa de bacterias ácido lácticas seleccionada del grupo que consiste de *Lactobacillus acidophilus* I-1492, *Lactobacillus casei* y una mezcla de estas y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la fabricación de un medicamento para tratar una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.
- 30 11. Uso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, **caracterizado en que** la composición comprende una mezcla de *Lactobacillus acidophilus* I-1492 y *Lactobacillus casei*.

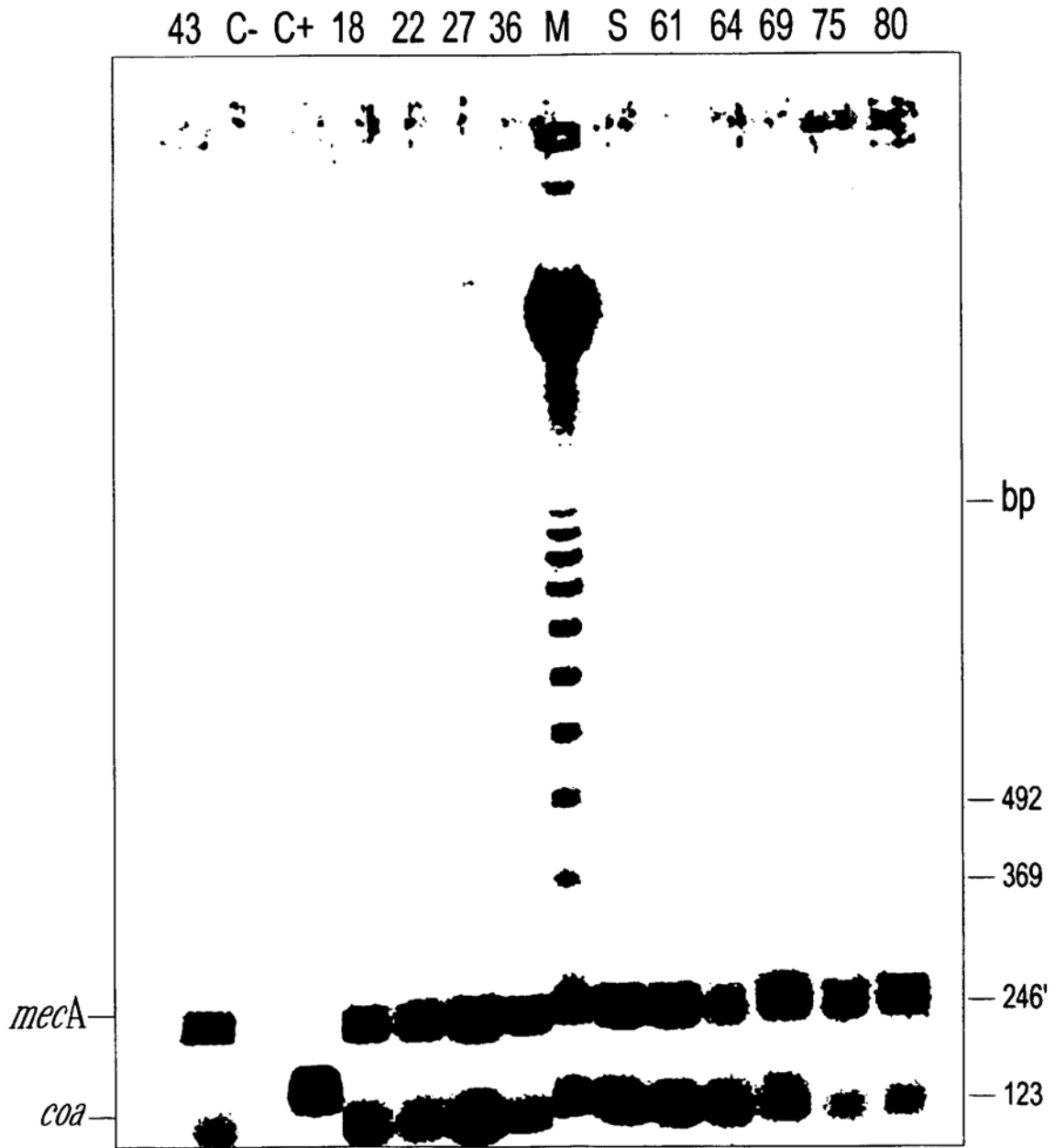


Fig. 1

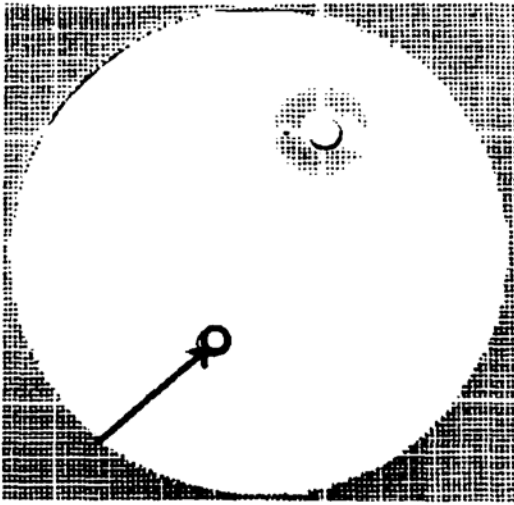


Fig. 2A

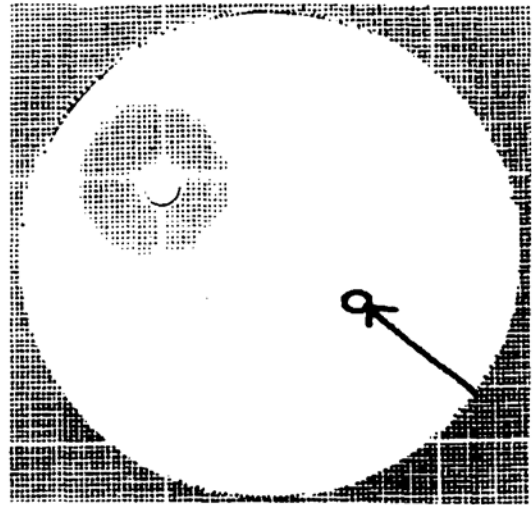


Fig. 2B



Fig. 3A

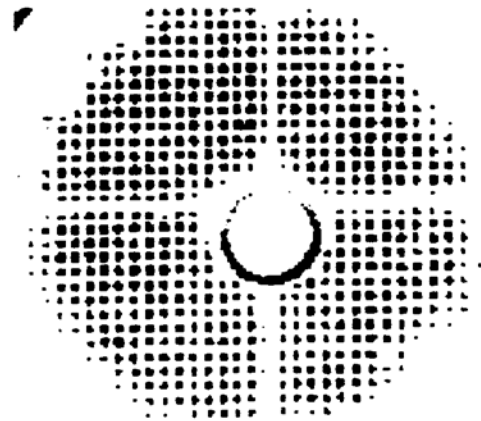


Fig. 3B