

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 059**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2011 E 11710383 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2547348**

54 Título: **Método para usar una cepa de Bacillus subtilis para la profilaxis y el tratamiento de afecciones gastrointestinales**

30 Prioridad:

17.03.2010 US 314997 P

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

04.11.2015

73 Titular/es:

**BAYER CROPSCIENCE LP (100.0%)
2 T.W. Alexander Drive
Research Triangle Park, NC 27709, US**

72 Inventor/es:

**SCHMIDT, JOSEPH EARL y
JIMENEZ, DESMOND RITO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 550 059 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

Método para usar una cepa de *Bacillus subtilis* para la profilaxis y el tratamiento de afecciones gastrointestinales

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de probióticos y su capacidad para mejorar la salud humana, especialmente previniendo o tratando trastornos gastrointestinales.

10 Antecedentes de la invención

El género *Bacillus* comprende numerosas bacterias que forman endosporas que tienen miríadas de usos en los campos agrícola, de nutrición animal y de salud humana, entre otros. Varias cepas de *Bacillus* se comercializan actualmente para su uso como probióticos para fomentar la salud intestinal. Aunque varios productos comerciales contienen cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, y *Bacillus coagulans*, no todas las cepas de *Bacillus* son probióticos eficaces y se deben evaluar caso por caso para determinar la seguridad y eficacia.

Compendio de la invención

20 La presente invención proporciona el uso de una cepa de *Bacillus subtilis* que, cuando se administra a un ser humano, aumenta la salud de tal ser humano. Específicamente, la presente invención se refiere a una composición para su uso en mejorar la salud de un ser humano administrando al ser humano *Bacillus subtilis* QST713 o mutantes de la misma y opcionalmente metabolitos de *Bacillus subtilis* QST713 o mutantes de la misma en una cantidad eficaz para tratar o prevenir trastornos gastrointestinales. Tal administración puede reducir, aliviar o prevenir
25 síntomas de tales trastornos, tal como diarrea, cólicos e inflamación del aparato digestivo. La invención también proporciona una composición que comprende (i) *Bacillus subtilis* QST713 o un mutante de *Bacillus subtilis* QST713 que tiene todas las características identificativas de *Bacillus subtilis* QST713 en una cantidad que es eficaz para reducir al menos un síntoma de un trastorno gastrointestinal y (ii) alimentos humanos o una bebida diferente de agua.

30 Las composiciones de la presente invención pueden incluir *Bacillus subtilis* QST713 o mutantes de la misma y opcionalmente metabolitos de *Bacillus subtilis* QST713 o mutantes de la misma en una cantidad eficaz para tratar o prevenir trastornos gastrointestinales en combinación con un soporte, tal como un recubrimiento entérico. Otras composiciones pueden incluir *Bacillus subtilis* QST713 o mutantes de la misma y/o metabolitos de *Bacillus subtilis*
35 QST713 o mutantes de la misma y (i) otros probióticos, tal como *Saccharomyces boulardii*, (ii) un fármaco usado para tratar o prevenir trastornos gastrointestinales, tal como fármacos antiinflamatorios e interferones, o (iii) alimentos o bebida diferente de agua (tal como leche o una bebida que no está compuesta de agua solo, tal como limonada, zumo o té) o leche maternizada.

40 En algunas formas de realización, las composiciones de la invención se administran en una cantidad eficaz para mantener la microflora intestinal sana. En otras, se administran en una cantidad eficaz para disminuir el crecimiento de bacterias patógenas en el ser humano o para modificar los factores de virulencia de bacterias patógenas de modo que la virulencia del patógeno se atenúa.

45 La administración se puede lograr comiendo o bebiendo la composición sola o en combinación con alimentos o bebida o tragando una píldora que comprende la composición. En una forma de realización, la bebida no es agua (y puede ser, por ejemplo, leche) o no es solo agua (y puede ser, por ejemplo, limonada o zumo o té).

50 La administración de las composiciones se puede producir durante un periodo relativamente corto después de que un ser humano padezca síntomas de un trastorno gastrointestinal para aliviar tales síntomas. La administración también se puede producir a diario o en otra base regular para prevenir que los síntomas de un trastorno gastrointestinal se produzcan o reaparezcan.

Breve descripción de las figuras

55 La figura 1 muestra resultados de una prueba de una preparación sin células de *Bacillus subtilis* QST713 para eficacia contra varios aislados de *Clostridia*.

60 La figura 2 representa resultados de un prueba de una preparación sin células de *Bacillus subtilis* QST713 tratada con calor para eficacia contra varios aislados de *Clostridia*.

La figura 3 muestra resultados de una prueba de una preparación sin células de *Bacillus subtilis* QST713 para eficacia contra varios aislados de *Listeria*.

65 La figura 4 representa resultados de un prueba de una preparación sin células de *Bacillus subtilis* QST713 tratada con calor para eficacia contra varios aislados de *Listeria*.

La figura 5 muestra resultados de una prueba de una preparación sin células de *Bacillus subtilis* QST713 para eficacia contra varios aislados de *Salmonella*.

5 La figura 6 representa resultados de un prueba de una preparación sin células de *Bacillus subtilis* QST713 tratada con calor para eficacia contra varios aislados de *Salmonella*.

La figura 7 muestra placas de agar en las que *Bacillus subtilis* QST713 (vertical) y varios aislados de *Clostridium perfringens* (horizontal) se sembraron por estrías cruzadas para probar la eficacia de QST713 contra los patógenos.

10 La figura 8 muestra placas de agar en las que *Bacillus subtilis* QST713 (vertical) y varios aislados de *Campylobacter jejuni* (horizontal) se sembraron por estrías cruzadas para probar la eficacia de QST713 contra los patógenos.

15 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un uso novedoso de la cepa de *Bacillus subtilis* QST 713 y opcionalmente sus metabolitos que son eficaces para mejorar la salud humana como un probiótico. Los probióticos se usan en aplicaciones de salud humana para mantener la microflora intestinal sana, incluyendo una reducción en bacterias perjudiciales tal como *Clostridia difficile*, y para aliviar los síntomas de trastornos gastrointestinales.

20 La presente invención abarca una composición para uso en mejorar la salud humana administrando a un paciente una composición que comprende (i) *Bacillus subtilis* QST713, (ii) mutantes de *Bacillus subtilis* QST713, (iii) preparaciones sin células de (i) o (ii), o (iv) metabolitos de (i) o (ii).

25 *Bacillus subtilis* QST713, sus mutantes, sus sobrenadantes, y sus metabolitos lipopéptidos, y los métodos para su uso para controlar patógenos vegetales e insectos se describen por completo en las patentes en EE UU No. 6.060.051, 6.103.228, 6.291.426, 6.417.163 y 6.638.910. En estas patentes, la cepa de denomina AQ713. *Bacillus subtilis* QST713 se ha depositado en el NRRL el 7 de mayo, 1997 según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para el Fin de Procedimiento de Patente con el número de acceso B21661. Cualquier referencia en esta especificación a QST713 se refiere a *Bacillus subtilis* QST713.

35 La cepa de *Bacillus subtilis* QST713 tiene ciertas propiedades que, sorprendentemente, se han encontrado que hacen la cepa adecuada para mejorar la salud humana. Las esporas de QST713 son viables a bajo pH y las células de QST713 crecen (dadas las condiciones de nutrientes propicias) a pH tan bajo como 4,5. QST713 también tiene la capacidad de agregar, o aglomerar, como se muestra en el ejemplo 2, de esta manera desplazando y reduciendo las bacterias patógenas. Sin querer estar limitado por ninguna teoría particular, se piensa que *Bacillus subtilis* QST713 aumenta la salud humana mediante un modo de acción multifaceta, incluyendo (i) producir metabolitos antibacterianos, (ii) competir con patógenos usando más nutrientes y/o espacios de unión que los patógenos, lo que previene así el establecimiento eficaz de bacterias patógenas en el intestino, (iii) inmunomodulación, y/o (iv) modificación de factores de virulencia de patógenos bacterianos de tal manera que la virulencia de los patógenos se atenúa.

45 En un aspecto de la invención, las composiciones administradas a seres humanos comprenden mutantes de *Bacillus subtilis* QST713 que tienen todas las características identificadoras de QST713. Tales mutantes pueden tener una identidad de secuencia de ADN respecto a QST713 de al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, o al menos aproximadamente el 99%. En algunas formas de realización, los mutantes son mutantes espontáneos. El término mutante espontáneo se refiere a mutantes que surgen de QST713 sin el uso intencional de mutágenos. Tales mutantes espontáneos se pueden obtener por métodos clásicos, tal como cultivar la cepa de *Bacillus subtilis* en presencia de un cierto antibiótico al que la cepa madre es susceptible y probar cualquier mutante resistente para actividad biológica mejorada o, en esta solicitud, capacidad mejorada para mejorar la salud humana incluyendo la reducción de los síntomas de trastornos gastrointestinales. Otros métodos para identificar mutantes espontáneos los conocerán los expertos en la materia.

55 Todas las referencias en esta solicitud a *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes se refiere a bacterias que se han aislado de la naturaleza y las cultivan los seres humanos, por ejemplo, en el laboratorio o en condiciones industriales.

60 Las células de *Bacillus subtilis* QST713 pueden estar presentes en las composiciones de la presente invención como esporas (que están latentes), como células vegetativas (que crecen), como células en estado de transición (que están en transición de la fase de crecimiento a la fase de esporulación) o como una combinación de todos estos tipos de células. En algunas formas de realización, la composición comprende principalmente esporas. En otras formas de realización, la composición comprende esporas y metabolitos producidos por las células durante la fermentación antes de que esporulen, como se describe posteriormente.

Los metabolitos de QST713 o sus mutantes incluyen lipopéptidos, tal como iturinas, surfactinas, plipastatinas y agrastatinas y otros compuestos con prioridades antibacterianas. Los metabolitos lipopéptidos de QST713 se describen en detalle en las patentes en EE UU No. 6.291.426 y 6.638.910.

Las composiciones de la presente invención se pueden obtener cultivando *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes según métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo usar los medios y otros métodos descritos en la patente en EE UU No. 6.060.051. Los procesos de cultivo microbiano a gran escala convencionales incluyen fermentación sumergida, fermentación en estado sólido, o cultivo de superficie líquido. Hacia el final de la fermentación, según se acaban los nutrientes, las células de *Bacillus subtilis* QST713 empiezan la transición desde la fase de crecimiento a la fase de esporulación, de modo que el producto final de la fermentación es principalmente esporas, metabolitos y medio de fermentación residual. La esporulación es parte del ciclo de vida natural de esta *Bacillus subtilis* y generalmente se inicia por las células en respuesta a limitación de nutrientes. La fermentación se configura para obtener altos niveles de unidades formadoras de colonias de *Bacillus subtilis* QST713 y fomentar la esporulación. Las células bacterianas, esporas y metabolitos en medio de cultivo resultantes de la fermentación se pueden usar directamente o concentrar por métodos industriales convencionales, tal como centrifugación, filtración de flujo tangencial, filtración en profundidad, y evaporación. En algunas formas de realización, el caldo de fermentación concentrado se lava, por ejemplo, a través de un proceso de diafiltración, para eliminar caldo de fermentación residual y metabolitos.

El caldo de fermentación o concentrado de caldo se puede secar con o sin la adición de soportes usando procesos o métodos de secado convencionales tal como secado por rociado, liofilizado, secado en bandeja, secado en lecho fluido, secado en tambor, o evaporación. Los productos secos resultantes se pueden procesar adicionalmente, tal como por molido o granulación, para alcanzar un tamaño de partícula o formato físico específico. También se pueden añadir soportes, descritos posteriormente, después del secado.

Se pueden obtener preparaciones sin células de caldo de fermentación de QST713 por cualquier medio conocido en la técnica, tal como extracción, centrifugación y/o filtración del caldo de fermentación. Los expertos en la materia apreciarán que las llamadas preparaciones sin células pueden no carecer de células sino más bien son principalmente sin células o esencialmente sin células, dependiendo de la técnica usada (por ejemplo, velocidad de centrifugación) para eliminar las células. La preparación sin células resultante se puede secar y/o formular con componentes que ayudan en su administración a seres humanos. Los métodos de concentración y técnicas de secado descritos anteriormente para caldo de fermentación también son aplicables a preparaciones sin células.

Se pueden obtener metabolitos de QST713 según los métodos explicados en la patente en EE UU No. 6.060.051. El término "metabolito" como se usa en el presente documento se puede referir a metabolitos semipuros y puros o esencialmente puros, o a metabolitos que no se han separado de *Bacillus subtilis* QST713. Los lipopéptidos y otros metabolitos bactericidas de QST713 están entre 600 kilodalton y 100 dalton. Por tanto, en algunas formas de realización, después de hacer la preparación sin células por centrifugación del caldo de fermentación de QST713, los metabolitos se pueden purificar por filtración de exclusión molecular que agrupa metabolitos en diferentes fracciones basadas en el valor de corte de peso molecular, tal como peso molecular de menos de 600 kDa, menos de 500 kDa, menos de 400 kDa etcétera. Los métodos de concentración y secado descritos anteriormente para la formulación de caldo de fermentación también son aplicables a metabolitos.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir soportes, que son ingredientes de formulación inertes añadidos a composiciones que comprenden células, preparaciones sin células o metabolitos para mejorar la recuperación, eficacia o propiedades físicas y/o para ayudar en el empaquetamiento y administración. Tales soportes se pueden añadir individualmente o en combinación. En algunas formas de realización, los soportes se añaden después de concentrar el caldo de fermentación y durante y/o después del secado. Los soportes sólidos convencionales son silicona, almidón, talco, fosfato de calcio, sulfato de calcio, estearato de magnesio, ácido esteárico, metilcelulosa, alginatos, dextranos, goma arábica y otros soportes convencionales que conocen bien los expertos en la materia. También se pueden usar otros ingredientes de formulación tal como diluyentes, aglutinantes, lubricantes, agentes de color y saborizantes.

En una forma de realización, las composiciones de la presente invención pueden estar en forma de preparaciones sólidas, tal como cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos y obleas, o preparaciones líquidas, tal como suspensiones. Las composiciones de la presente invención también se pueden incorporar en alimentos o bebidas, incluyendo alimentos médicos recetados por un médico para las necesidades nutricionales particulares de un paciente, leches maternizadas, alimentos naturales, y suplementos nutricionales. Alternativamente, las composiciones se pueden preparar en una forma en polvo, granular o líquida para mezclar con alimentos o bebidas, tal como agua o bebidas diferentes de agua (es decir, bebidas que no están producidas con agua o no consisten solo en agua), inmediatamente antes del consumo.

En formas de realización en las que la composición comprende metabolitos de QST713 o sus mutantes o células vegetativas de QST713 o sus mutantes, o preparaciones sin células de QST713 o sus mutantes, se puede formular con un recubrimiento entérico que permanece intacto en el estómago pero se disuelve y libera los metabolitos, tal

como bacteriocinas y/o lipopéptidos, y/o células vegetativas, una vez que alcanza el intestino delgado o el intestino grueso.

En formas de realización en que las composiciones se formulan por separados de alimentos o bebida, la concentración en una base de peso por peso (p/p) de (i) *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes, (ii) preparaciones sin células de QST713 o sus mutantes, (iii) metabolitos de QST713 o sus mutantes o (iv) combinaciones de células y metabolitos en la composición formulada puede ser aproximadamente el 0,5%, aproximadamente el 1%, aproximadamente el 2%, aproximadamente el 3%, aproximadamente el 4%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 6%, aproximadamente el 7%, aproximadamente el 8%, aproximadamente el 9%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 11%, aproximadamente el 12%, aproximadamente el 13%, aproximadamente el 14%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 16%, aproximadamente el 17%, aproximadamente el 18%, aproximadamente el 19%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, o aproximadamente el 95%. En algunas formas de realización, por ejemplo, donde el caldo de formulación concentrado se ha lavado y secado sin calor, tal como a través de liofilización, la concentración de *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes en la composición final puede ser desde aproximadamente el 90% hasta aproximadamente el 100%.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar/alimentar a seres humanos para mejorar la salud del intestino o el estado físico global general de tal ser humano. Las composiciones se pueden administrar para aplicaciones tanto terapéuticas como no terapéuticas. Una cantidad eficaz de una composición es una cantidad eficaz para mejorar la salud de un ser humano en comparación con un ser humano al que no se ha administrado la composición pero al que de otra manera se ha administrado la misma dieta que al ser humano que recibe las composiciones de la presente invención y tiene el mismo trastorno o síntomas o tiene el mismo riesgo para el trastorno que el ser humano al que se le ha administrado la composición. Alternativamente, una cantidad eficaz es la cantidad necesaria para prevenir la recaída o para reducir síntomas de trastornos gastrointestinales.

En una forma de realización, la composición se usa para mejorar la salud de un ser humano que padece o tiene riesgo para un trastorno gastrointestinal reduciendo los síntomas de tal trastorno. Tales trastornos gastrointestinales incluyen diarrea aguda, tal como diarrea del viajero o gastroenteritis causada por intoxicación alimentaria o gripe, enfermedad intestinal inflamatoria, trastorno del intestino irritable, diarrea asociada a antibióticos y diarrea asociada a *Clostridium difficile*. Las formas principales de la enfermedad intestinal irritable son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Los síntomas de tales trastornos gastrointestinales son bien conocidos e incluyen diarrea, dolor abdominal, pérdida de peso, inflamación del aparato digestivo y vómitos.

Por tanto, en línea con lo anterior, formas de realización de la presente solicitud se dirigen a usos tales como restablecer la ganancia de peso normal, mantener la microflora intestinal sana, reducir la diarrea, y disminuir la inflamación del aparato digestivo administrando/alimentando al ser humano una composición que comprende *Bacillus subtilis* QST713, un mutante de *Bacillus subtilis* QST713, una preparación sin células derivada de *Bacillus subtilis* QST713 o su mutante, u opcionalmente junto con metabolitos de QST713 o sus mutantes.

El mantenimiento de la microflora intestinal se refiere a disminuir (destruyendo o inhibiendo el crecimiento de) microorganismos causantes de enfermedades, perjudiciales preocupantes para salud pública o mantener niveles saludables de bacterias beneficiosas, tal como Lactobacilli y Bifidobacteria, comparados con un ser humano al que los métodos de esta invención no se han aplicado. Sin querer estar unido por ninguna teoría particular, se piensa que los aumentos para bacterias beneficiosas pueden estar causados por la estimulación del crecimiento de tales bacterias o simplemente disminuyendo selectivamente las bacterias patógenas, dando de esta manera a las bacterias beneficiosas más espacio para crecer y unirse a la pared intestinal y/o más acceso eficaz a nutrientes y factores de crecimiento. Además, o alternativamente, las bacterias beneficiosas pueden modificar los factores de virulencia de las bacterias patógenas, disminuyendo de esta manera la virulencia de las bacterias patógenas. Las bacterias perjudiciales, causantes de enfermedades, que se pueden disminuir mediante el uso de las composiciones de esta invención incluyen *Clostridia* spp. (tal como *perfringens* y *difficile*), *Listeria* spp. (tal como *monocytogenes*, *seeligeri* y *welshimeri*), *Salmonella* spp. (tal como *enterica*, *arizonae*, *typhirium*, *enmteritidis* y *bonglori*), *E. coli*, *Enterococcus* spp. (tal como *faecalis* y *faecium*), *Campylobacter*, *Aeromonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteria* y *Vibrio* spp. En algunas formas de realización, los microorganismos perjudiciales, causantes de enfermedades se pueden reducir en aproximadamente 0,5 log, aproximadamente 1 log, aproximadamente 2 log, aproximadamente 3 log, aproximadamente 4 log, o aproximadamente 5 log.

Las composiciones de la presente invención también se pueden usar para restablecer el equilibrio intestinal normal después de la administración de cantidades terapéuticas de antibióticos inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas y/o aumentando o manteniendo el crecimiento de bacterias beneficiosas. El término "cantidad terapéutica" se refiere a una cantidad suficiente para aliviar o revertir un estado de enfermedad en un ser humano.

En otro aspecto, las composiciones de la presente invención que comprenden *Bacillus subtilis* QST713, sus mutantes, preparaciones sin células de QST713 y sus mutantes y opcionalmente metabolitos de QST713 y sus mutantes pueden incluir además o ser administradas con otros probióticos, tal como otros formadores de esporas bacterianas, o con prebióticos. Se proporcionan ejemplos de probióticos en Hong, H.A., et al., "The use of bacterial spore formers as probiotics" *FEMS Microbiology Reviews* 29 (2005) 813-835. Los prebióticos son compuestos que estimulan el crecimiento y/o actividad de *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes en el intestino, tal como oligosacáridos, incluyendo inulina, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos y oligosacáridos de soja, y nucleótidos libres.

En otro aspecto, las composiciones de la presente invención pueden incluir o ser administradas con (sea al mismo tiempo o a tiempos diferentes) agentes antidiarreicos, agentes antigás, fibras alimenticias, antibióticos, tal como metotrexato, fármacos antiinflamatorios, aminoácidos, electrolitos, vitaminas y minerales.

En formas de realización en las que las composiciones comprenden QST713 o sus mutantes, las bacterias se deben administrar en una cantidad que es eficaz para mejorar la salud humana. En formas de realización en que las composiciones se administran para tratar o prevenir trastornos gastrointestinales, se deben administrar a un paciente que padece tal trastorno o en riesgo para tal trastorno a una dosis desde aproximadamente 1×10^3 UFC de *Bacillus subtilis* por kilogramo de peso corporal hasta aproximadamente 1×10^{15} UFC de *Bacillus subtilis* por kilogramo de peso corporal. En otra forma de realización se deben administrar desde aproximadamente 1×10^4 UFC de *Bacillus subtilis* por kilogramo hasta aproximadamente 1×10^{11} UFC de *Bacillus subtilis* por kilogramo. En aún otra se deben administrar desde aproximadamente 1×10^5 UFC de *Bacillus subtilis* por kilogramo hasta aproximadamente 1×10^{10} UFC de *Bacillus subtilis* por kilogramo. En aún otra se deben administrar desde aproximadamente 1×10^6 UFC de *Bacillus subtilis* por kilogramo hasta aproximadamente 1×10^9 UFC de *Bacillus subtilis* por kilogramo. En algunas formas de realización la dosis es aproximadamente 1×10^3 UFC de *Bacillus subtilis* por kilogramo de peso corporal, aproximadamente 1×10^4 o aproximadamente 1×10^5 o aproximadamente 1×10^6 o aproximadamente 1×10^7 o aproximadamente 1×10^8 o aproximadamente 1×10^9 o aproximadamente 1×10^{10} o aproximadamente 1×10^{11} o aproximadamente 1×10^{12} UFC de *Bacillus subtilis* por kilogramo. Las composiciones típicamente se administran por vía oral y a diario en las dosis anteriores durante varios días. Las composiciones se pueden administrar a más largo plazo después de que los síntomas se hayan aliviado inicialmente a una dosis menor de la que se usó inicialmente. Para fines preventivos, las composiciones se pueden administrar a diario u otro supuesto regular.

Las composiciones de la presente invención también se pueden administrar por vía oral como un fármaco en combinación con un soporte farmacéuticamente aceptable. Los niveles de dosis óptimos los pueden determinar fácilmente los expertos en la materia, evaluando, entre otras cosas, la capacidad de la composición para (i) inhibir o reducir las bacterias patógenas en el intestinos a varias dosis, (ii) aumentar o mantener los niveles de bacterias beneficiosas y/o (iii) mejorar la salud humana a varias dosis.

Los siguientes ejemplos se dan para fines puramente ilustrativos y no limitantes de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Estudios in vitro de eficacia de preparaciones sin células de QST713 contra patógenos

Se probó la actividad antimicrobiana de preparaciones sin células de QST713 contra *Clostridia* (*Clostridia perfringens* ATCC13124 y dos aislados ambientales de *Clostridia perfringens*); *Listeria* (*Listeria monocytogenes* ATCC 19116 y 19111, *Listeria seeligeri* ATCC 35968 y *Listeria welshimeri* ATCC 35897); *Salmonella* (*Salmonella enterica* ATCC 10398, *Salmonella arizonae* ATCC 13314 y *Salmonella bongori* ATCC 43975); y *E. coli*, usando técnicas de Kirby-Bauer y concentración inhibidora mínima (CIM).

Las preparaciones sin células se prepararon cultivando QST713 en medio correspondiente a medio en que se patógeno diana se cultivó, como se muestra en la tabla 1, a continuación, centrifugando el cultivo durante 15 minutos a 3000 rpm a 23 C y filtrándolo a través de una unidad de filtro de Nalgene de 0,45 μ m. Para probar la estabilidad al calor, una parte de la preparación sin células se calentó a 50°C durante una hora antes de cada prueba de Kirby-Bauer y CIM.

Tabla 2

Género	Especie/ATCC	Medio de crecimiento	Condiciones para el crecimiento
<i>Clostridia</i>	<i>perfringens</i> ATCC13124	Medio Clostridial Reforzado (Oxoid No, de cat. CM0149)	Crecimiento durante la noche en la botella AnaeroPak con 1 saquito de Anaero-indicador MGC (Remel No. Cat. 68-3001)
<i>Clostridia</i>	<i>perfringens</i> aislado ambiental	Igual que anteriormente	Igual que anteriormente
<i>Clostridia</i>	<i>perfringens</i> aislado ambiental	Igual que anteriormente	Igual que anteriormente

<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i> ATCC 19116	Caldo de infusión de cerebro y corazón	Durante la noche a 37°C
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i> ATCC 19111	Igual que anteriormente	Igual que anteriormente
<i>Listeria</i>	<i>seeligeri</i> ATCC 35968	Igual que anteriormente	Igual que anteriormente
<i>Listeria</i>	<i>welshimeri</i> ATCC 35897	Igual que anteriormente	Igual que anteriormente
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i> ATCC 10398	Caldo de tripticasa de soja	Igual que anteriormente
<i>Salmonella</i>	<i>arizonae</i> ATCC 13314	Igual que anteriormente	Igual que anteriormente
<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i> ATCC 43975	Igual que anteriormente	Igual que anteriormente

En los experimentos de Kirby-Bauer, se sumergieron discos de papel de filtro estériles de 2 mm en sobrenadante de QST713 y se secaron al aire en condiciones estériles. Estos discos se colocaron después en céspedes del patógeno diana, se incubaron durante la noche y se midieron las zonas de inhibición. Se observaron las zonas de inhibición para las dianas *Clostridia* y *Listeria*.

En la técnica CIM, se inocularon pocillos de placas de microtitulación con 75 ul de cada patógeno diana, diluido a 1×10^5 . La preparación sin células descrita anteriormente se añadió a cada pocillo a diluciones finales de 1:2, 1:10 y 1:50. Las placas se incubaron durante la noche a 37°C y DO600 y se leyó con un lector de microtitulación Wallach. La preparación sin células (tanto tratada con calor como no tratada con calor) era significativamente eficaz contra las dianas *Clostridia* y *Listeria* e inhibieron el crecimiento de *Salmonella* y *E. coli*, aunque no se observaron zonas de inhibición para estos dos últimos patógenos en las placas de Kirby-Bauer. Los datos para *Clostridia*, *Listeria* y *Salmonella* se muestran en las figuras 1-6.

Ejemplo 2 - Estudios in vitro de eficacia de QST713 contra varias bacterias

Se probó la eficacia de una formulación en polvo de *Bacillus subtilis* QST713 contra varios aislados ambientales de las siguientes bacterias: *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Samonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, y *Listeria monocytogenes*. Esta formulación en polvo se preparó fermentando *Bacillus subtilis* QST713 (de modo que hacia el final de la fermentación, según desaparecen los nutrientes, las células de *Bacillus subtilis* QST713 empiezan la transición desde la fase de crecimiento a la fase de esporulación, de modo que el producto final de la fermentación es principalmente esporas, metabolitos y medio de fermentación residual), concentrando el caldo de fermentación, y secando, como se ha descrito anteriormente en la descripción detallada de la invención. Tenía el 14,6% de caldo seco, concentrado y el 85,4% de inertes de formulación (elegidos de las posibilidades descritas anteriormente) y contenía como mínimo de aproximadamente $7,3 \times 10^9$ UFC de *Bacillus subtilis*/gramo y como máximo de aproximadamente 1×10^{10} UFC de *Bacillus subtilis*/gramo. Esta formulación se denomina en el presente documento composición 1. Se prepararon soluciones madre de la composición 1 añadiendo 0,2 gramos del polvo formulado a 1,8 ml de agua destilada estéril, de modo que la solución contenía 1×10^9 UFC de *Bacillus subtilis* por ml. Los organismos de prueba se sembraron en estrías en agar de tripticasa de soja con sangre de oveja al 5% con hasta cuatro organismos sembrados en una única placa de agar cada uno en una línea individual que bisecciona la placa de agar. Los organismos se dejaron secar durante la noche. A continuación, las placas inoculadas se sembraron en estrías con la suspensión de QST713 formulada descrita anteriormente, que se frotaron perpendiculares a los organismos de prueba. Los aislados de *Clostridium perfringens* y *Campylobacter jejuni* se incubaron en una atmósfera de gas Campy (CO₂ al 10%, O₂ al 5%, N₂ al 8%) a 41 ± 2 C durante la noche. Los otros aislados, que son aerobios, se incubaron a 36 ± 2 sin gas Campy. QST713 produjo inhibición de varios de los aislados de *Clostridium perfringens*, *Samonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, y *Listeria monocytogenes*, aunque sin inhibición de *E. coli*. Además, en algunos casos, *Bacillus subtilis* QST713 mostró crecimiento excesivo competitivo agresivo de las bacterias patógenas. Los resultados se resumen en la tabla siguiente. Las zonas de inhibición descritas en la tabla se midieron desde el extremo de crecimiento de *Bacillus* hasta el inicio del crecimiento de los organismos de prueba. Además, se muestran fotografías de las placas de *Clostridium perfringens* y *Campylobacter jejuni* en las figuras 7 y 8, respectivamente.

Tabla 3

Nombre del cultivo	ID del aislado	Atmósfera y temperatura	Zona de inhibición (mm)	Comentarios
<i>Clostridium perfringens</i>	CL-2	Gas Campy, 41°C	0	Ligera inhibición de crecimiento aunque sin zona, <i>Bacillus</i> aglomerado
	CL-3		3	
	CL-14		0	<i>Bacillus</i> aglomerado
	CL-15		0	<i>Bacillus</i> aglomerado
<i>Escherichia coli</i> O157	EC-80	Aerobio, 36°C	0	
	EC-81		0	
	EC-82		0	
<i>Samonella enteritidis</i>	SE 27	Aerobio, 36°C	0	
	SE 28		2	

	SE 29		1	
	SE 03		1	
	SE 09		1	
	SE 22		0	
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cj-1	Gas Campy, 41°C	1	<i>Bacillus</i> aglomerado
	Cj-2		0	Ligera inhibición de crecimiento aunque sin zona, <i>Bacillus</i> aglomerado
	NCj1		0	<i>Bacillus</i> aglomerado
	NCj2		1	
<i>Listeria monocytogenes</i>	LM 1	Aerobio, 36°C	2	

Ejemplo 3 - Determinación de la eficacia de Bacillus QST713 administrado por vía oral en el tratamiento de colitis inducida en ratas (un modelo para colitis en seres humanos) [Ejemplo profético]

- 5 En este experimento, se estudiará la eficacia de QST713 contra la colitis en ratas inducidas por la administración rectal de ácido 2,4,5-trinitrobenzenosulfónico (TNBS).

Diseño del estudio:

10 Se usan ratas Wistar macho a lo largo de este estudio. Al principio del periodo de tratamiento, los animales tienen de 10 a 12 semanas de edad. Tras su llegada a las instalaciones de prueba, a los animales se les hace un examen clínico completo bajo la supervisión de un veterinario para asegurar que están en buen estado. Los animales se aclimatan a las condiciones del estudio durante un periodo de al menos 7 días. Los animales se distribuyen al azar y reparten en jaulas de policarbonato (longitud 421 X anchura 290 X altura 190 mm). Las condiciones del animalario y sala de prueba se fijan como sigue: temperatura: 22 ± 3 grados C, humedad relativa: 50 ± 20%, ciclo luz/oscuridad: 12h/12h (luz 07.00 AM - 19.00 PM) y ventilación: aproximadamente 7 ciclos/hora de aire filtrado, no reciclado. Todos los animales tienen acceso libre (excepto durante el ayuno de la noche antes de la administración de TNBS) a pienso en pellas de rata y agua purificada a voluntad.

20 En ensayos replicados el día de la inducción de colitis se ajusta como día 1. La colitis se induce, después de un ayuno durante la noche, usando una administración intrarrectal única de TNBS a 100 mg/kg de peso corporal, 8 cm proximal al ano. A los grupos de control negativos para colitis se les da solución salina por vía intrarrectal (0,5 ml por animal una vez) el día 1. A los grupos controles negativos para colitis y positivos para colitis se les da agua destilada por vía oral a 10 ml/kg, 3 veces al día con 4 h entre las dosis, empezando el día 1 y hasta e incluyendo el día 7.

25 En los ensayos replicados, los grupos con colitis inducida por TNBS se tratan con QST 713 (1,5 X 10E8 UFC/kg o 1,5 X 10E9 UFC/kg, respectivamente) 3 veces al día con 4 h entre dosis, empezando el día 1 y hasta e incluyendo el día 7; con mesalacina (250 mg/kg/día), empezando el día 1 y hasta e incluyendo el día 7; con infliximab (3 mg/kg) como una única dosis el día 1 o con *S. boulardii* (1,5 X 10E8 UFC/kg), 3 veces al día con 4 h entre dosis, empezando el día 1 y hasta e incluyendo el día 7.

35 La primera o única (en el caso de infliximab) dosis de tratamiento se da a las 2 horas (agua destilada, QST 713, *S. boulardii* y mesalacina) o 3 horas (infiximab) después de la administración de TNBS. Excepto para infliximab, que se inyectó por vía intravenosa, todos los tratamientos se administran por sonda nasogástrica. Dos veces al día se hacen observaciones para signos clínicos y mortalidad. Se registran los pesos corporales de los animales los días 1, 4 y 7. El día 8 los animales se sacrifican y se corta un segmento de 5 cm de longitud del colon (de 10 a 5 cm proximal al ano). Estos segmentos se abren longitudinalmente. Los contenidos se eliminan por lavado con solución salina y la morfología macroscópica se puntúa usando la siguiente escala: 0 = sin úlceras o inflamación, 1 = sin úlceras solo hiperemia local, 2 = ulceración sin hiperemia, 3 = ulceración e inflamación en un sitio solo, 4 = dos o más sitios de ulceración e inflamación, y 5 = ulceración que se extiende más de 2 cm. También se registra el peso de cada segmento colónico de 5 cm para evaluar edema inflamatorio inducido.

Preparaciones de prueba

45 El TNBS al 5% en agua (Sigma-Aldrich, St Louis, EE UU) se diluye a una solución al 2,5% con etanol al 50%. El volumen de dosis es 4 ml/kg de peso corporal. El caldo de fermentación de QST 713 (AgraQuest Inc. Davis CA EE UU) secado en un soporte de malto- y ciclodextrina, se resuspende en agua destilada a concentraciones de 1,5 X 10E7 y 1,5 X 10E8 UFC/ml. El volumen de dosis es 10 ml/kg de peso corporal. *Saccharomyces boulardii* (Enterol.RTM, Biodiphar, Bruselas, Bélgica) se resuspende en agua destilada hasta una concentración de 1,5 X 10E7 UFC/ml. El volumen de dosis es 10 ml/kg de peso corporal. Los comprimidos de mesalacina (Mesacol.RTN, Sun Pharmaceutical Ind. Ltd, Mumbai, India) se pulverizan usando mano y mortero y se prepara una solución en agua destilada que contiene 25 mg de ácido 5-aminosalicílico por ml. El volumen de dosis es 10 ml/kg de peso corporal. Remicade RTM (infiximab) (Centocor B. V., Leiden, los Países Bajos) se reconstituye primero con 10 ml de

agua para inyección y se diluye adicionalmente a una concentración de 2 mg/ml usando solución salina. El volumen de dosis empleado es 1,5 ml/kg de peso corporal. Todas las dosis dependientes de peso corporal se administran según el último peso corporal individual tomado. Se hacen preparaciones frescas antes de cada administración. Las preparaciones se agitan vigorosamente antes de cada dosis.

5

Resultados esperados y discusión:

Algunos animales muestran signos leves de diarrea después de la inducción de colitis con TNBS. Se registra el número de observaciones de diarrea registradas (y el número de animales afectados) en los diferentes grupos de tratamiento desde el día 1 hasta e incluyendo el día 7. Los grupos control positivos para colitis muestran sustancial pérdida de peso corporal acompañando la colitis. Mientras que los tratamientos suprimen todos significativamente el efecto negativo de la colitis sobre la ganancia de peso corporal, se espera que el tratamiento con QST 713 muestre reducciones estadísticamente significativas en diarrea y ganancia de peso mejorada. Se espera que QST 713 y mesalacina siempre produzcan un peso del segmento de colon y una puntuación de morfología macroscópica para la pared del colon que se podría distinguir claramente de los del grupo control positivo para colitis.

Se espera que el estado de salud de la pared del colon en ratas con colitis inducida por TNBS y tratadas con QST 713 y Mesacol sea macroscópicamente el mismo que en ratas sin colitis. Los exámenes visuales de los segmentos de colon abiertos longitudinalmente se espera que muestren las ulceraciones y áreas de tejido necrótico presentes en el control positivo, los grupos de tratamiento con *S. boulardii* e infliximab y la ausencia de las mismas en los grupos de QST 713 y el grupo de mesalacina. Al final del periodo de tratamiento los datos de la ganancia de peso corporal media y peso del segmento de colon de ratas tratadas con infliximab son intermedios a los de los grupos controles negativos para colitis y positivos para colitis en ambos ensayos. En los segmentos de colon de ratas tratadas con QST 713 se espera que no haya ulceraciones, y solo se observa hiperemia en la mayoría de estos segmentos. Se espera que QST 713 atenúe claramente la inflamación en la pared de colon de rata inducido por la administración intrarrectal de TNBS y, al menos respecto a la mayor tasa de dosis, a un grado que los datos de este tratamiento no se puedan percibir estadísticamente de los del grupo control negativo para colitis.

Conclusión

Este estudio se diseñará y realizará para confirmar y documentar la eficacia de Bacillus 'QST 713' contra la colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS) en ratas así como para comparar su eficacia con la de *S. boulardii* (probiótico), mesalacina e infliximab (fármacos estándar). Este modelo de rata está bien establecido, es fiable y se usa ampliamente para examinar la eficacia de fármacos destinados a tratar EII. Sin ningún tratamiento después de la inducción de colitis varias ratas probablemente mostrarán signos leves de diarrea y de media seguirán perdiendo peso a lo largo del periodo de ensayo restante. La morfología macroscópica de la pared intestinal de su colon probablemente se caracterizará por inflamación, ulceración e incluso necrosis. Se espera que el tratamiento secuencial con tres dosis de QST 713 a $1,5 \times 10^8$ UFC/kg/día o 3 veces $1,5 \times 10^9$ UFC/kg/día producirá un estado saludable de la pared del colon que sea estadísticamente idéntico al del grupo control negativo y al del grupo tratado con el fármaco estándar mesalacina, un antiinflamatorio.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende *Bacillus subtilis* QST713 (número de acceso de NRRL B21661) o un mutante de *Bacillus subtilis* QST713 que tiene todas las características identificadoras de *Bacillus subtilis* QST713 para su uso en mejorar la salud de un ser humano, la mejora de la salud comprende administrar al ser humano una cantidad eficaz de la composición, y en donde la composición se administra al ser humano en una cantidad eficaz para tratar un trastorno gastrointestinal, en donde el trastorno gastrointestinal se selecciona del grupo que consiste en diarrea aguda, infección asociada a *Clostridium difficile*, enfermedad intestinal inflamatoria, trastorno del intestino irritable, y diarrea asociada a antibióticos.
- 10 2. Una composición que comprende *Bacillus subtilis* QST713 (número de acceso de NRRL B21661) o un mutante de *Bacillus subtilis* QST713 que tiene todas las características identificadoras de *Bacillus subtilis* QST713 para su uso en mejorar la salud de un ser humano, la mejora de la salud comprende administrar al ser humano una cantidad eficaz de la composición, y en donde la composición se administra al ser humano en una cantidad eficaz para prevenir un trastorno gastrointestinal, en donde el trastorno gastrointestinal se selecciona del grupo que consiste en diarrea aguda, enfermedad intestinal inflamatoria, trastorno del intestino irritable, y diarrea asociada a antibióticos.
- 15 3. La composición para uso de la reivindicación 1 o 2 en donde la composición comprende *Bacillus subtilis* QST713.
- 20 4. La composición para uso de la reivindicación 3 en donde la composición comprende además metabolitos producidos por el *Bacillus subtilis* QST713.
- 25 5. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4 en donde al menos un síntoma del trastorno gastrointestinal se reduce o alivia.
- 30 6. La composición para uso de la reivindicación 5 en donde el síntoma es diarrea, cólicos o inflamación del aparato digestivo.
- 35 7. La composición para uso de la reivindicación 1 en donde la composición se administra en una cantidad eficaz para disminuir el crecimiento de bacterias patógenas en el ser humano, en donde la bacteria patógena se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en *Clostridia* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria* spp., y *E. coli*.
- 40 8. La composición para uso de la reivindicación 1 o 2 en donde la composición comprende además un soporte.
- 45 9. La composición para uso de la reivindicación 1 o 2 en donde la composición se administra con otros probióticos, en donde el otro probiótico es preferiblemente *Saccharomyces boulardii*.
- 50 10. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la composición se administra con un fármaco usado para prevenir o tratar trastornos gastrointestinales.
- 55 11. La composición para uso de la reivindicación 10 en donde el fármaco es un antibiótico o un antiinflamatorio, en donde la composición se administra preferiblemente después de terminar la administración del antibiótico.
- 60 12. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la composición se administra por vía oral a una tasa desde aproximadamente 1×10^4 UFC de *Bacillus subtilis* QST713 por kilogramo al día hasta aproximadamente 1×10^{12} UFC de *Bacillus subtilis* QST713 por kilogramo al día durante de aproximadamente tres hasta aproximadamente siete días.
13. Una composición que comprende (i) *Bacillus subtilis* QST713 o un mutante de *Bacillus subtilis* QST713 que tiene todas las características identificadoras de *Bacillus subtilis* QST713 en una cantidad que es eficaz para reducir al menos un síntoma de un trastorno gastrointestinal y (ii) alimentos humanos o una bebida diferente de agua.
14. La composición de la reivindicación 13, en donde la cantidad eficaz de *Bacillus subtilis* QST713 o dicho mutante de *Bacillus subtilis* QST713 es desde aproximadamente 1×10^3 UFC/g de alimento hasta aproximadamente 1×10^{10} UFC/g de alimento.

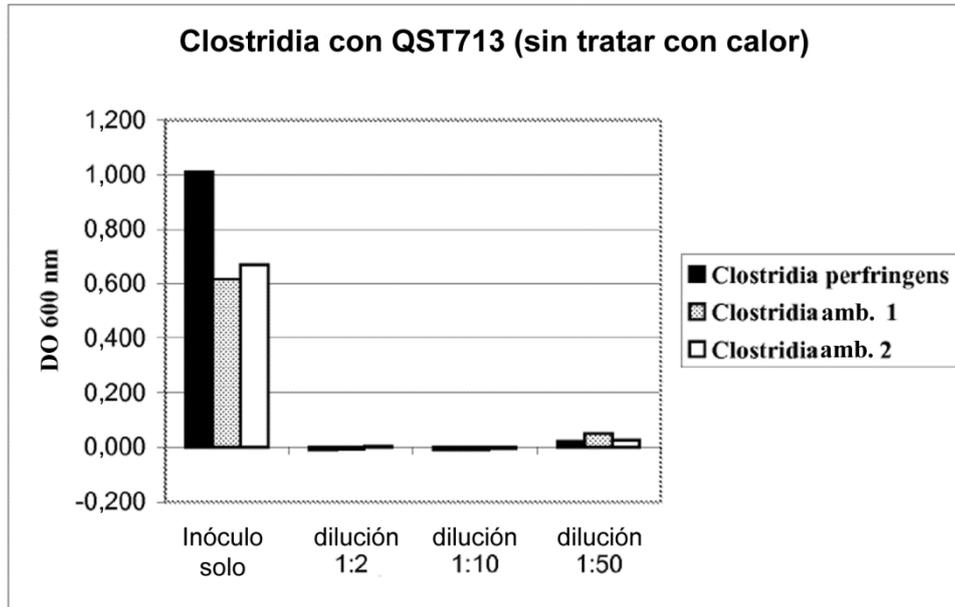


FIGURA 1

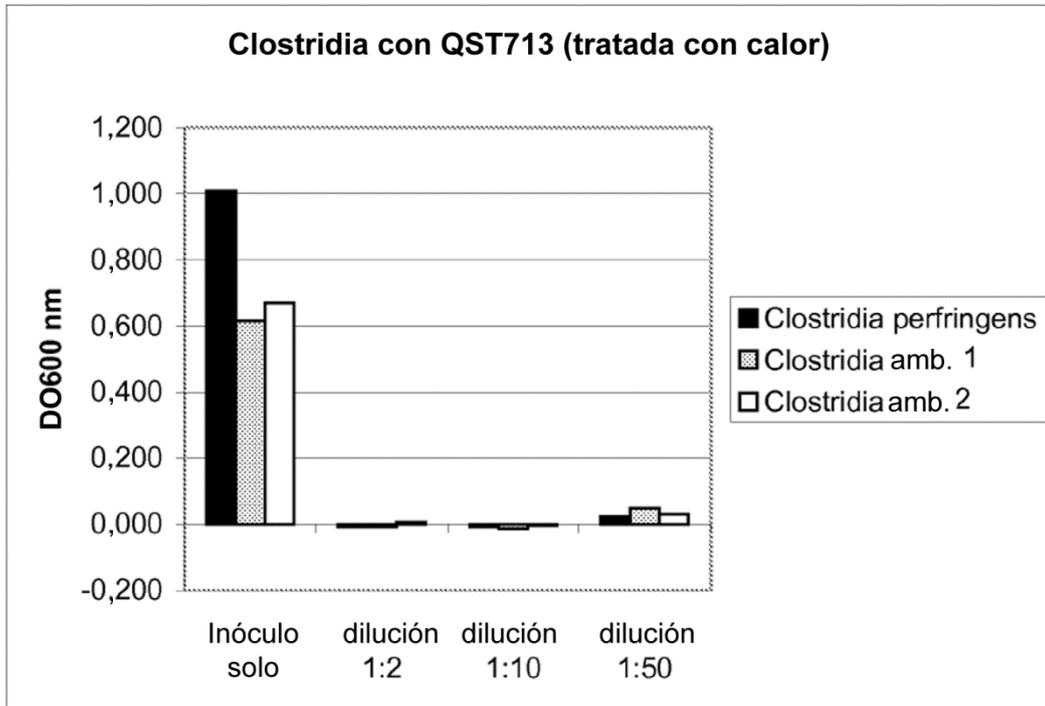


FIGURA 2

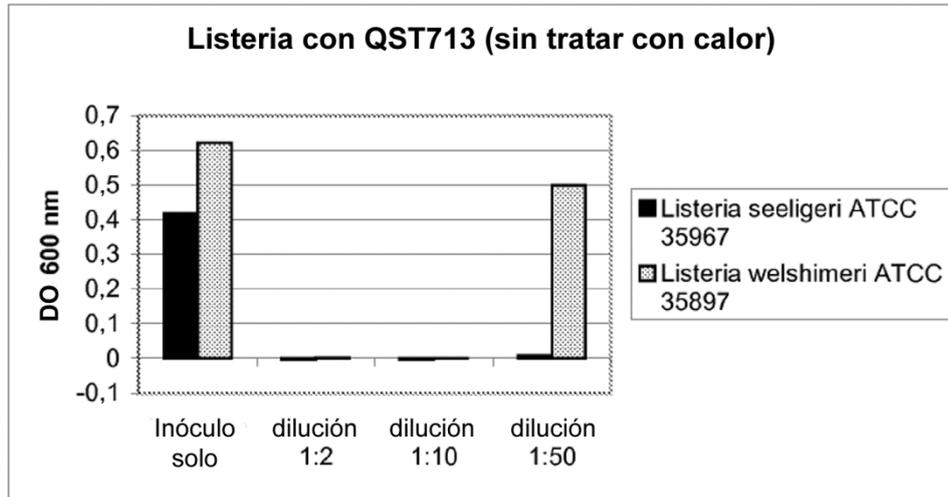


FIGURA 3

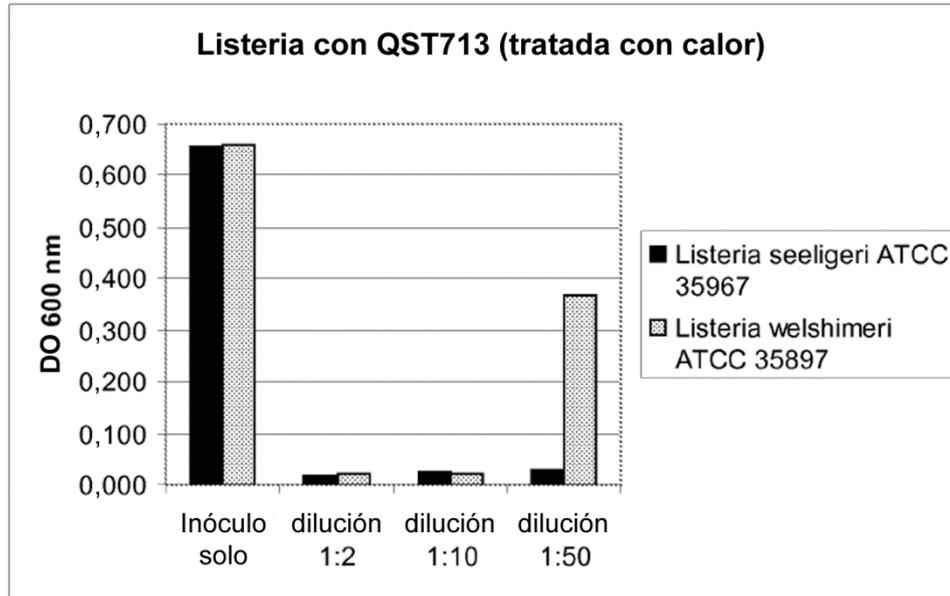


FIGURA 4

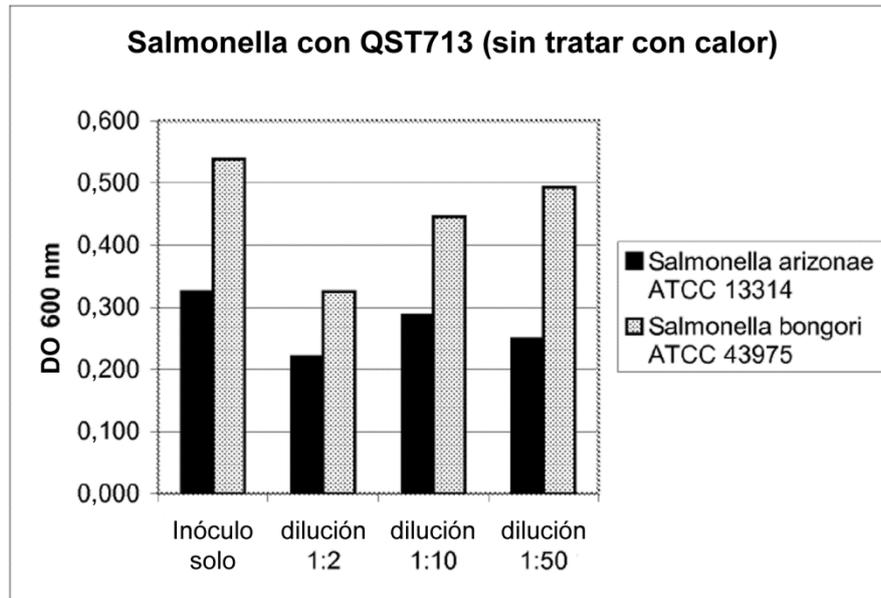


FIGURA 5

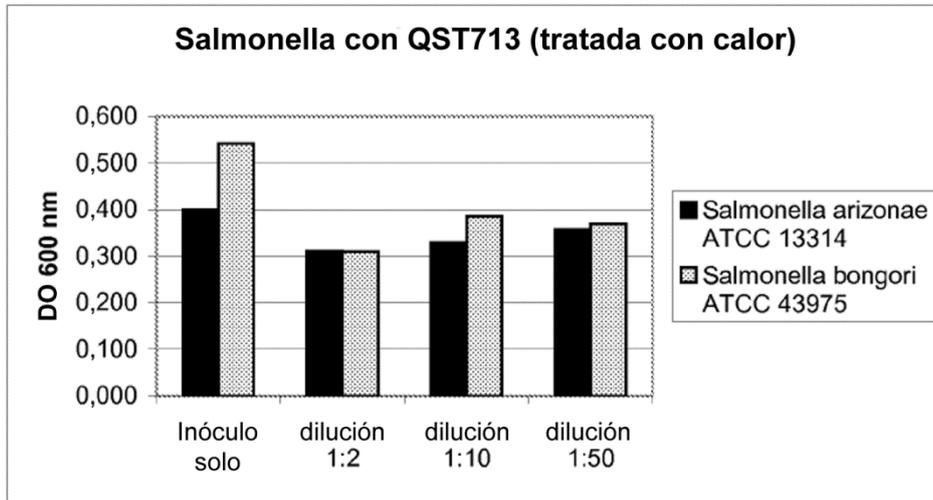


FIGURA 6

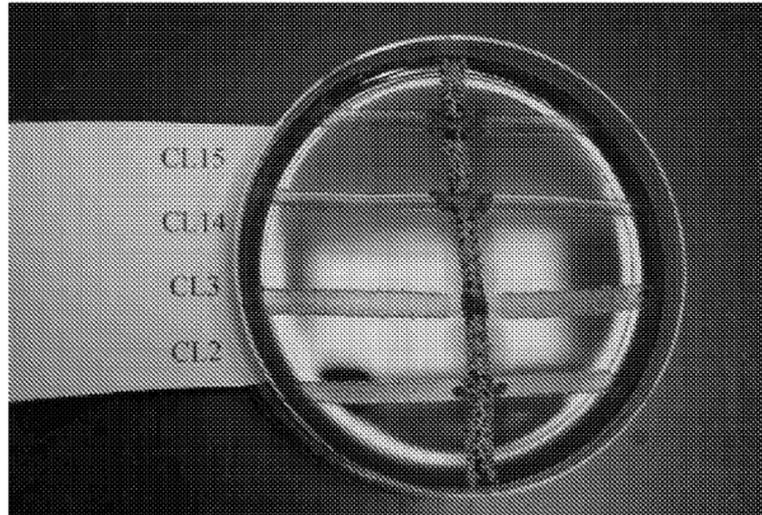


FIGURA 7

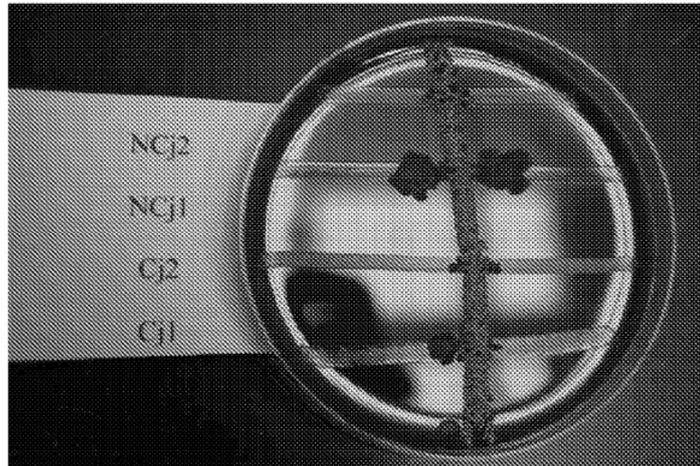


FIGURA 8