

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-041787-00000-0000

Fecha: 2011-04-05 15:01:11 Dep: 2020-DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASE NACIONAL I
Act. 411 PRESENTACION Folios: 55

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

Q-2

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

11-41787

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: MÉTODO DE USO DE UNA CEPA DE BACILLUS SUBTILIS PARA MEJORAR LA SALUD DE ANIMALES.

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL A23K 1/00

71. SOLICITANTE: AGRAQUEST, INC.

DOMICILIO: California, Estados Unidos de América.

74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.

Rodríguez, Dilia
17-04-2011



No. 11-041787- -00000-0000

Fecha: 2011-04-05 15:01:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 55

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

SOLICITUD DE REGISTRO DE:

1

☒ Patente de Invención

☐ Patente Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I

☐ Capítulo II

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: AGRAQUEST, INC.
Dirección: 1540 Drew Avenue, Davis,
California 95618, Estados Unidos de América
Nacionalidad o domicilio: California, Estados
Unidos de América.
Lugar de Constitución: California, Estados
Unidos de América.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN
Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6
Teléfono: 6 181088 **Fax:** 6350824
E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 41.654.882
TP 20824 CSJ

4

**INVENTOR(ES)
(72)**

Nombre: VER HOJA ANEXA
Dirección:
Nacionalidad o domicilio:

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2009/057335 Fecha 17 de septiembre de 2009.

Publicación Internacional No. WO 2010/033714 A1 Fecha 25 de marzo de 2010

**Título (54) MÉTODO DE USO DE UNA CEPA DE BACILLUS SUBTILIS PARA
MEJORAR LA SALUD DE ANIMALES.**

6 Clasificación Internacional (51) A23K 1/00

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

(32) Fecha

17 de septiembre de 2008

(31) Número de Solicitud

61/192,436

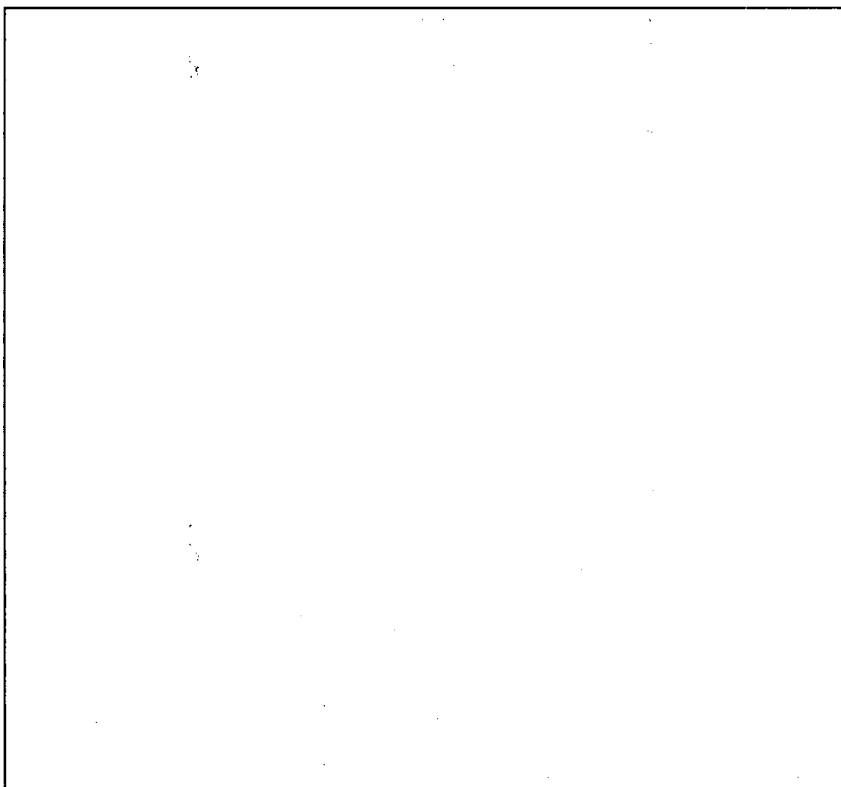
Comprobante de pago No. 11-19925 // 1120005// 11-20006// 11-20075// 11-12710
Fecha 04 de marzo de 2011.

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuese el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de examen preliminar (IPER)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las Comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo Titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐

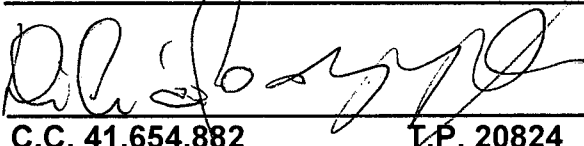
11 FIGURA CARACTERISTICA



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:


C.C. 41.654.882 T.P. 20824

ANEXO
INVENTORES

1.) SCHMIDT, Joseph, Earl

(44538 Country Club Drive, El Macero, California 95618, Estados Unidos de América);

2.) JIMENEZ, Desmond, Rito

(216 Toyon Drive, Woodland, California 95695, Estados Unidos de América).

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0019925

Bogotá D.C., Marzo 04 de 2011 - 07:31:39

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	420743002	03/03/2011	100.545.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
			\$571.000.00

=====

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-041787- -00000-0000

Fecha: 2011-04-05 15:01:11

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 55

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 4 de 2011 - 07:32:04

P-2852

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0020005

Bogotá D.C., Marzo 04 de 2011 - 07:31:39

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	420743002	03/03/2011	100.545.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	200.000.00	200.000.00
				\$200.000.00
=====				

SON: **DOSCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-041787- -00000-0000

Fecha: 2011-04-05 15:01:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 55

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 4 de 2011 - 07:32:06

p-2852

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0020006

Bogotá D.C., Marzo 04 de 2011 - 07:31:39

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	420743002	03/03/2011	100.545.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	200.000.00	200.000.00
				\$200.000.00
			=====	

SON: **DOSCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-041787- -00000-0000

Fecha: 2011-04-05 15:01:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 55

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 4 de 2011 - 07:32:06

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0020075

Bogotá D.C., Marzo 04 de 2011 - 07:31:39

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	420743002	03/03/2011	100.545.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMITE	27.000.00	27.000.00
				\$27.000.00

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-041787- -00000-0000

Fecha: 2011-04-05 15:01:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 55

5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 4 de 2011 - 07:32:08

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0012710

Bogotá D.C., Febrero 11 de 2011 - 09:29:38

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411707774	09/02/2011	80.855.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#0 ANTERIOR	5.000.00	5.000.00
				\$5.000.00
			=====	

SON: **CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-041787- -00000-0000

Fecha: 2011-04-05 15:01:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 55

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Febrero 11 de 2011 - 09:45:45

6

MÉTODO DE USO DE UNA CEPA DE *BACILLUS SUBTILIS* PARA MEJORAR LA SALUD DE ANIMALES

RESUMEN

Método para mejorar la salud de un animal que comprende administrarle al animal una composición que comprende *Bacillus subtilis* QST 713 o un mutante del mismo.

MÉTODO DE USO DE UNA CEPA DE *BACILLUS SUBTILIS* PARA MEJORAR LA SALUD DE ANIMALES

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta presente solicitud invoca prioridad a la Solicitud de Provisional de los EE.UU. Nro. 61/192.436, presentada el 17 de Septiembre del 2008, de acuerdo con 35 U.S.C. Sección 119(e). La siguiente solicitud se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el campo de los probióticos y su capacidad para mejorar la salud de animales o la condición física general de los animales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El género *Bacillus* comprende numerosas bacterias formadoras de endosporas que tienen un gran número de usos en los campos agrícola y de nutrición de animales, entre otros. Actualmente se comercializan muchas cepas de *Bacillus* para el uso como probióticos en la alimentación animal como una alternativa a los antibióticos. Estos probióticos mejoran la salud animal, que incluye el crecimiento animal mejorado y la eficacia de la alimentación, por modulación de la flora gastrointestinal. El uso de dichos probióticos ha aumentado debido a la preocupación sobre los residuos de antibióticos en los productos animales para el consumo humano y el desarrollo de resistencia a antibióticos. En los últimos años se ha realizado trabajo para tamizar las bacterias formadoras de esporas para el uso como probióticos. A pesar de que muchos productos comerciales contienen cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, y *Bacillus coagulans*, dichos tamizajes ponen en evidencia que no todas las cepas de *Bacillus* son eficaces como aditivos alimentarios.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención provee una cepa de *Bacillus subtilis* que, cuando se administra a un animal, mejora la salud de dicho. Específicamente, la presente invención se relaciona con métodos para mejorar la salud de animales no insectos y no humanos o para mejorar la condición física general de dichos animales por alimentación de dichos animales con, mediante pienso o agua de beber (y no

alimentación por sonda), composiciones que comprenden (i) *Bacillus subtilis* QST 713, (ii) un mutante de (i), una preparación libre de células de (i) ó (ii), o un metabolito de (i) ó (ii). En una forma de realización, la composición de la presente invención comprende *Bacillus subtilis* 713 o mutantes de los mismos y metabolitos producidos por las bacterias. En otra forma de realización, la composición comprende *Bacillus subtilis* QST713 principalmente en su forma de espora.

En algunas formas de realización de la presente invención, las composiciones se administran a animales en la alimentación durante muchos días a lo largo de la vida del animal o durante etapas particulares o porciones de la vida del animal. Por ejemplo, en algunas formas de realización las composiciones se administran sólo en una dieta de inicio o sólo en una dieta de terminación de animales de granja.

Los métodos de la presente invención se pueden usar para aumentar la ganancia de peso de un animal, para aumentar la eficacia de utilización de la alimentación, para reducir la morbilidad, para aumentar la resistencia a enfermedades, para aumentar la tasa de supervivencia, para aumentar la respuesta inmune del animal y para mantener saludable la microflora intestinal. En una forma de realización, los métodos de esta invención se usan para asistir con el restablecimiento de un balance saludable de la microflora intestinal luego de la administración de un uso de antibióticos con propósitos terapéuticos.

En una forma de realización, la composición de la presente invención comprende *Bacillus subtilis* QST713 o mutantes de los mismos y se administra a un animal con una relación de aproximadamente 1×10^3 UFC/g de pienso o ml de agua de beber, o aproximadamente 1×10^4 UFC/g de pienso o ml agua de beber o aproximadamente 1×10^5 UFC/g de pienso o ml agua de beber, o aproximadamente 1×10^6 UFC/g de pienso o ml agua de beber, o aproximadamente 1×10^7 UFC/g de pienso o ml agua de beber, o aproximadamente 1×10^8 UFC/g de pienso o ml agua de beber, o aproximadamente 1×10^9 UFC/g de pienso o ml agua de beber, o aproximadamente 1×10^{10} UFC/g de pienso o ml agua de beber, o aproximadamente 1×10^{11} UFC/g de pienso o ml agua de beber.

9

En otra forma de realización, las composiciones de la presente invención se administran o se dan de comer a un animal en una cantidad eficaz para disminuir el crecimiento de bacterias patógenas en el intestino del animal. Dichas bacterias patógenas incluyen *Clostridia*, *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, y *Vibrio*. En relación, los métodos de la presente invención se pueden usar para disminuir la cantidad de bacterias patógenas eliminadas junto con las heces de los animales. Los métodos de la presente invención también se pueden usar para mantener o aumentar el crecimiento de bacterias beneficiosas, tal como bacterias acidolácticas, en el intestino animal. Por disminución de las bacterias patógenas y/o aumento o conservación de las bacterias beneficiosas, las composiciones de la presente invención tienen la capacidad de mantener una microflora intestinal en conjunto saludable.

Los métodos de la presente invención se pueden usar para todos los animales no humanos y no insectos. Los animales que se pueden ver beneficiados con los métodos de la presente invención incluyen a modo de ejemplo ilustrativo a pájaros, cerdos, rumiantes, mascotas y animales exóticos, animales de zoológico, animales acuáticos, y caballos, entre otros. En una forma de realización, los animales son animales de granja, que son criados para el consumo o como productores de alimento, tales como pollos parrilleros y gallinas productoras de huevos. Esta invención también provee composiciones que son adaptadas para mejorar la salud de animales o mejorar la condición física del animal. Por lo tanto, las composiciones de la presente invención pueden incluir *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes, preparaciones libres de células de los mismos o metabolitos de los mismos y vehículos que hagan adecuadas a estas composiciones para la alimentación de animales como un aditivo del pienso o como un aditivo para el agua de beber. Alternativamente, el *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes, preparaciones libres de células de los mismos o metabolitos de los mismos se pueden formular con ingredientes de pienso animal, incluyendo proteína de pienso y/o carbohidratos de pienso. Dichas combinaciones pueden estar en la forma de pellets que se extruden por medio de procesos estándares de peleteo.

Las composiciones de la presente invención también comprenden combinaciones de *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes, preparaciones libres de células de QST713 o sus mutantes y metabolitos de QST713 y sus mutantes con otros probióticos y/o con prebióticos.

La presente invención también abarca un método para la preparación de pienso para animales que contiene un microbio como alimento directo que comprende el agregado de esporas de *Bacillus subtilis* QST713 en una cantidad eficaz para mejorar la salud de animales con la alimentación de animales a componentes estándares de pienso, tales como carbohidratos y proteínas, antes del procesos de peleteo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra resultados de un ensayo de eficacia de una preparación libre de células de *Bacillus subtilis* QST713 contra diferentes aislados de *Clostridia*.

La Figura 2 representa resultados de un ensayo de eficacia de una preparación tratada con calor libre de células de *Bacillus subtilis* QST713 contra diferentes aislados de *Clostridia*.

La Figura 3 muestra resultados de un ensayo de eficacia de una preparación libre de células de *Bacillus subtilis* QST713 contra diferentes aislados de *Listeria*.

La Figura 4 representa resultados de un ensayo de eficacia de una preparación tratada con calor libre de células de *Bacillus subtilis* QST713 contra diferentes aislados de *Listeria*.

La Figura 5 muestra resultados de un ensayo de eficacia de una preparación libre de células de *Bacillus subtilis* QST713 contra diferentes aislados de *Salmonella*.

La Figura 6 representa resultados de un ensayo de eficacia de una preparación tratada con calor libre de células de *Bacillus subtilis* QST713 contra diferentes aislados de *Salmonella*.

La Figura 7 muestra placas de agar en las cuales se entrecruzaron líneas de siembra de *Bacillus subtilis* QST713 (vertical) y diferentes aislados de

Clostridium perfringens (horizontal) con el objetivo de ensayar la eficacia de QST713 contra los patógenos.

La Figura 8 muestra placas de agar en las cuales se entrecruzaron líneas de siembra de *Bacillus subtilis* QST713 (vertical) y diferentes aislados de *Campylobacter jejuni* (horizontal) con el objetivo de ensayar la eficacia de QST713 contra los patógenos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente, incluyendo cualquiera de los dibujos y apéndices, se incorporan a la presente documentación a modo de referencia con la misma extensión que si cada publicación o solicitud de patente individual fuera específicamente e individualmente indicada de ser incorporada a modo de referencia.

La siguiente descripción incluye información que puede ser útil para entender la presente invención. No es una aceptación que cualquier información provista en la presente documentación sea arte previo o relevante a las invenciones aquí invocadas, o que cualquier publicación específicamente o implícitamente referenciada es arte previo.

La presente invención se relaciona con un nuevo uso de la cepa QST 713 de *Bacillus subtilis* y/o sus metabolitos que son eficaces para mejorar la salud de animales como un probiótico. Los probióticos se usan en aplicaciones de salud de animales con el objetivo de mantener una microflora intestinal saludable, incluyendo una reducción de las bacterias perjudiciales tales como *Clostridia* y *Campylobacter* y un aumento en las bacterias beneficiosas tales como *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium*. Los probióticos son adecuados para mantener un balance saludable entre las bacterias patógenas y beneficiosas porque, a diferencia de los antibióticos, no destruyen las bacterias indiscriminadamente ni conducen a cepas con resistencia a antibióticos de bacterias patógenas. Hay muchos mecanismos por los cuales se piensa que los probióticos mantienen saludable la microflora intestinal: exclusión competitiva de bacterias patógenas, reducción de bacterias patógenas por medio de la producción de sustancias antimicrobianas, mejorando el crecimiento y viabilidad

de la microflora intestinal beneficiosa, y estimulando la respuesta inmune sistémica en el animal.

La presente invención abarca un método para mejorar la salud de animales por administración a un animal de una composición que comprende (i) *Bacillus subtilis* QST713, (ii) mutantes de *Bacillus subtilis* QST713, (iii) preparaciones libres de células de (i) ó (ii), ó (iv) metabolitos de (i) ó (ii).

En las Patentes de los EE.UU. Nos. 6.060.051, 6.103.228, 6.291.426, 6.417.163, y 6.638.910 se describe por completo a *Bacillus subtilis* QST713, sus mutantes, sus sobrenadantes, y sus metabolitos lipopeptídicos, y métodos para su uso en el control de patógenos de plantas e insectos. En estas patentes, la cepa se refiere como AQ713. *Bacillus subtilis* QST713 ha sido incorporada en el NRRL el 7 de Mayo de 1997 bajo las provisiones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con el Propósito de Procedimiento de Patentes bajo el Número de Acceso B21661. Cualquier referencia en esta memoria descriptiva a QST713 se refiere a *Bacillus subtilis* QST713.

La cepa QST713 de *Bacillus subtilis* tiene ciertas propiedades, las cuales, sorprendentemente, se ha encontrado que hacen a la cepa adecuada para mejorar la salud de animales. Las esporas de QST713 son viables a bajos pHs y las células de QST713 crecen (dadas ciertas condiciones propicias de nutrientes) a pHs tan bajos como 4,5. Adicionalmente, como se describe en los Ejemplos 8 y 4, respectivamente, más adelante, QST713 tiene la capacidad de crecer en condiciones de alta sal durante al menos diez días y puede sobrevivir las altas temperaturas necesarias para peletear el pienso para animales. QST713 también tiene la capacidad de agregarse, o aglomerarse, como se muestra en el Ejemplo 2, de este modo superando y reduciendo las bacterias patogénicas. Sin el deseo de estar ligado por cualquier teoría en particular, se cree que *Bacillus subtilis* QST713 mejora la salud de animales por medio de un modo de acción multifacético, incluyendo la producción de metabolitos antibacterianos y competición con patógenos usando más nutrientes y espacios de unión que los patógenos, previniendo de este modo el establecimiento eficaz de bacterias patógenas en el intestino.

En un aspecto de la invención, las composiciones administradas a los animales comprenden mutantes de *Bacillus subtilis* QST713 que tienen todas las características identificativas de QST713. Dichos mutantes pueden tener una identidad de secuencia de ADN con QST713 de al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 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. Dichos mutantes espontáneos se pueden obtener por métodos clásicos, tal como el crecimiento de la cepa *Bacillus subtilis* en presencia de cierto antibiótico para el cual el pariente es susceptible y ensayar la actividad biológica mejorada para cualquier mutante resistente o, en esta solicitud, la capacidad mejorada para mejorar uno o más de los indicios de salud de animales descritos más adelante. Otros métodos para identificar mutantes espontáneos serán conocidos por aquellos con experiencia común en el arte.

Todas las referencias a *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes en esta solicitud se refieren a bacterias que han sido aisladas de la naturaleza y que son hechas crecer por humanos, por ejemplo, en el laboratorio o bajo condiciones industriales.

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 están en crecimiento), como células en estado de transición (que están en transición entre la fase de crecimiento y fase de esporulación) o como una combinación de todos estos tipos de células. En algunas formas de realización, la composición comprende principalmente esporas.

Los metabolitos de QST713 o sus mutantes incluyen lipopéptidos, tal como iturinas, surfactinas, plipastatinas, y agrastatinas y otros compuestos con propiedades antibacterianas. Los metabolitos lipopeptídicos de QST713 se describen con detalle en las Patentes de los EE.UU. Nos. 6.291.426 y 6.638.910.

Las composiciones de la presente invención se pueden obtener por cultivo de *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes de acuerdo a métodos bien conocidos en el arte, que incluyen el uso de medios y otros métodos descritos en la Patente

14

de los EE.UU. No. 6.060.051. Los procesos convencionales de cultivo microbiano a gran escala incluyen fermentación sumergida, fermentación en estado sólido, o cultivo en superficie líquida. Hacia el final de la fermentación, a medida que los nutrientes se agotan, las células de *Bacillus subtilis* QST713 comienzan la transición entre la fase de crecimiento y la fase de esporulación, de modo que el producto final de fermentación es mayormente esporas, metabolitos y medio de fermentación residual. La esporulación es parte del ciclo de vida natural de este *Bacillus subtilis* y generalmente es iniciado por la célula en respuesta a la limitación de nutrientes. La fermentación se configura para obtener altos niveles de unidades formadoras de colonias de *Bacillus subtilis* QST713 y para promover la esporulación. Las células bacterianas, esporas y metabolitos en el medio de cultivo que resultan de la fermentación se pueden usar directamente o concentradas por métodos industriales convencionales, tal como centrifugación, filtración de flujo tangencial, filtración profunda, y evaporación. En algunas formas de realización, el medio de fermentación concentrado se lava, por ejemplo a través de un proceso de diafiltración, para eliminar el medio de fermentación residual y metabolitos.

El medio de fermentación o concentrado de medio se puede secar con o sin el agregado de vehículos usando procesos de secado convencionales o métodos tales como secado por aspersión, secado por congelamiento, secado en bandeja, secado por lecho fluidizado, secado en tambor, o evaporación. Los productos de secado resultantes se pueden procesar adicionalmente, tal como por molienda o granulación, para obtener un tamaño de partícula específico o formato físico. También se pueden agregar vehículos, descritos más adelante, luego del secado.

Las preparaciones libres de células de medio de fermentación de QST713 se pueden obtener por cualquier medio conocido en el arte, tal como extracción, centrifugación y/o filtración del medio de fermentación. Aquellos con experiencia en el arte apreciarán que las llamadas preparaciones libres de células pueden no ser carentes de células sino que mayormente libres de células o esencialmente libres de células, dependiendo de la técnica usada (por ejemplo, velocidad de centrifugación) para eliminar las células. La preparación libre de células resultante se puede secar y/o formular con componentes que ayudan en su administración a

animales. Los métodos de concentración y técnicas de secado descritas anteriormente para el medio de fermentación también son aplicables a las preparaciones libres de células.

Los metabolitos de QST713 se pueden obtener de acuerdo a los métodos descritos en la Patente de los EE.UU. No. 6.060.051. El término "metabolitos" tal como se usa en la presente documentación se puede referir como un metabolitos semipuros y puros o esencialmente puros, o a metabolitos que no han sido separados de *Bacillus subtilis* QST713. Los lipopéptidos y otros metabolitos bactericidas de QST713 tienen entre 600 kilodaltons y 100 daltons. Por lo tanto, en algunas formas de realización, luego de que se hace una preparación libre de células por centrifugación del medio de fermentación de QST713, los metabolitos se pueden purificar por filtración de exclusión molecular que agrupa los metabolitos en diferentes fracciones en base al corte de peso molecular, tal como pesos moleculares menores de 600 kDa, menores de 500 kDa, menores de 400 kDa y así sucesivamente. Los métodos de concentración y técnicas de secado descritas anteriormente para la formulación de medio de fermentación también son aplicables a metabolitos.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir vehículos, que son ingredientes de formulación inertes agregados a composiciones que comprenden células, preparaciones libres de células o metabolitos para mejorar la recuperación, eficacia, o propiedades físicas y/o para ayudar en el empaquetado y administración. Dichos vehículos se pueden agregar individualmente o combinados. En algunas formas de realización, los vehículos son agentes antiendurecedores, agentes antioxidantes, agentes apelmazantes, y/o protectores. Los ejemplos de vehículos útiles incluyen polisacáridos (almidones, maltodextrinas, metilcelulosas, proteínas, tales como proteínas de suero, péptidos, gomas), azúcares (lactosa, trehalosa, sacarosa), lípidos (lecitina, aceites vegetales, aceites minerales), sales (cloruro de sodio, carbonato de calcio, citrato de sodio), y silicatos (arcillas, sílice amorfa, sílices ahumadas/precipitadas, sales de silicato). Los vehículos adecuados para los aditivos de pienso para animales se describen en *American Feed Control Officials, Inc.'s Official Publication*, que se publica anualmente. Véase, por ejemplo *Official Publication of American Feed*

16

Control Officials, Sharon Krebs, editor, edición 2006, ISBN 1-878341-18-9. En algunas formas de realización, los vehículos se agregan luego de concentrar el medio de fermentación y durante y/o luego del secado.

En formas de realización en las cuales las composiciones se formulan como aditivos para pienso, la concentración en base de peso en peso (p/p) de (i) *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes, (ii) preparaciones libres de 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 5%, aproximadamente 6%, aproximadamente 7%, aproximadamente 8%, aproximadamente 9%, aproximadamente 10%, aproximadamente 11%, aproximadamente 12%, aproximadamente 13%, aproximadamente 14%, aproximadamente 15%, aproximadamente 16%, aproximadamente 17%, aproximadamente 18%, aproximadamente 19%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, o aproximadamente 95%. En algunas formas de realización, por ejemplo, cuando el medio de formulación concentrado ha sido lavado y secado con calor, tal como secado por congelamiento, la concentración de *Bacillus subtilis* QST 713 o sus mutantes en la composición final puede ser entre aproximadamente 90% y aproximadamente 100%.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar /dar mcomo alimento a animales no insectos y no humanos para mejorar la salud de animales o la condición general física en conjunto de dichos animales. Las composiciones se pueden administrar con aplicaciones terapéuticas y no terapéuticas. Una cantidad eficaz de una composición es una cantidad eficaz para mejorar la salud de un animal en comparación con un animal al que no se le ha administrado la composición aunque por otro lado se le ha administrado la misma dieta (incluyendo pienso y otros compuestos) como se lo ha hecho con el animal que recibió las composiciones de la presente invención. Los índices de salud

17

mejorada incluyen uno o más de los siguientes: aumento en la ganancia de peso, que puede incluir un aumento en el peso de una parte específica del animal o un aumento en el peso en conjunto; mantenimiento de la microflora intestinal; aumento en la eficacia de utilización de pienso; reducción del riesgo de mortalidad; aumento en la resistencia a enfermedades; reducción en la morbilidad; aumento en la respuesta inmune; disminución en la ocurrencia de diarrea, aumento en la productividad; y/o reducción en la eliminación de patógenos. Por lo tanto, en línea con lo anterior, las formas de realización de la presente solicitud están dirigidas a métodos no terapéuticos tales como aumento del peso del animal, el mantenimiento de la microflora intestinal, o un aumento en la eficacia de utilización del pienso por administración/alimentación a un animal de una composición que comprende *Bacillus subtilis* QST 713, un mutante de *Bacillus subtilis* QST 713, una preparación libre de células derivada de *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes, o metabolitos de QST713 o sus mutantes.

En algunas formas de realización en las cuales las composiciones de la presente invención se administran/dan como alimento a animales de granja, las composiciones se administran con el objetivo de mejorar el rendimiento del crecimiento del animal de granja. Como se usa en la presente documentación, las mejoras en el rendimiento del crecimiento se refieren a crecimiento aumentado (peso o longitud) y/o eficacia de utilización del pienso y/o mortalidad disminuida/tasa de supervivencia aumentada en comparación con animales a los cuales no se les administraron las composiciones de la presente invención. En un aspecto de esta invención, se lograron aumentos de peso de entre aproximadamente 1% y aproximadamente 20%, o entre aproximadamente 1% y aproximadamente 15%, o entre aproximadamente 1% y aproximadamente 9%. El método de la presente invención también puede aumentar la eficacia de utilización del pienso en animales en comparación con animales a los cuales no se les administraron las composiciones de la presente invención. La eficacia de alimentación generalmente se evalúa usando la relación de conversión de pienso, que es la relación de consumo de pienso a ganancia de peso. Una reducción de esta relación se relaciona con un aumento de la eficacia de alimentación. La eficacia de alimentación puede mejorar entre aproximadamente 1% y 15%, entre

aproximadamente 2% y aproximadamente 10% y entre aproximadamente 3% y aproximadamente 8%. Los métodos de la presente invención también pueden reducir la mortalidad. Se pueden lograr mejoras en la tasa de supervivencia de entre aproximadamente 1% y aproximadamente 20%, o entre aproximadamente 2% y 17% o entre aproximadamente 4% y aproximadamente 13% o entre aproximadamente 5% y aproximadamente 10%. El crecimiento aumentado, mejoras en la eficacia de alimentación y disminución en la mortalidad se pueden determinar individualmente en comparación con promedios conocidos en el campo de la cría de ganado o por comparación con promedios de datos de rendimiento de crecimiento de un grupo de animales de granja de aproximadamente la misma edad, generalmente criados juntos y/o bajo condiciones similares, algunos de las cuales no reciben las composiciones de la presente invención.

El mantenimiento de la microflora intestinal se refiere a disminuir (por muerte o inhibición del crecimiento) microorganismos dañinos, causantes de enfermedades de importancia sanitaria y/o aumentar las bacterias beneficiosas, tales como Lactobacilos y Bifidobacterias, en comparación con un animal al cual no se le aplicaron los métodos de esta invención. Sin el deseo de estar ligado a cualquier teoría particular, se cree que los aumentos en las bacterias beneficiosas se puede provocar por estimulación del crecimiento de dichas bacterias o simplemente por disminución selectiva de las bacterias patógenas, dando de este modo mayor espacio a las bacteria beneficiosas para crecer y para unirse a la pared intestinal. Las bacterias dañinas, causantes de enfermedades que pueden disminuir por los métodos de esta invención incluyen *Clostridia* spp. (tales como *perfringens* y *difficile*), *Listeria* spp. (tales como *monocytogenes*, *seeligeri* y *welshimeri*), *Salmonella* spp. (tales como *enterica*, *arizonae*, *typhirium*, *enteritidis* y *bonglori*), *E. coli*, *Enterococcus* spp. (tales como *faecalis* y *faecium*), *Campylobacter*, *Aeromonas* spp., *Staphylococcus aureus*, y *Vibrio* spp. En algunas formas de realización, los microorganismos dañinos, causantes de enfermedades se pueden reducir aproximadamente 0,5 log, aproximadamente 1 log, aproximadamente 2 log, aproximadamente 3 log, aproximadamente 4 log, o aproximadamente 5 log.

Las bacterias patógenas anteriores conducen a diferentes enfermedades en animales. Por ejemplo, en aves de corral, el pienso contaminado con *Clostridium perfringens* ha sido implicado en brotes de enteritis necrótica (o lesiones necróticas en la pared intestinal) en gallinas. Interesantemente, a pesar de que esta bacteria se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal de gallinas, no siempre da como resultado una enteritis necrótica, a pesar que niveles aumentados se han asociado a esta enfermedad. La reducción de este patógeno por medio del uso de un probiótico da como resultado una salud y ganancia de peso mejorados, como se muestra en los ejemplos, más adelante. Por lo tanto, el control de estas bacterias por disminución de su capacidad para crecer en el intestino reduce la incidencia de enfermedades causadas por dichas bacterias. La Tabla 1, más adelante, muestra diferentes microorganismos y las enfermedades o condiciones a las cuales están relacionados.

Tabla 1

Organismo	Enfermedad y/o animal afectado
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Enfermedad pulmonar en aves de corral
<i>Mycoplasma synoviae</i>	Enfermedad de articulaciones y pulmonar en aves de corral
<i>Pasterella multocida</i>	Cólera aviar
<i>Staphylococcus aureus</i>	Patógeno secundario común de aves de corral
<i>Aspergillus fumigates</i>	Patógeno respiratorio de aves de corral, especialmente pavo
<i>Avibacterium paraglaaiarum</i>	Coriza de gallina
<i>Bordetella avium</i>	Pavos
<i>Salmonella arizonae</i>	Coriza de pavos
<i>Salmonella typhimurium</i>	Fiebre tifoidea aviar
<i>Pseudomonus aeruginosa</i>	Patógeno secundario común de aves de corral

20

<i>E. coli</i> O18 ó O45 k88positiva	Diarrea del destete (cerdos)
<i>Brachyspira hyodysenteria</i>	Disentería porcina
<i>Lawsonia intracellularis</i>	ilieitis (cerdos)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Rinitis atrófica (cerdos)
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	erisipela (cerdos)

El mantenimiento de la microflora intestinal saludable y, en particular, la reducción de una o más de las bacterias perjudiciales descritas anteriormente, también causa una reducción en la eliminación de patógenos a través de las heces. Las cantidades de patógenos se pueden determinar por diferentes métodos conocidos por aquellos con experiencia en el arte, incluyendo el análisis de la eliminación de patógenos en las heces del animal o por sacrificio de animales durante el estudio y análisis de las poblaciones de bacterias (beneficiosas y patógenas) en su intestino.

Los métodos de la presente invención también se pueden usar para restaurar el balance intestinal normal luego de la administración de cantidades terapéuticas de antibióticos por inhibición del crecimiento de bacterias patógenas y/o aumento o mantenimiento del crecimiento de bacterias beneficiosas. El término "cantidad terapéutica" se refiere a una cantidad suficiente para mejorar o revertir un estado de enfermedad en un animal.

La aumentada productividad obtenida por medio los métodos de la presente invención se refiere a cualquiera de los siguientes: producción de más o mayor calidad de huevos, leche o carne o producción aumentada de crías destetadas.

Los métodos de la presente invención se pueden aplicar a un animal, incluyendo vertebrados, tales como animales mamíferos y acuáticos, y crustáceos, tales como camarón, pero excluyendo insectos y humanos. Los mamíferos que se pueden tratar con la composición de la presente invención incluyen animales de granja; animales usados para deportes, recreación o para trabajo, tales como caballos, incluyendo caballos de carrera; mascotas domésticas de hogar, incluyendo perros, gatos, pájaros y exóticos; y animales de zoológico. Los animales de granja se refieren a animales criados para el consumo o como

21

productores de alimentos. En una forma de realización el método se aplica a animales monogástricos tales como aves de corral y pájaros de caza. Las aves de corral pueden incluir gallina, pavo, pato, ganso, gallina de Guinea y ñandú, tal como avestruz y emú. Los pájaros de caza pueden incluir codorniz, perdiz Chukar, faisán, urogallo, gallinas de Cornualles, y perdiz. Pollo se refiere a pollo para carne, que abarca pollos que son criados para sacrificar, que también son llamados pollos parrilleros, y gallinas productoras de huevos, que son aquellas que son usadas para producir huevos para el consumo humano. En otra forma de realización, el método se puede aplicar a mamíferos tal como cerdos. En aún otra forma de realización el método se puede aplicar a animales poligástricos, tales como ganado vacuno, cabra y ovejas, también referidos en la presente como rumiantes. En una forma de realización, las composiciones de esta invención se pueden dar como alimento a prerumiantes para mejorar su salud y, en particular, para disminuir la incidencia de diarrea en estos animales. Los preruminantes son ruminantes, que incluyen becerros, en un rango de edad entre el nacimiento y aproximadamente doce semanas. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar a preruminantes junto con los reemplazantes de leche. Con reemplazantes de leche se refiere a alimento formulado con la intención de reemplazar el calostro durante las etapas de alimentación con leche del preruminante.

En un aspecto, las composiciones de la presente invención son aditivos de pienso que se agregan al pienso o agua de beber del sujeto animal antes de la alimentación. En tal caso, las composiciones se pueden formular con un vehículo, tal como carbonato de calcio o proteínas de suero, tal como se describió anteriormente. En un aspecto de la invención, dicho vehículo es hidrofóbico.

En otro aspecto, se pueden formular las composiciones que comprenden *Bacillus subtilis* QST713, sus mutantes, preparaciones libres de células de QST713 y sus mutantes, y metabolitos de QST713 y sus mutantes en combinación con ingredientes de pienso para animales necesitados para promover y mantener el crecimiento de un animal. Dichos ingredientes de pienso para animales pueden incluir uno o más de los siguientes: proteína, carbohidrato, grasas, vitaminas, minerales, coccidiostatos, productos basados en ácidos y/o

22

medicinas, tales como antibióticos. En algunas formas de realización, también estarán presentes vehículos, tales como aquellos descritos anteriormente. Las proteínas e hidratos de carbono requeridos para promover y mantener el crecimiento se deben referir como proteína de pienso e hidratos de carbono de pienso para distinguirlos de cualquier proteína y/o hidratos de carbono residuales que pueden quedar como remanente del proceso de fermentación bacteriana.

En otro aspecto, las composiciones de la presente invención que comprenden *Bacillus subtilis* QST713, sus mutantes, preparaciones libres de células de QST713 y sus mutantes y metabolitos de QST713 y sus mutantes pueden incluir además otros probióticos, tales como otras especies y cepas de *Bacillus* que se usan para alimentar animales para mejorar la salud animal o para mejorar la condición física general del animal. Entre los ejemplos a modo ilustrativo de cepas se incluye a *Bacillus subtilis* PB6 (como se describe en la Patente de los EE.UU. No. 7.247.299 y archivada como ATCC Accession No. PTA-6737), que es vendida por Kemin bajo la marca CLOSTAT® o *Bacillus subtilis* C-3102 (como se describe en la Patente de los EE.UU. No. 4.919.936 y archivada como FERM BP-1096 en el Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, en Japón), vendida por Calpis como CALSPORIN®, o una mezcla de esporos de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* vendida por Chr. Hansen bajo la marca BIOPLUS2B®, *Bacillus coagulans*, incluyendo aquellas cepas que se describen en la Patente de los EE.UU. No. 6.849.256, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus laterosporus*, y *Bacillus alevi*. Se pueden usar otros probióticos distintos a *Bacillus*, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, en las composiciones de la presente invención. Si tales otros probióticos no están formulados como parte de las composiciones de la presente invención, los mismos se pueden administrar con (ya sea al mismo tiempo a bien a diferentes tiempos) las composiciones de la presente invención.

En otro aspecto, las composiciones de la presente invención pueden incluir o se pueden administrar con (ya sea al mismo tiempo o bien a diferentes tiempos) enzimas que ayudan en la digestión del pienso, tales como amilasa, glucanasa, glucoamilasa, celulasa, xilanasa, glucanasa, amilasa y pectinasa; moduladores inmunes, tales como antibióticos, citoquinas, plasma secado por atomizado;

23

interleuquinas, interferones; y/o oligosacáridos, tales como fructooligosacáridos, mananoligosacáridos, galactooligosacáridos, inulina, inulina enriquecida en oligofurtoza, tagatosa, y polidextrosa.

En formas de realización en las que las composiciones comprenden QST713 o sus mutantes, la bacteria se debe agregar al pienso o al agua de beber, y se debe usar para alimentar a los animales en una cantidad que sea eficaz para mejorar la salud de los animales. En una forma de realización, la misma se puede agregar a una tasa de inclusión de entre aproximadamente 1×10^4 UFC de *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua de beber y aproximadamente 1×10^{10} UFC de *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua de beber. En otra forma de realización se deben administrar entre aproximadamente 1×10^5 UFC de *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua de beber y aproximadamente 1×10^9 UFC de *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua de beber. En aun otra, se deben administrar entre aproximadamente 1×10^5 UFC de *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua de beber y aproximadamente 1×10^9 UFC de *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua de beber. En aun otra se deben administrar entre aproximadamente 1×10^6 UFC de *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua de beber y aproximadamente 1×10^8 UFC de *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua de beber. En algunas formas de realización la tasa de inclusión es de aproximadamente 1×10^3 UFC de *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua de beber, o 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} UFC de *Bacillus subtilis* por gramo de pienso o ml de agua de beber. En formas de realización en las que se proveen composiciones que contienen QST713 o sus mutantes como aditivos alimenticios, dichas composiciones deben tener un conteo de UFC que permita la dilución a los rangos antes descritos mediante el agregado al pienso o al agua de beber para animales.

Las composiciones que comprenden *Bacillus subtilis* QST713 o sus mutantes, preparaciones de los mismos libres de células, o metabolitos de los mismos, se pueden agregar al pienso para animales antes del proceso de

2u

peletización, de modo tal que la composición que se usa en el método antes descrito forme parte de los pellets de pienso para animales. En este aspecto, si se usan células bacterianas en la composición, las mismas se agregan típicamente en forma de espora a otros componentes del pienso para animales antes del proceso de peletización. Se pueden usar los procesos de peletización estándares conocidos por un experto en la materia, incluyendo el proceso de extrusión de piensos secos o semi húmedos. En algunas formas de realización el proceso de peletización involucra temperaturas de al menos aproximadamente 65° C. En otras, las temperaturas de peletización están entre aproximadamente 65° C y aproximadamente 120° C. En aun otras, las temperaturas de peletización están entre aproximadamente 80 ° C y aproximadamente 100° C. En aun otras, la temperatura de peletización es de aproximadamente 60° C, aproximadamente 65° C, aproximadamente 70° C, aproximadamente 75° C, aproximadamente 80° C, aproximadamente 85° C, aproximadamente 90° C o aproximadamente 100° C.

Las composiciones de la presente invención también se pueden administrar por vía oral como un fármaco en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los niveles óptimos de dosificación para diferentes animales se pueden determinar fácilmente por parte de los expertos en la materia, mediante la evaluación, entre otras cosas, de la habilidad de la composición para (i) inhibir o reducir las bacterias patogénicas en el intestino a diferentes dosis, (ii) incrementar o mantener los niveles de bacterias beneficiosas y /o (ii) mejorar la salud del animal a diferentes dosis.

Para los animales acuáticos, incluyendo salmón, trucha, camarón y pez ornamental, en una forma de realización, las composiciones de la presente invención se pueden agregar al agua de crianza (en lugar de o además del pienso para pez) en una cantidad eficaz para mejorar la salud del pez. Dichas cantidades eficaces pueden estar entre aproximadamente 10^4 y aproximadamente 10^{10} UFC de *Bacillus subtilis* QST713 por ml de agua de crianza, o en otra forma de realización entre aproximadamente 10^5 y aproximadamente 10^9 UFC de *Bacillus subtilis* QST713 por ml de agua de crianza, o en aun otra forma de realización entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^8 UFC de *Bacillus subtilis* QST713 por ml de agua de crianza.

25

Los siguientes ejemplos se dan con propósito puramente ilustrativo y no limitante de la presente invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – Estudios In vitro de la Eficacia de Preparaciones Libres de Células de QST713 contra Patógenos Animales

Se ensayaron preparaciones libres de células de QST713 para estudiar la actividad antimicrobiana contra *Clostridia* (*Clostridia perfringens* ATCC13124 y dos aislamientos experimentales 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 las técnicas de Kirby-Bauer y de concentración inhibitoria mínima (MIC).

Las preparaciones libres de células se prepararon mediante crecimiento de QST713 en un medio correspondiente al medio en el que se creció el patógeno objetivo, como se muestra en la Tabla 2, a continuación, centrifugando el medio durante 15 minutos a 3000 rpm a 23°C y filtrándolo a través de una unidad de filtro Nalgene de 0,45 µm. Para ensayar la estabilidad al calor, se calentó una porción de la preparación libre de células a 50 °C durante una hora antes de cada una de las pruebas de Kirby-Bauer y MIC

Tabla 2

Género	Especie/ATCC	Medio de Crecimiento	Condiciones de Crecimiento
<i>Clostridia</i>	<i>Perfringens</i> ATCC 13124	Medio para Clostrídeos Reforzado (Oxoid Cat. No. CM0149).	Crecimiento durante una noche en el frasco AnaeroPak como anterior con 1 sachet de MGC Anaero-

26

			Indicator (Remel Cat. No. 68-3001)
<i>Clostridia</i>	<i>Perfringens</i> aislamiento ambiental	Igual que anterior	Igual que anterior
<i>Clostridia</i>	<i>Perfringens</i> aislamiento ambiental	Igual que anterior	Igual que anterior
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i> ATCC 19116	Caldo infusión cerebro corazón	Durante una noche a 37°C
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i> ATCC 19111	Igual que anterior	Igual que anterior
<i>Listeria</i>	<i>seeligeri</i> ATCC 35968	Igual que anterior	Igual que anterior
<i>Listeria</i>	<i>welshimeri</i> ATCC 35897	Igual que anterior	Igual que anterior
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i> ATCC 10398	Caldo de Trypticase de Soja	Igual que anterior
<i>Salmonella</i>	<i>arizonae</i> ATCC 13314	Igual que anterior	Igual que anterior
<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i> ATCC 43975	Igual que anterior	Igual que anterior

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 bajo condiciones estériles. Luego se colocaron estos discos sobre pátinas del patógeno objetivo, se incubaron durante una noche y se midieron las zonas de inhibición. Se observaron zonas de inhibición para los objetivos *Clostridia* y *Listeria*.

En la técnica de MIC, se inocularon pocillos de placas de microtitulación con 75 µl de cada patógeno objetivo, diluidos a 1×10^5 . La preparación libre de células antes descrita se agregó a cada pocillo a diluciones finales de 1:2, 1:10 y 2x

1:50. Se incubaron las placas durante una noche a 37 °C y se leyó la OD600 con un lector de microplacas Wallach. La preparación libre de células (tanto tratada con calor como no tratada con calor) fue significativamente eficaz contra los objetivos de *Clostridia* y *Listeria* e inhibió el crecimiento de *Salmonella* y *E. coli*, a pesar de que 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 a 6.

Ejemplo 2 –Estudios In vitro de la Eficacia de QST713 Contra Diferentes Bacterias

Se ensayó una formulación en polvo de *Bacillus subtilis* QST713 para estudiar la eficacia contra diferentes aislamientos ambientales de las siguientes bacterias: *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Samonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, y *Listeria monocytogenes*. Esta formulación en polvo se preparó mediante la fermentación de *Bacillus subtilis* QST713, concentración del caldo de fermentación, y secado, como se describió previamente en la Descripción Detallada de la Invención. La misma tuvo 14,6% de caldo concentrado y seco, y 85,4% de inertes de formulación (elegidos a partir de las opciones que se describen previamente) y contuvo como mínimo aproximadamente $7,3 \times 10^9$ UFC de *Bacillus subtilis*/gramo y como máximo aproximadamente 1×10^{10} UFC de *Bacillus subtilis*/gramo. Esta formulación se debe referir en la presente documentación como Composición 1. Se prepararon soluciones madre de Composición 1 mediante el agregado de 0,2 gramos del polvo formulado a 1,8 ml de agua destilada estéril, de modo que la solución contuvo aproximadamente 1×10^9 UFC de *Bacillus subtilis* por ml. Se sembraron en estrías los organismos de prueba en agar de tripticasa soja con 5% de sangre de oveja con hasta cuatro organismos sembrados en estrías en una misma placa de agar, cada uno en una línea individual que biseca la placa de agar. Se dejaron secar los organismos durante una noche. Luego, se sembraron por estrías las placas inoculadas con la suspensión de QST713 formulada que se describió previamente, la cual se untó en forma perpendicular a los organismos de prueba. Los aislamientos de *Clostridium perfringens* y *Campylobacter jejuni* se incubaron en una atmósfera de gas de Campy (10% de CO₂, 5% de O₂, 8% de N₂) a $41 \pm 2^\circ\text{C}$ durante una noche.

Los otros aislamientos, que son aeróbicos, se incubaron a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante una noche sin gas de Campy. QST713 causó la inhibición de varios de los aislamientos de *Clostridium perfringens*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes*, sin embargo no hubo inhibición de *E. coli*. Además, en algunos casos *Bacillus subtilis* QST713 mostró un sobre crecimiento competitivo agresivo de las bacterias patogénicas. Los resultados se resumen en la tabla a continuación. Las zonas de inhibición que se informan en la tabla se midieron a partir del eje de crecimiento de *Bacillus* hacia el comienzo del crecimiento del organismo 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 de Aislamiento	Atmósfera y Temperatura	Zona de Inhibición (mm)	Comentario
<i>Clostridium perfringens</i>	CL-2	Gas de Campy, 41°C	0	Poca inhibición de crecimiento aunque sin zona, aglomeración de <i>Bacillus</i>
	CL-3		3	
	CL-14		0	Aglomeración de <i>Bacillus</i>
	CL-15		0	Aglomeración de <i>Bacillus</i>
<i>Escherichia coli</i> O157	EC-80	Aeróbico, 36°C	0	
	EC-81		0	
	EC-82		0	
<i>Salmonella enteritidis</i>	SE 27	Aeróbico, 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 de Campy, 41°C	1	Aglomeración de <i>Bacillus</i>
	Cj-2		0	Poca inhibición de crecimiento aunque sin zona, aglomeración de <i>Bacillus</i>
	NCj1		0	Aglomeración de <i>Bacillus</i>
	NCj2		1	
<i>Listeria monocytogenes</i>	LM 1	Aeróbico, 36°C	2	

Ejemplo 3 – Estudios In vivo de QST713 en Pollos Parrilleros

La Composición 1 se agregó a dietas de inicio y terminación de pollos parrilleros y se observó la ganancia de peso y la eficiencia de alimentación. Se separaron 252 pollos parrilleros Jumbo Cornish Cross al azar en cuatro grupos y se alimentaron con una de las dietas que se listan a continuación.

- Dieta basal sola – control
- Dieta basal + 0,05% de CALSPORIN® (0,5 g/kg; 10⁶ UFC/g) (designado como CS en la tabla a continuación)
- Dieta basal + 0,05% de Composición 1 (0,5g/kg; 10⁶ UFC/g) (designado como Comp.1-10⁶ en la tabla a continuación)
- Dieta basal + 0,0005% de Composición 1 (0,5 mg/kg; 10³ UFC/g) (designado como Comp. 1-10³ en la tabla a continuación)

La dieta basal consistió en la siguiente dieta iniciadora para los días 1 a 22 y la siguiente dieta terminadora para los días 22 a 42.

Tabla 4 – Composición de ingredientes de las dietas basales iniciadora (d 1 a 21) y terminadora (d 22 a 42) para pollos parrilleros

Ingrediente %	Iniciadora	Terminadora
Maíz	45,6	49,2
Harina de Soja (48% de CP)	23,5	16,8
Granos secos por destilador	5,0	5,0
Harina de gluten de Maíz	2,0	4,0
Harina de Pescado	1,0	2,5
Harina de Alfalfa	--	0,5

31

Vitamina, Mineral, Otros	22,9	22,0
--------------------------	------	------

Los resultados a continuación en la Tabla 5 muestran que la Composición 1 mejoró la ganancia de peso de las aves al nivel de 10⁶ UFC/g. La eficiencia de alimentación mejoró para el periodo de entre los días 21 y 42 y para el periodo de crecimiento global (días 1 a 42). En el cuadro a continuación, ADG se refiere a la ganancia diaria promedio, ADFI se refiere a la incorporación de pienso diario promedio.

Tabla 5 – Efecto del tratamiento dietario sobre el desempeño de pollos parrilleros

	Tratamiento			
Ítem	Control	CS	Comp.1-10 ⁶	Comp. 1-10 ³
Peso Corporal, g				
d 1	40,5 ± 0,43	40,0 ± 0,40	40,8 ± 0,43	40,7 ± 0,43
d 21	861,8 ± 22,3	815,6 ± 20,3	880,0 ± 22,3	842,3 ± 22,3
d 42	2494,4± 66,7	2469,0± 60,9	2617,0 ± 66,7	2460,3 ± 66,7
ADG, g				
d 1 – 21	39,8 ± 0,89	37,7± 0,81	39,8± 0,89	38,9 ± 0,89
d 21 – 42	77,9 ± 3,18	77,5 ± 2,90	82,5 ± 3,18	78,3 ± 3,18
d 1 – 42	58,4 ± 1,46	57,8 ± 1,33	61,3 ± 1,46	57,9 ± 1,46
ADFI, g				
d 1- 21	57,3 ± 1,15	55,9 ± 1,05	59,4 ± 1,15	57,6 ± 1,15

d 21 – 42	156,6 ± 3,56	158,3 ± 3,25	155,3 ± 3,56	158,7± 3,56
d 1 – 42	105,2 ± 2,30	104,9 ± 2,10	106,6 ± 2,30	106,7 ± 2,30
Ganancia: Alimento, g/g				
d 1 – 21	0,69 ± 0,015	0,67± 0,014	0,66 ± 0,015	0,67± 0,015
d 21 – 42	0,50 ± 0,024	0,50 ± 0,022	0,52 ± 0,024	0,49 ± 0,024
d 1 – 42	0,50 ± 0,022	0,51 ± 0,020	0,52 ± -0,022	0,48 ± 0,022
Mortalidad, n	1,2 ± 0,51	1,2± 0,46	1,4 ± 0,51	1,4 ± 0,51

Ejemplo 4 – Estabilidad de QST713 en Proceso de Peletización de Alimento

Para determinar la estabilidad del *Bacillus subtilis* QST713 durante el proceso de peletización del pienso para animales, se prepararon pellets de pienso para animales con Composición 1 y se ensayaron muestras a diferentes temperaturas. El pienso control contuvo los ingredientes que se muestran en la Tabla 6, mientras que el pienso experimental se suplementó con 8% de Composición 1.

Tabla 6

Ingrediente	%
Maíz	68,94
Harina de Soja	20,40
Meal de Peces	5,50
Fosfato de	
Monocalcio	0,51
Caliza	0,58

Sal	0,33
DL-Metionina	0,31
L-Lisina al 98%	0,18
Premezcla	de
Vit/Min para Pollos	0,25
Aceite de Soja	3,00
TOTAL	100,000

Los ingredientes se mezclaron en una mezcladora Foberg a temperaturas ambientes y luego se calentaron a diferentes temperaturas objetivos a las que se mantuvieron durante aproximadamente 30 s antes de pelletearse a aproximadamente 2000 lbs/hora a través de una salida para pellet de 5/32" x 1 ¼". Se tomaron diez muestras a partir de diez lugares diferentes a lo largo de la mezcladora. Se tomaron muestras de pellets a las temperaturas objetivo de 65° C, 75° C, 80° C, y 85° C dentro del mismo lote de 750 libras.

Se diluyeron las muestras de la mezcladora y se dejaron reposar durante cinco minutos para que se humedezcan totalmente. Las muestras de pellet se sumergieron durante 30 minutos en solución amortiguadora de fosfato con el objetivo de recuperar las células QST713. Se plaquearon las muestras diluidas para determinar las unidades formadoras de colonias. Las unidades formadoras de colonias disminuyeron significativamente desde las etapas de mezcladora hacia las etapas de peletización, como se muestra en la Tabla 7, a continuación.

34

Tabla 7

Material	UFC/g
8% Bacillus de Mezcladora 1	1,98E+09
8% Bacillus de Mezcladora 2	1,62E+09
8% Bacillus de Mezcladora 3	1,62E+09
8% Bacillus de Mezcladora 4	1,42E+09
8% Bacillus de Mezcladora 5	1,73E+09
8% Bacillus de Mezcladora 6	1,64E+09
8% Bacillus de Mezcladora 7	1,63E+09
8% Bacillus de Mezcladora 8	1,44E+09
8% Bacillus de Mezcladora 9	1,72E+09
8% Bacillus de Mezcladora 10	1,64E+09
8% Bacillus de Pellets 85° C	1,56E+09
8% Bacillus de Pellets 80° C	1,71E+09
8% Bacillus de Pellets 75° C	1,73E+09
8% Bacillus de Pellets 65° C	1,09E+09

Ejemplo 5 – Estudios In vivo de QST713 en Cerdo

Se llevó a cabo un ensayo usando QST713 en forma de pellet de pienso usando 750 cerdos en un ensayo de cerdos neonatos. Se agregó la Composición 1 al pienso antes de la formación de pellets mediante procesos estándares. Los estudios de UFC de QST713 antes y después del proceso estándar de formación de pellet fueron consistentes con los resultados que se obtuvieron en el Ejemplo 4, previamente, y mostraron que las UFC de QST713 no disminuyeron drásticamente luego del peletización.

35

El peso/cerdo aproximado al comienzo fue de 10 lbs., y el objetivo fue que los cerdos crezcan hasta aproximadamente 40 lbs. Se usó un tratamiento control que consistió en una dieta estándar sin ningún antibiótico o *Bacillus* para alimentar aproximadamente a 250 cerdos. Otros 250 cerdos recibieron la dieta estándar más 1×10^6 UFC de *Bacillus subtilis* QST713 por g de pienso. Un tercer grupo de 250 cerdos se alimentó con 1×10^7 UFC de *Bacillus subtilis* QST713 por gramo de pienso. El número de cerdos separados en el tercer grupo fue significativamente menor en comparación con el grupo control. La práctica de la separación involucra la eliminación de los cerdos menos saludables o de tamaño no deseado del esquema de alimentación para darles productos terapéuticos o para sacrificarlos.

Ejemplo 6 – Estudios In vivo de QST713 en Aves

Se llevó a cabo un ensayo usando la Composición 1 como aditivo alimenticio usando pollos parrilleros con 50 aves por corral de cama de paja y 6 corrales por tratamiento. La Composición 1 se agregó al pienso estándar para aves (no conteniendo otros probióticos o antibióticos) a una tasa de 91 gramos de Composición 1 por tonelada de pienso (aproximadamente $6,64 \times 10^{11}$ UFC/tonelada). Uno de los grupos control y el grupo de aves administradas con pienso suplementado con Composición 1 fueron desafiadas con *Clostridium perfringens* en los días 19, 20 y 21 del estudio. Se registró el peso a lo largo del estudio y el mismo se muestra en la Tabla 8, a continuación. Se determinó la eficiencia alimenticia y se informa como proporción de conversión de pienso en la Tabla 9, a continuación. La proporción de conversión de pienso se ajustó con los pesos de los pollos muertos y eliminados. En el Día 22 del estudio, se seleccionaron cinco aves de cada corral, se sacrificaron, pesaron, y se

examinaron para ver el grado de presencia de lesiones de Enteritis Necrótica (NE). La clasificación de NE se basó en una escala de clasificación de 0 a 3, con 0 siendo normal y 3 siendo la más severa. En las Tablas 8 y 9, las medias dentro de las columnas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P<0,05$). SEM es el error estándar de la LSMEANS.

Tabla 8. Efectos del tratamiento dietario sobre la ganancia de peso de pollos parrilleros en un modelo de desafío de *Clostridium perfringens* en corrales de cama de paja.

Tratamientos	Peso promedio (kg) al Día 0	Ganancia de Peso Promedio (kg)		
		Días 0 a 21	Días 0 a 42	Días 21 a 42
Control (NC)	,044	,515 ^A	1,892 ^A	1,377 ^A
Desafío Control (CP)	,044	,469 ^B	1,704 ^B	1,235 ^B
Composición 1 (CP)	,044	,496 ^{AB}	1,838 ^A	1,342 ^{AB}
SEM	,000	,011	,041	,037
Pr>F	,3712	,0415	,0049	,0083

Tabla 9. Efectos del tratamiento dietario sobre la conversión de pienso y las lesiones de enteritis necrótica de pollos parrilleros en un modelo de desafío con *Clostridium perfringens* en corrales de cama de paja.

Tratamientos	Proporción de Conversión de Alimento (proporción pienso a ganancia)			Clasificación de Lesiones de Enteritis Necrótica
	Días 0 a 21	Días 0 a 42	Días 21 a 42	

37

Control (NC)	1,723 ^B	1,943 ^B	2,055 ^B	0,17 ^C
Control Desafiado (CP)	1,893 ^A	2,051 ^A	2,183 ^A	1,30 ^A
Composición 1,CP	1,765 ^B	1,964 ^B	2,128 ^{AB}	0,77 ^B
SEM ⁴	,026	,021	,040	,17
Pr>F	,0003	,0010	,0490	,0009

Ejemplo 7 – Uso de Composición 2 para Estudios Varios

Se llevaron a cabo ensayos para estudiar la mejora del desempeño de crecimiento usando una segunda formulación de *Bacillus subtilis* QST713. Esta formulación en polvo se preparó mediante fermentación, concentración del caldo de fermentación, secado y lavado del mismo a través de un proceso de diafiltración para eliminar el medio de fermentación residual y los metabolitos, todo como se describió previamente, de modo tal que la composición esté compuesta esencialmente de células – principalmente esporos y algunas células vegetativas. Esta composición contiene 14,6% de cultivo concentrado, secado y lavado y 85,4% de inertes de formulación (seleccionados a partir de las opciones que se describieron previamente en la Descripción Detallada de la Invención) y aproximadamente $1,0 \times 10^{10}$ UFC de *Bacillus subtilis*/gramo y se hace referencia a la misma en la presente documentación como Composición 2. La Composición 2 sustituye a la Composición 1 en los ensayos que se describen en los Ejemplos 3 a 6, y se espera que los resultados sean los mismos que los conseguidos con la Composición 1.

Ejemplo 8 – Viabilidad de Esporos de QST713 en Agua de Mar

Se ensayó la Composición 1 para determinar la viabilidad en agua de mar y NaCl. Se preparó agua de mar artificial en tres concentraciones; 10 ppt,

30 ppt, 50 ppt; 4 tubos de 25 ml por concentración. Se preparó Caldo Nutritivo con tres concentraciones de NaCl; 1%, 3%, y 5%; 4 tubos de 25 ml por concentración. Tanto las aguas de mar como los caldos nutritivos se esterilizaron mediante autoclave antes de la inoculación. Se hizo una suspensión de Composición 1 mediante la disolución de 0,5 g en 10 ml agua destilada. Se inocularon alícuotas (0,5 ml) de la suspensión en cada una de las tres concentraciones de agua de mar y caldo. Se estimó que los tubos contenían $>10^7$ UFC/ml (UFC=unidad formadora de colonia). Se prepararon botellas de dilución de 1% de Caldo Nutritivo y 1% de NaCl (99 ml por botella) y se esterilizaron mediante autoclave. Se preparó Agar Nutritivo de acuerdo a las instrucciones del fabricante; se prepararon placas de 15 x 100 mm para el ensayo de conteo en placa, una placa por ensayo más controles sin inocular.

Se incubaron los tubos a 28°C en una incubadora con agitación, usando 125 rpm, durante 14 días. Se tomaron muestras para subcultivar en los días 0, 2, 10. En el día 0 se ensayaron todos los tubos; en los días 2 y 10 solamente se ensayaron las 2 concentraciones más altas de agua de mar y de NaCl. Se obtuvieron los conteos de placa mediante plaqueo de 10 µl del tubo original en el día 0 (= a una dilución 10^{-2}) y 100 µl de diluciones 10^{-2} y 10^{-4} preparadas en Caldo Nutritivo al 1% /NaCl al 1% en los días 2 y 10. Por lo tanto, los conteos obtenidos fueron realmente al nivel de 10^{-3} y 10^{-5} . Se incubaron las placas a 28°C. Se observaron colonias a las 24 y 48 horas.

Se obtuvieron lecturas de turbidez usando un instrumento Spectronic 20D+, tubos colectores de fracciones de poliestireno de 12 x 75 como cubetas, y longitud de onda de 660 nm mediante la medida de absorbancia de cada muestra. Las muestras de prueba se hicieron en el día 0 mediante preparación

de una dilución 1:10 desde cada tubo (0,5 ml en 4,5 ml de solución salina al 1% y en los días 2 y 10 mediante ensayo de 5 ml de los subcultivos de 24 horas de las diluciones 10^{-2} y 10^{-4}). Además, se obtuvieron lecturas de turbidez en el día 8° de incubación de las diluciones del día 2.

Tanto los cultivos en placa como las lecturas de turbidez indicaron que los esporos persistieron con poca o ninguna disminución de sus números durante al menos diez días.

Se leyeron las placas de cultivo a las 24 y 48 horas. A las 24 horas, las placas de 10^{-3} estaban todas confluentes de crecimiento bacteriano. Las placas de 10^{-5} estaban más claras, pero aun tenían ~1000 colonias por placa. A las 48 horas, todas las placas tenían un crecimiento bien confluyente, o sea más de 10^8 UFC por ml en el tubo original. Este número se mantuvo en los días 0, 2, y 10. No se observaron diferencias en los crecimientos de los cultivos con el rango de concentraciones de agua de mar o NaCl. El cultivo de Composición 1 creció bien en todos los rangos ensayados. No hubo crecimiento para ningún tiempo en las aguas de mar o caldo nutritivo con NaCl sin inocular.

Los ensayos de turbidez (lecturas de absorbancia) dieron resultados similares, pero fueron más difíciles de interpretar. Los tubos originales no se pudieron leer en forma directa debido a que los mismos estaban demasiado turbios, en especial para las concentraciones en agua de mar más altas. Se usó una dilución 1:10 para obtener la lectura de día 0. Las lecturas del día 2 y del día 10 se hicieron en las diluciones que se usaron para inocular las placas de cultivo y se pudieron tomar de las botellas de dilución. Debido a que los números estimados en los días 2 y 10 fueron mayores a 10^8 por ml, hubo un efecto adverso muy pequeño, si es que lo hubo, sobre el crecimiento como

consecuencia de las concentraciones salinas.

Se ensayó la Composición 1 en tres concentraciones de agua de mar artificial (10 ppt, 30 ppt, y 50 ppt), y tres concentraciones de NaCl en caldo nutritivo (1%, 3%, y 5%), para estudiar la persistencia. El probiótico creció en todas las concentraciones y fue viable durante al menos diez días en altos números $>10^8$ /ml. La concentración de sal en el agua de mar o en el caldo no afectó la habilidad de los esporos para germinar y crecer.

Ejemplo 9 – Estudios In vivo de QST713 en Trucha

Se dividen truchas arcoíris de aproximadamente 14 gramos en dos grupos de 20 peces cada uno. El grupo control se alimenta con pienso estándar para peces, mientras que el grupo tratado recibe pienso para peces y 1×10^6 UFC de *Bacillus subtilis* QST713 por gramo de pienso. Se espera que el grupo tratado muestre un peso incrementado en comparación con el grupo control.

Ejemplo 10 – Estudios In vivo en Camarón

Para determinar la acción inhibitoria de QST713 contra patógenos conocidos de camarón y langostino *Penaedae* y *Palaemonidae*, se ensayan las Composiciones 1 y 2 contra tres patógenos bacterianos aislados a partir de camarón cultivado: *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, y *V. vulnificus*, y un patógeno fúngico de camarón, *Fusarium solani*.

Se preparan soluciones madre de Composición 1 y Composición 2 mediante el agregado de 0,2 gramos del polvo formulado a 1,8 ml de agua destilada estéril, de modo que cada solución contenga aproximadamente 1×10^9 UFC de *Bacillus subtilis* por ml.

Se cosechan los condiosporos de cultivos de cinco días de edad de *Fusarium solani* crecidos en agar Sabouraud-Dextrosa, en NaCl al 2% estéril.

41

Los *Vibrio* se crecen en medio Luria Broth a 37°C. Las subcepas bacterianas marinas se enriquecen en agar Mueller Hinton o medio caldo marino 2216 a 30°C, y luego se cultivan en caldo tripteína soja (TSB), suplementado con entre 1 y 3% de NaCl a 30°C. Las cepas de *V. parahaemolyticus* se crecen selectivamente en agar con Thiosulfate Citrate Bile Salts a 42°C y luego se cultivan en TSB suplementado con NaCl al 3% a 30°C.

Los organismos de prueba, *Vibrio* y *Fusarium*, se siembran en estría en una placa de agar de soporte individual, cada uno en una línea individual que biseca la placa de agar. Se dejan secar los organismos durante una noche. Luego, se siembran en estría dos juegos de las placas inoculadas ya sea con suspensión de la Composición 1 o bien de la Composición 2 descritas previamente, las que se colocan perpendiculares a los organismos de prueba. Las placas sembradas en estrías se incuban a 36°C $\pm$ 2 durante una noche. Se espera que el QST713 cause la inhibición de varios de los aislamientos de *Vibrio* y *Fusarium* patogénicos. Además, en algunos casos, se espera que *Bacillus subtilis* QST713 muestre un sobre crecimiento competitivo agresivo de las bacterias patogénicas.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos en la presente documentación tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. A pesar de que se puede usar cualquier método y material, similar o equivalente a los que se describen en la presente documentación para la práctica o el ensayo de la presente invención, en la presente documentación se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones, patentes, y publicaciones de patentes que se citan están incorporadas como referencia en la presente documentación en su totalidad para todos los propósitos.

Las publicaciones que se mencionan en la presente se incluyen solamente en virtud de su divulgación previa a la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo expresado en la presente debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tenga el derecho de invocar una fecha de invención previa a dicha publicación.

Mientras que se ha descrito la invención en conexión con formas de realización específicas de la misma, se comprenderá que la misma es capaz de

u2

modificaciones adicionales, y esta solicitud tiene la intención de cubrir dichas variaciones, usos, o adaptaciones de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo dichos alejamientos de la presente exposición como dentro de la práctica conocida o convencional del arte al que esta invención pertenece, y como se los puede aplicar a las características esenciales previamente establecidas, y como sigue en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar la salud de un animal no insecto y no humano CARACTERIZADO PORQUE comprende administrar al animal no insecto y no humano una composición que comprende *Bacillus subtilis* QST713 o un mutante de *Bacillus subtilis* QST713.
2. El método de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE la composición comprende el *Bacillus subtilis* QST713.
3. El método de la reivindicación 2 CARACTERIZADO PORQUE la composición además comprende metabolitos producidos por el *Bacillus subtilis* QST713.
4. El método de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE la composición se administra a un animal de granja en una cantidad eficaz para mejorar el desempeño del crecimiento.
5. El método de la reivindicación 4 CARACTERIZADO PORQUE la cantidad es eficaz para incrementar la eficiencia de la utilización del pienso del animal no insecto y no humano.
6. El método de la reivindicación 4 CARACTERIZADO PORQUE la cantidad es eficaz para incrementar la tasa de supervivencia del animal no insecto y no humano.
7. El método de la reivindicación 4 CARACTERIZADO PORQUE la cantidad es eficaz para incrementar la ganancia de peso del animal no insecto y no humano.
8. El método de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE la composición se administra en una cantidad eficaz para mantener la salud de la microflora intestinal.
9. El método de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE la composición se administra en una cantidad eficaz para disminuir el crecimiento de bacterias patógenas en el animal no insecto y no humano.
10. El método de la reivindicación 9 CARACTERIZADO PORQUE las bacterias patógenas se seleccionan del grupo que consiste en *Clostridia* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria* spp. y *E. coli*.

33

11. El método de la reivindicación 4 CARACTERIZADO PORQUE el animal no insecto y no humano es un ave de corral.
12. El método de la reivindicación 11 CARACTERIZADO PORQUE el ave de corral es un pollo parrillero.
13. El método de la reivindicación 11 CARACTERIZADO PORQUE el ave de corral es una gallina productora de huevos.
14. El método de la reivindicación 4 CARACTERIZADO PORQUE el animal es un cerdo.
15. El método de la reivindicación 15 en donde el animal es un rumiante.
16. El método de la reivindicación 16 CARACTERIZADO PORQUE el animal es un pre-rumiante.
17. El método de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE la composición además comprende un vehículo.
18. El método de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE la composición se administra con el pienso para animales.
19. El método de la reivindicación 18 CARACTERIZADO PORQUE los ingredientes del pienso para animales comprenden proteína alimenticia.
20. El método de la reivindicación 19 CARACTERIZADO PORQUE los ingredientes del pienso para animales además comprenden carbohidrato alimenticio.
21. El método de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE la composición además comprende agua para beber.
22. El método de la reivindicación 4 CARACTERIZADO PORQUE la composición además comprende un reemplazo de leche para pre-rumiantes.
23. El método de la reivindicación 18 CARACTERIZADO PORQUE la composición se administra a una tasa de entre aproximadamente 1×10^3 UFC de *Bacillus subtilis* QST713 por gramo de pienso para animales y aproximadamente 1×10^{10} UFC de *Bacillus subtilis* QST713 por gramo del pienso para animales.
24. Una composición para mejorar la condición física de un animal no insecto y no humano CARACTERIZADA PORQUE comprende (i) *Bacillus subtilis*



QST713 en una cantidad que es eficaz para mejorar el crecimiento del animal y (ii) al menos un ingrediente de pienso para animales.

25. La composición de la reivindicación 24, CARACTERIZADA PORQUE el ingrediente de pienso para animales comprende carbohidrato alimenticio y proteína alimenticia.
26. La composición de la reivindicación 24, CARACTERIZADA PORQUE la cantidad eficaz de *Bacillus subtilis* QST713 es de entre aproximadamente 1×10^3 UFC/g de pienso para animales y aproximadamente 1×10^{10} UFC/g de pienso para animales.

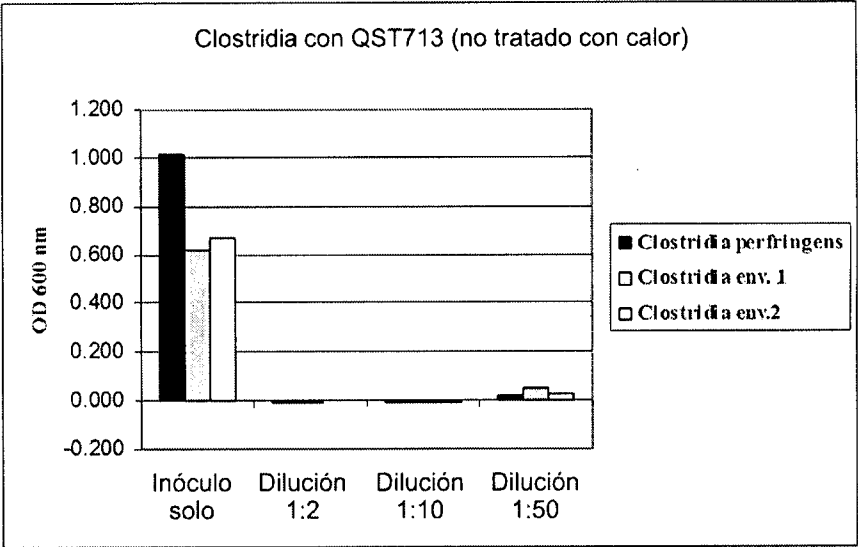


FIGURA 1

47

2/8

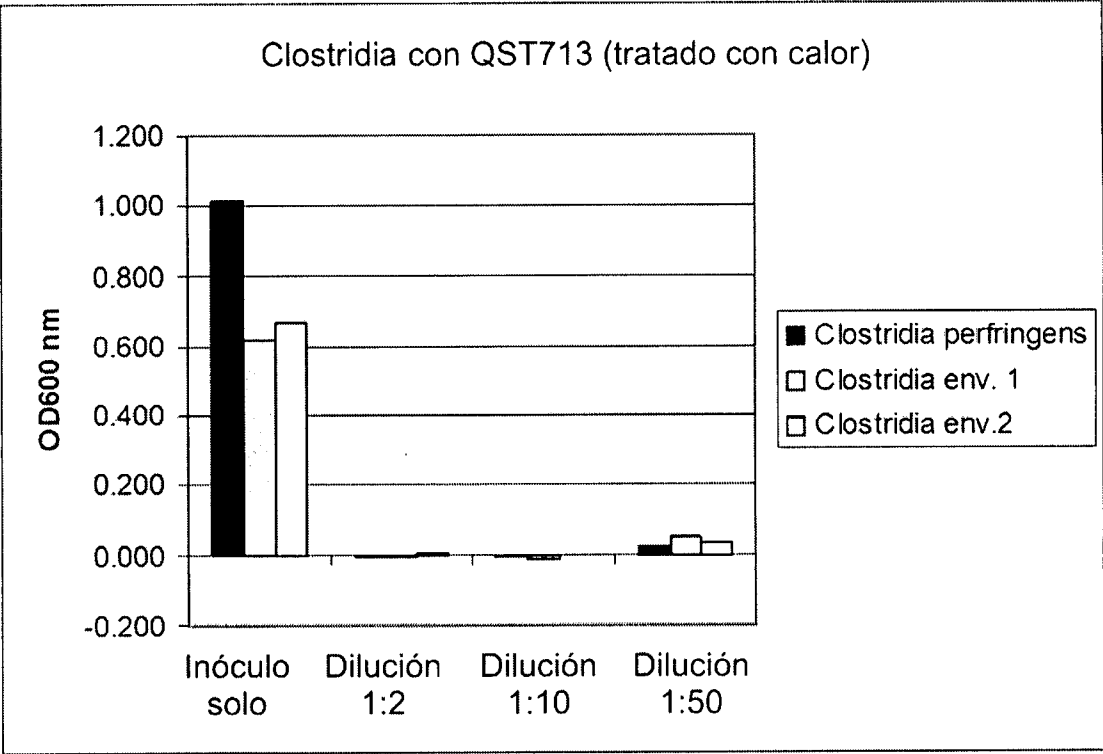


FIGURA 2

48

3/8

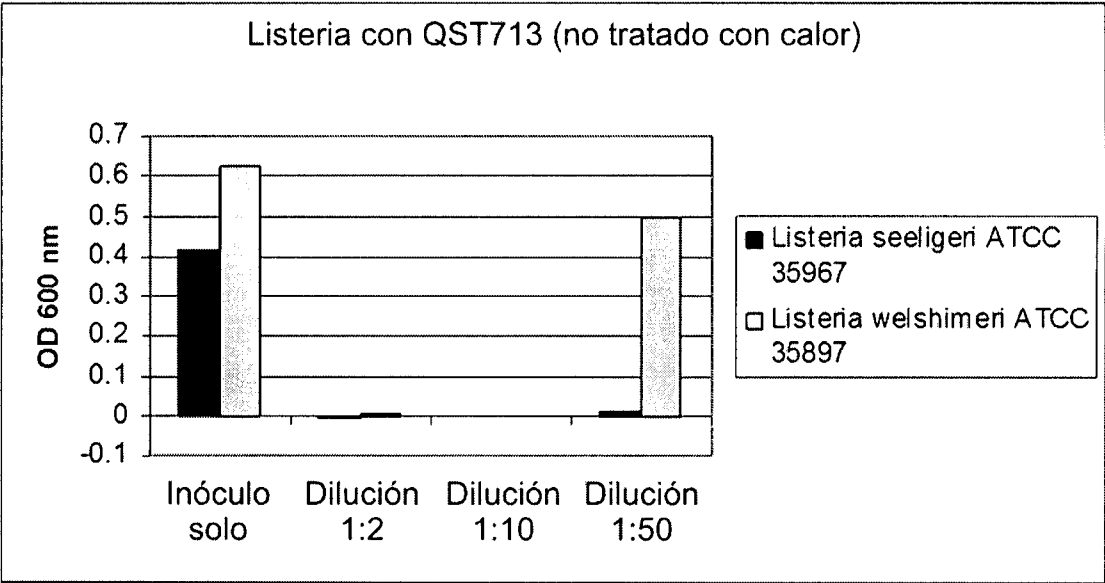


FIGURA 3

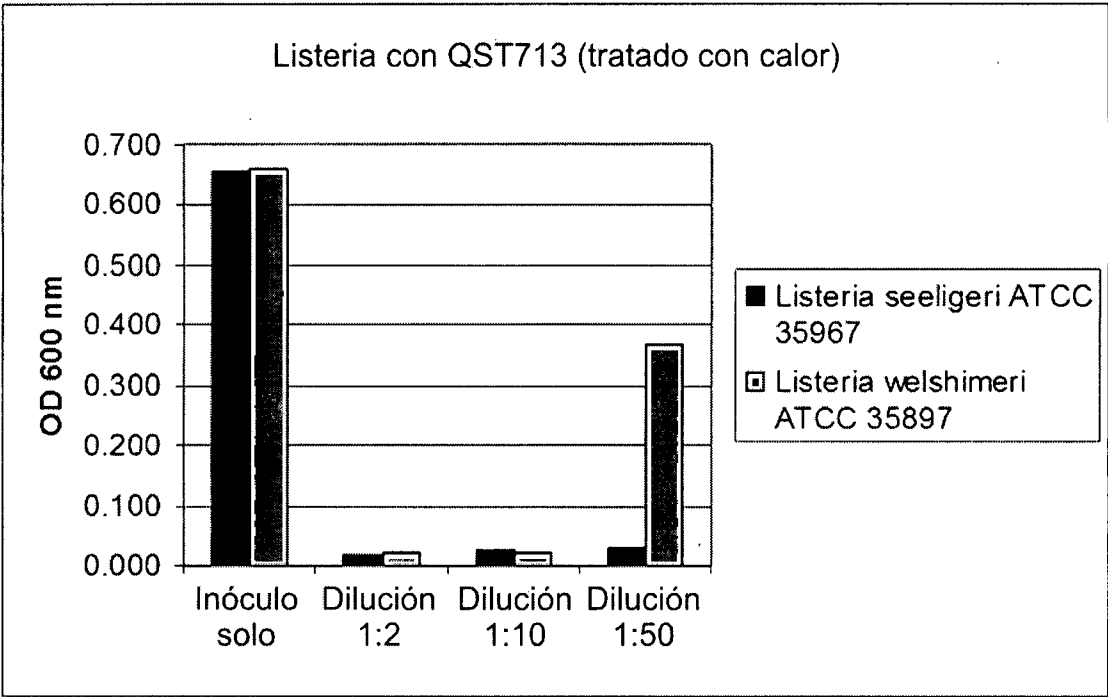


FIGURA 4

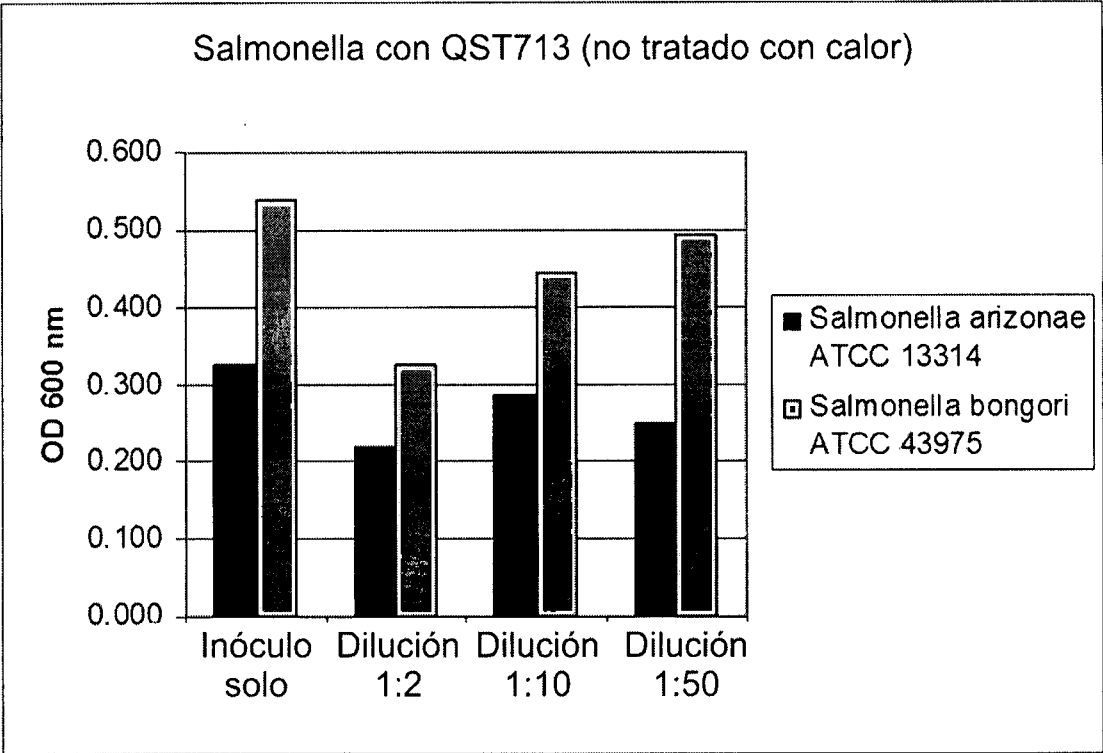


FIGURA 5

6/8

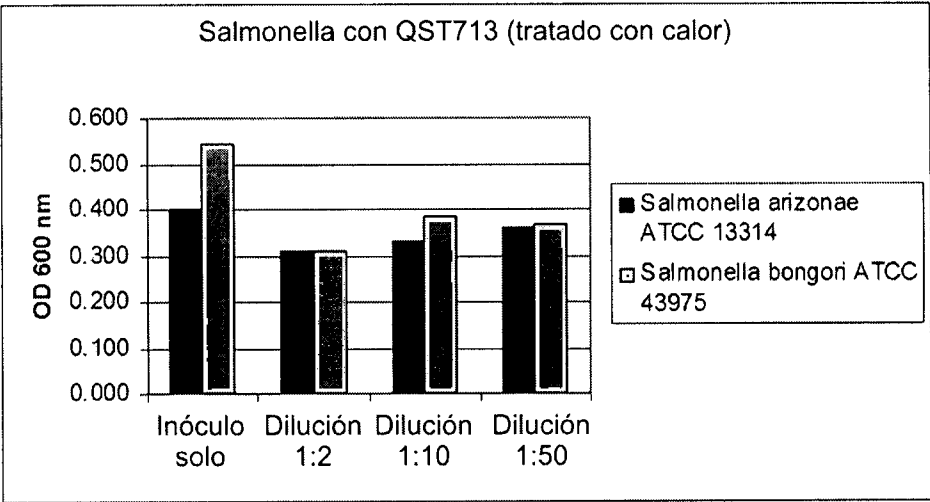


FIGURA 6

52

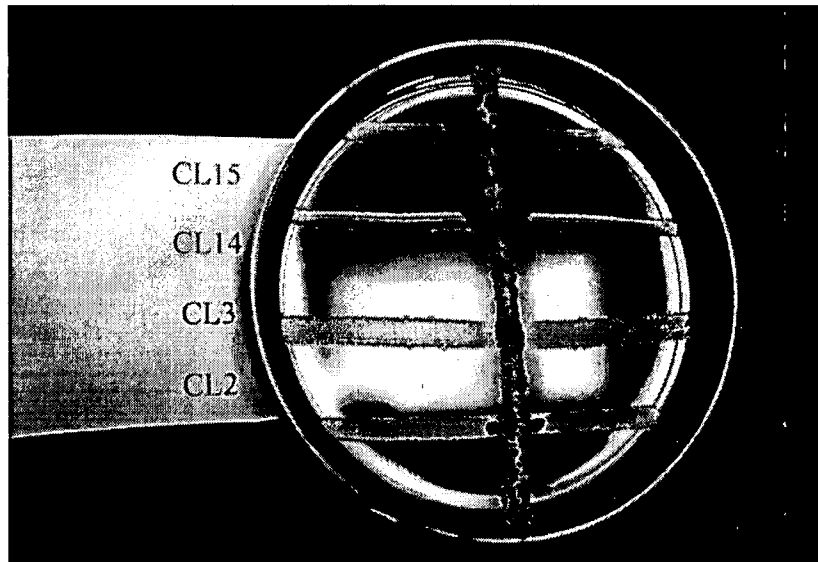


FIGURA 7

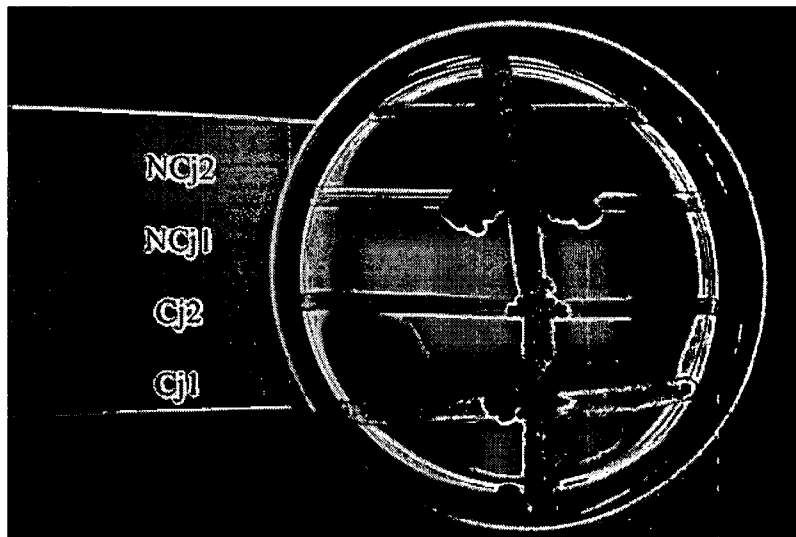


FIGURA 8

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
25 March 2010 (25.03.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/033714 A1

PCT

(51) International Patent Classification:
A23K 1/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2009/057335

(22) International Filing Date:
17 September 2009 (17.09.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 61/192,436 17 September 2008 (17.09.2008) US ..

(71) Applicant (for all designated States except US):
AGRAQUEST, INC. [US/US]; 1540 Drew Avenue,
Davis, CA 95618 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SCHMIDT,
Joseph, Earl [US/US]; 44538 Country Club Drive, El
Macero, CA 95618 (US). JIMENEZ, Desmond, Rito
[US/US]; 216 Toyon Drive, Woodland, CA 95695 (US).

(74) Agent: SAMONEK, Michelle, L.; AgraQuest, Inc., 1540
Drew Avenue, Davis, CA 95618 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,

CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments (Rule 48.2(h))

(54) Title: METHOD FOR USING A BACILLUS SUBTILIS STRAIN TO ENHANCE ANIMAL HEALTH

(57) Abstract: The present invention relates to a method for enhancing the health of an animal comprising administering to the animal a composition comprising *Bacillus subtilis* QST 713 or a mutant thereof.



WO 2010/033714 A1

55



No. 11-041787- -00000-0000

Fecha: 2011-04-05 15:01:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 55

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐