

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO _____ CELULAS B. TEXASPORUS DEFICIENTES DE ESPORULACION Y

_____ METODOS PARA INACTIVACION EFICIENTE Y RENTABLE Y SU USO

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ MYGALAXY LIMITED COMPANY

DOMICILIO _____ FORT WORTH, TEXAS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

_____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

74. APODERADO _____ C.C. 35,456,344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



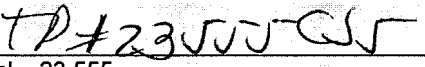
No. 13-204350- -00000-0000

Fecha: 2013-08-28 16:45:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 98

ión

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2012/026999	Fecha 2012/02/28
Publicación Internacional No.		WO 2012/118845 A1	Fecha 2012/09/07
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
CÉLULAS B. TEXASPORUS DEFICIENTES DE ESPORULACIÓN Y MÉTODOS PARA INACTIVACIÓN EFICIENTE Y RENTABLE Y SU USO			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
A23L 001/003, A61K 035/074, C12R 001/007			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
MYGALAXY LIMITED COMPANY			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN	3801 Mattison Ave, #B Fort Worth, Texas 76107, Estados Unidos de América	No. TELÉFONO	3 47 36 11
CIUDAD	Fort Worth	CORREO ELECTRÓNICO	clientes@cavelier.com
DEPARTAMENTO/ESTADO	Texas	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	Estados Unidos de América
PAÍS DE RESIDENCIA	Estados Unidos de América		
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. JIANG		Yiwei	Estadounidense
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Estados Unidos de América	Texas	Fort Worth	3801 Mattison Ave, #B Fort Worth, Texas 76107, Estados Unidos de América
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS De Páez		NOMBRES Luz Clemencia	IDENTIFICACIÓN C.C . 35.456.344 T.P . 23.555
DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35	No. TELÉFONO	3 47 36 11
CIUDAD	BOGOTA	CORREO ELECTRÓNICO	cavelier@cavelier.com
PAÍS	COLOMBIA	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	

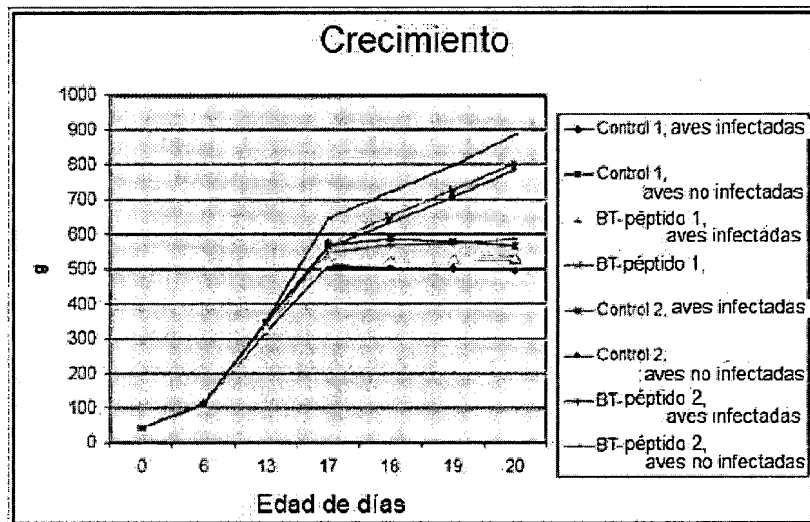
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
U.S.A.		US	61/447,703	2011/03/01
U.S.A.		US	13/406,202	2012/02/27
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>				
☐ SI ☐ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>				
☐ SI ☐ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>				
☐ SI ☐ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐				
Universidades públicas o privadas ☐				
Entidades sin ánimo de lucro ☐				
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. <u>13-0081051</u> No. <u>13-0083337</u>	Fecha: <u>2013/08/14</u> Fecha: <u>2013/08/22</u>	
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)				
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		Firma 		
C.C 35.456.344 de Usaquéen		Tarjeta Profesional 23.555 		

 SCT\SCT\SDC\ID-AF250006\WPC20460

17	ANEXOS
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: <u>69</u> 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: <u>15</u> 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: <u>8</u> 4. ☒ Resumen. 5. ☒ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☒ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.	Documentación Jurídica 9. ☒ Poder de MYGALAXY LIMITED COMPANY 10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$500.000. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por cinco (5) reivindicaciones adicionales a 10 por \$150.000.

FIGURA CARACTERISTICA

Figura 2



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
7 September 2012 (07.09.2012)

(10) International Publication Number
WO 2012/118845 A1

- (51) International Patent Classification:
C12R 1/07 (2006.01) A61K 35/74 (2006.01)
A23L 1/03 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2012/026999
- (22) International Filing Date:
28 February 2012 (28.02.2012)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/447,703 1 March 2011 (01.03.2011) US
13/406,202 27 February 2012 (27.02.2012) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): MY-GALAXY LIMITED COMPANY [US/US]; 3801 Mattison Ave., #B, Fort Worth, TX 76107 (US).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): JIANG, Yiwei [US/US]; 3801 Mattison Ave., #B, Fort Worth, TX 76107 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

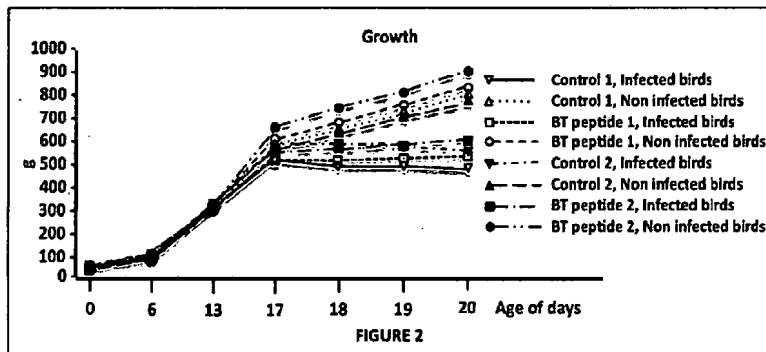
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))

(54) Title: SPORULATION-DEFICIENT B. TEXASPORUS CELLS AND METHODS FOR EFFICIENT AND COST-EFFECTIVE INACTIVATION AND USE THEREOF



(57) Abstract: Novel strains and methods for their use are provided. Particularly, foods and other oral products or treatments containing sporulation deficient Brevibacillus strain when administered to a subject can inhibit or reduce the number of pathogens in the subject and improve the health of the subject.

WO 2012/118845 A1

**CÉLULAS B. TEXASPORUS DEFICIENTES DE ESPORULACIÓN Y MÉTODOS
PARA INACTIVACIÓN EFICIENTE Y RENTABLE Y SU USO**

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la
Solicitud Provisional de E.U.A. No. 61/447,703, presentada el
1 de marzo de 2011, cuya totalidad es incorporada para
referencia.

10

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general al campo
de la biotecnología, más específicamente, a una cepa sensible
al estrés o deficiente de esporulación de *Brevibacillus*
texasporus, un método para la inactivación eficiente y
15 rentable de células del organismo *B. texasporus*, y una
alimentación o aditivo de agua derivado de dicha cepa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La cita de algún documento adjunto no es una
20 admisión que el documento es técnica anterior, o material
considerado para la patentabilidad de cualquier
reivindicación adjunta, y cualquier declaración con respecto
al contenido o a la fecha de cualquier documento se basa en
la información disponible para la solicitud en el momento de
25 la presentación y no constituye una afirmación o una admisión

que la declaración está correcta.

Los animales sanos o los animales que no están infectados por los organismos patógenos, tales como bacterias patógenas, crecen más rápido y ganan más peso por kilogramo de alimentación. Consecuentemente, los compuestos antimicrobianos se han utilizado como promotores del crecimiento en animales de granja desde los años 40. Típicamente, los compuestos antimicrobianos se administran en la alimentación en una dosis sub-terapéutica o baja.

10 Aunque las dosis sub-terapéuticas de compuestos antimicrobianos se han utilizado por mucho tiempo para ayudar a los animales de granja a mantenerse saludables y a crecer más rápido, los informes recientes demuestran un enlace entre el uso de antibióticos y la presencia de bacterias
15 resistentes a los fármacos en la carne producida de estos animales. Consecuentemente la Comisión Europea, el Departamento de Agricultura de E.U.A. (USDA) así como la Administración de Fármacos y Alimentos de E.U.A. (FDA) tiene todas las interdicciones y pautas instituidas en el uso de
20 ciertos antibióticos como promotores del crecimiento. Actualmente, las regulaciones se centran típicamente en el uso de los antibióticos que son iguales o similares a los antibióticos usados para tratar a seres humanos. Sin embargo, hay una oposición creciente en general al uso de todos los
25 fármacos antibióticos para incrementar el crecimiento de los

animales de granja. Además, el mercado para la carne orgánicamente elevada está aumentando y será orgánico certificado, la carne de E.U.A. debe venir de los animales criados sin los antibióticos. Consecuentemente hay una
5 necesidad de un nuevo reforzador del crecimiento para la alimentación del animal de granja.

Además, la salud del animal de compañía es un mercado de crecimiento rápido. Mantener la salud de los animales de compañía (por ejemplo, envejecimiento de los
10 animales de compañía) vía el estímulo de la inmunidad natural es un enfoque atractivo al mantenimiento de la salud en animales de compañía, y un estimulante inmune oralmente entregado sería valorado altamente.

Brevibacillus texasporus (BT) (por ejemplo, ATCC
15 PTA-5854) es una bacteria recientemente identificada del suelo que produce un grupo de péptidos catiónicos de NRPS (véase, WO 2005/074626, y WU et al., 2005). Los péptidos catiónicos de BT exhiben un amplio-espectro de la actividad anti-bacteriana *in vitro*, matando a bacterias gram positivo y
20 negativo, hongos y protozoos (WO 2005/074626).

A pesar de la actividad anti-bacteriana *in vitro*, los péptidos de BT parece que carecen de actividad anti-bacteriana *in vivo*. Los enterococos resistentes a Vancomicina son altamente sensibles a los péptidos BT *in vitro*. Sin
25 embargo, los péptidos BT en concentraciones sobre las

concentraciones mínimas de inhibición no descolonizan VRE comensal de la trayectoria del GI de ratón.

Sin embargo, un péptido aislado demuestra que es eficaz en la prevención de colibacilosis y salmonelosis en pollos cuando estaba utilizado como un aditivo de alimentación. Además, este péptido aislado también muestra ser eficaz en promover el crecimiento e incrementar la conversión de alimentación en pollos.

Quizás más importantemente, el efecto *in vivo* de los péptidos BT parece ser independiente de su actividades antibióticas *in vitro*, pues es eficaz en la prevención de infecciones en pollos por *E. coli* y *Salmonella* en las concentraciones debajo de sus concentraciones mínimas de inhibición *in vitro* (JIANG et al., 2005; KOGUT et al., 2007; KOGUT et al., 2010). También se observa que los heterófilos de sangre y los monocitos están cebados para la activación en pollos alimentados con péptidos BT, señalando a la inmunestimulación natural como modo probable de la acción. Estas características hacen de los péptidos BT un aditivo ideal de alimentación y alternativas a compuestos antibióticos en la producción del animal de granja.

Además, puesto que la inmunidad natural ahora también se sabe que desempeña papeles claves para controlar infecciones virales y fungicidas así como en la prevención de enfermedades no-infecciosas tales como obesidad/síndrome

metabólico y diabetes mellitus tipo 2 (VIJAY-KUMAR et al., 2010), el modulador natural de inmunidad de BT debe también tener aplicaciones importantes en estas áreas terapéuticas.

Sin embargo, el valor económico de los péptido BT
5 como un aditivo de alimentación está severamente limitado por la necesidad de aislar los péptidos, que aumenta el costo de producción a un punto donde ya no es económicamente viable. Como una alternativa para purificar los péptidos, es posible que el organismo entero (PTA-5854), como se explica en la
10 publicación internacional de patentes WO 2005/074626, podría utilizarse directamente para la producción de un aditivo de alimentación.

Normalmente, un microbio de alimentación directa (DFM) o cepa probiótica necesita alcanzar el intestino en
15 forma viable y en número suficiente, que requiere la supervivencia de la cepa durante el procesamiento de alimentos y digestión de alimentos (véase, patente de Estados Unidos 5,480,641 y publicación de patente de Estados Unidos 20040247568). Desde que la producción de pellets de
20 alimentación normalmente implica suficiente calor para reducir significativamente la viabilidad, la mayoría de las cepas probióticas son seleccionadas por su resistencia al calor y las condiciones de pH encontradas en el estómago. Actualmente las cepas probióticas más estables son las
25 esporas de Bacillus, ya que las esporas bacterianas son

resistentes al calor y permanecen viables durante el almacenamiento a largo plazo.

Sin embargo, dado que el organismo BT no se cree que sea una bacteria simbiótica que normalmente se encuentra en la vía intestinal de animales de granja, es deseable y/o necesario inactivar el organismo antes de su uso. Sin embargo, en esporas que producen cepas esto es problemático. Además, al menos una autoridad reguladora gubernamental considera los siguientes criterios al evaluar alimentaciones novedosas relativas a las fuentes microbianas: seguridad de la producción del microorganismo; seguridad del producto microbiano a los seres humanos, animales y el medio ambiente; impacto potencial de la transferencia de genes horizontales; interacciones con la microflora gastrointestinal; persistencia en el intestino; impacto potencial sobre los seres humanos y el medio ambiente debido al desprendimiento de microorganismos viables, especialmente si se perciben impactos en la salud debido a la contaminación de la carne (Directive on Guidelines for the Assessment of Novel Feeds: Microbial Sources, Draft - Junio 2007, La Agencia de Inspección de Alimentos Canadiense). Por lo tanto, cuando se utilizan microorganismos como un aditivo de alimentación hay dos resultados deseados contradictorios. El primero es mantener el organismo en una condición viable durante el procesamiento y digestión y el segundo deseo diametralmente

opuesto es para inactivar completamente o casi completamente el organismo sin inactivación de los péptidos activos. Un beneficio adicional de inactivación es que elimina o reduce las posibilidades de transferencia horizontal de genes entre
5 *B. texasporus* y microorganismos en el intestino y en el medio ambiente; elimina o limita las posibles interacciones con la microflora (GI) gastrointestinal; elimina o reduce el riesgo potencial de los seres humanos y el medio ambiente a través de desprendimiento de células viables; y/o elimina o reduce
10 la contaminación de la carne derivada de los animales que consumen el alimento. Por lo tanto, la formación de esporas continua por PTA-5854 limita gravemente la capacidad de utilizar esta cepa como un DFM, ya que las esporas son muy resistentes a la mayoría de los métodos utilizada para
15 inactivar las células vegetativas, que exigen métodos duros y caros para su eliminación.

Como resultado, hay una necesidad en la técnica de una cepa de *Brevibacillus texaspolus* que puede utilizarse eficazmente como un DFM inactivado.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En una modalidad, la presente invención es un alimento o aditivo de agua que incluye células inactivadas o un cultivo inactivado de una cepa bacteriana deficiente de
25 esporulación *B. texasporus*. La invención también se refiere a

la utilización de células secas inactivadas o cultivos (por ejemplo, células liofilizadas o secadas por aspersión o cultivos) de la invención que pueden agregarse a un alimento o agua potable para uno o más animales, incluyendo pero no limitado a, aves de corral, ganado, ganado, porcino, pollos, caballo, pavos, ovejas, cabras, patos, codornices, gallinas Cornish, palomas, criadero de peces, cangrejos, camarones, tortugas de agua dulce, perros y gatos. Por ejemplo, células de un cultivo de una cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación pueden ser inactivadas mediante pasteurización, inanición, temperatura (calor, frío o congelación), deshidratación (por ejemplo, secado por calor, secado por congelamiento, secado por aspersión, secado en el sol, secado en el aire o secado al vacío), acidificación, alcalinación, alcoholes, detergentes, lisozimas, fuerzas mecánicas, cationes de amonio cuaternario, agentes oxidantes (por ejemplo, óxido de cloro, peróxido de hidrógeno, hipoclorito u ozono) y/o irradiación (por ejemplo, UV, rayos x o rayos gamma), las células inactivadas o cultivo, a continuación, podrán incluirse en el agua potable o un alimento para animales, tales como una alimentación a base de cereales, por ejemplo, un alimento que contenga al menos un cereal seleccionado del grupo que consiste de cebada, soja, trigo, triticale, centeno, maíz y combinaciones de los mismos. De hecho, la presente invención puede añadirse a una gran

variedad de alimentos. Las células inactivadas de la invención o péptidos aislados pueden ser mezcladas con agua potable o un alimento para ganado seleccionado del grupo que consiste de un producto lácteos, un cultivador, un alimento
5 final, un alimento pre-iniciador, agua y combinaciones de los mismos.

La presente invención también incluye un método para incrementar la ganancia de peso corporal y conversión alimenticia en animales de granja y compañía, por
10 inactivación (por ejemplo, tratamiento térmico o deshidratación) células *B. texasporus* deficientes de esporulación o un cultivo celular y proporcionando las células inactivadas *B. texasporus* deficientes de esporulación o medios de cultivo más células a un animal en una cantidad
15 suficiente para incrementar el crecimiento. Opcionalmente, una cantidad efectiva de células *B. texasporus* deficientes de esporulación o un medio de cultivo que contiene las células puede ser secado (deshidratado) y/o granulado (una forma de tratamiento térmico) en un alimento de animal o añadido al
20 agua potable.

Ejemplos de ingredientes de alimentos también incluyen cereales, harina de soya, proteína aislada de soya, aceite de soya aislada, grasa de soya aislada, leche desnatada, harina de pescado, harina de carne, harina de
25 hueso, harina de sangre, proteína del plasma sanguíneo,

suero, salvado de arroz, salvado de trigo y además puede incluir un edulcorante, un mineral, una vitamina, sal y pasto.

En una modalidad ejemplar, las células *B. texasporus*
5 deficiente de esporulación se cultivan en un medio que contiene una suspensión de ingredientes de alimento (tales como harina de maíz y harina de soya). El cultivo, a continuación, puede estar sujeto a la inactivación de células y/o secado/deshidratación para hacer un aditivo de
10 alimentación (en donde las partículas en el cultivo funcionan como portadores de los péptidos BT) o una alimentación mejorada.

La presente invención también incluye un método para prevenir y/o tratar las infecciones microbianas en animales,
15 proporcionando las células inactivadas deficientes de esporulación *B. texasporus* o el cultivo en una cantidad efectiva suficiente para tratar y/o prevenir las infecciones microbianas en el animal.

La presente invención también incluye un método para
20 promover el aumento de peso y conversión alimenticia en el crecimiento de los animales, proporcionando células *B. texasporus* deficientes de esporulación inactivadas o cultivo en una cantidad efectiva suficiente para tratar y/o prevenir infecciones microbianas en el animal.

25 La presente invención también incluye el uso de las

células deficientes de esporulación como alimento humano o aditivo de agua.

En una modalidad ejemplar, la invención proporciona cepas deficientes de esporulación de *B. texasporus* que tienen
5 las tasas de supervivencia de menos de aproximadamente 3.5×10^{-3} , menos de aproximadamente 1×10^{-4} , menos de aproximadamente 1×10^{-5} , menos de aproximadamente 1×10^{-6} , menos de aproximadamente 1×10^{-7} , menos de aproximadamente 1×10^{-8} o menos de aproximadamente 1×10^{-9} , que puede ser
10 medido por someter un cultivo a una temperatura de aproximadamente 50°C durante unos 5 minutos y determinar la tasa de supervivencia o capacidad de formación de una colonia.

En una modalidad ejemplar, una cepa *B. texasporus*
15 deficiente de esporulación también muestra una disminución de supervivencia, tales como una tasa de supervivencia de menos de aproximadamente 1×10^{-9} , cuando un cultivo es sometido a un tratamiento de inactivación, como inanición, congelamiento (en ausencia de una cantidad efectiva de un crioprotector),
20 deshidratación (con un vacío de velocidad a 23°C), pH extremos (por ejemplo, pH 1.0 o pH 13.0), butanol saturado, adición de detergente (por ejemplo, SDS 1%) o un agente de lisis (por ejemplo, lisozima), sonicación, fuerza mecánica (por ejemplo, una prensa francesa de máquina formadora de
25 pellets de alimento para animales) o peróxido de hidrógeno

(por ejemplo, mayor o igual al 1% H₂O₂).

La invención también se refiere a un método para aumentar el rendimiento del péptido BT en una preparación de *B. texasporus* utilizando células derivadas de una cepa deficiente de esporulación *B. texasporus*. La presente invención también se refiere a un método de aumentar la estabilidad y utilidad económica de los péptidos BT en una preparación *B. texasporus* utilizando células derivadas de una cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación sin purificación o aislamiento de los péptidos BT.

La invención también se refiere a una forma en polvo de células *B. texasporus*, en donde el polvo es sustancialmente libre de esporas. En una modalidad ejemplar, un cultivo de *B. texasporus* deficiente de esporulación es cultivado en un medio líquido a una densidad celular suficiente y el cultivo es deshidratado o secado para producir un polvo que es sustancialmente libre de esporas. El polvo se puede mezclar entonces con agua o ingredientes de alimento para producir una bebida de animal mejorada o alimentos que no contienen un número significativo de esporas viables de las bacterias *B. texasporus*.

La invención también se refiere a un método de eliminación o descontaminación de las células *B. texasporus* del aparato y/o instalación utilizada para la producción de *B. texasporus* por tratar el aparato y/o instalación para

inactivar o matar la cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación, posteriormente las células pueden simplemente ser arrastradas. Por ejemplo, vapor o agua a alta temperatura puede utilizarse para limpiar el aparato y/o instalación,
5 donde el agua podría eliminar las células y matarlas (debido a la temperatura), eliminando así eficazmente las células *B. texasporus* de los aparatos y/o instalaciones.

La invención también se refiere a un método de estimulación del sistema inmunológico en un animal o humano,
10 al administrar una cantidad efectiva de una cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación. Por ejemplo, una cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación puede cultivarse, las células podrán recogerse, con o sin los medios de cultivo, y las células pueden ser mezcladas con agua o
15 ingredientes de alimento adicionales para producir una bebida mejorada o alimentos que estimulan el sistema inmunológico del animal que se administra. Por ejemplo, una cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación puede ser inactivada y alimentada directamente a un animal o humano para estimular
20 el sistema inmunológico del animal o humano. En otra modalidad ejemplar, la invención se refiere a un alimento mejorado que estimula el sistema inmunológico de un animal o humano por administrar una cantidad efectiva de una cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación y un portador de
25 alimentos a los animales o humanos.

Una cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación puede ser cultivada y mezclada con agua o ingredientes de alimento para producir una bebida mejorada o alimentos que estimula el sistema inmunológico, por ejemplo, puede reforzar la respuesta inmune a una vacuna que se administra a los animales o humanos ya sea en combinación con la bebida mejorada o alimentos o posterior a la entrega de la bebida mejorada o alimentos. Además, una cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación puede inactivarse y alimentarse a un animal o humano, por ejemplo las células inactivadas pueden ser secadas, enviadas a un sitio de tratamiento y/o administración deseado y mezcladas con agua o alimento para ser consumidos por un animal o humano, donde el alimento o el agua no contiene esporas viables de la cepa *B. texasporus*.

La presente invención también se refiere a una composición para estimular el sistema inmunológico del animal, incluidos los humanos, al administrar una cantidad efectiva de una cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación en combinación con una o más vacunas. Por ejemplo, una cepa deficiente de esporulación puede cultivarse, las células recolectadas (con o sin el medio de cultivo, por ejemplo, las células pueden lavarse después de centrifugación) y se administra a un animal ya sea antes o en combinación con una vacuna, en donde las células ceban o refuerzan la respuesta del sistema inmune a la vacuna.

La presente invención también se refiere a una composición y/o método de prevención y/o tratamiento de una enfermedad en un animal, que comprende la administración de una cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación a un animal. Por ejemplo, el tratamiento puede implicar la reducción de una población microbiana patógena en un animal. Patógenos ejemplares que pueden reducirse incluyen, sin limitarse a *Acinetobacter*, bacilos, *Borrelia*, *Campylobacter*, *Clostridia*, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, virus de la fiebre aftosa, gonorrea, *Hemofilus*, virus de la gripe, *Mannheimia*, micobacterias, *Mycoplasma*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Estafilococo* y *Estreptococo*. Enfermedades ejemplares incluyen, pero no se limitan a, colibacilosis, salmonelosis, enteritis necrótica, coccidiosis, gripe, enfermedad de la fiebre aftosa, síndrome reproductivo y respiratorio porcino, neumonía bovina de fiebre de embarque, infección de vías urinarias, obesidad/síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2.

Cepas *B. texasporus* deficientes de esporulación, designadas como PTA-12307 (Cepa MYG113), PTA-12308 (Cepa MYG110), PTA-12309 (Cepa MYG107) y PTA-12310 (Cepa MYG11) fueron depositadas el 07 de diciembre de 2011. Todas estas cepas han sido depositados en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest, con la Colección de Cultivo Americano (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-

2209, USA) e incorporados por referencia.

La presente invención también se relaciona con al menos una cepa bacteriana perteneciente al género *Brevibacillus* seleccionado del grupo que consiste de al menos uno de PTA-12307, PTA-12308, PTA-12309 y PTA-12310.

Un enfoque que puede utilizarse para inactivar las células de la invención implica el crecimiento de las células en un medio apropiado y, a continuación, agregar ingredientes de alimentación al cultivo o el cultivo a los ingredientes de alimentación para deshidratar las células.

Otro enfoque (además de choques de calor) que puede utilizarse para inactivar las células de la invención implica someter a las células a un pH extremo, como un pH de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13 o aproximadamente 14.

Cambios suficientes en el pH para inactivar las células de la invención pueden lograrse mediante la adición de una base, ácido y/u otra composición para desplazar efectivamente el pH más allá de un rango fisiológicamente tolerado. Por ejemplo, dióxido de carbono puede disolverse en agua para producir ácido carbónico y bajar el pH para causar la inactivación de las células.

Otro enfoque que puede utilizarse para inactivar las

células de la invención es el procesamiento de alta presión (también conocido como "tratamiento de alta presión" o "tratamiento de ultra alta presión" o "esterilización de ultra alta presión"), que es un proceso que puede implicar la
5 aplicación de presiones en el rango de 100-1,000 MPa (145,000-14,500 psi) o 150-600 MPa (25,000 a 90,000 psi) para eliminar las células vegetativas de bacterias, moho y similares de productos donde existen estas células.

Un ejemplo de un tratamiento de alta presión es el
10 enfoque de prensa francesa (prensado francés) que interrumpe la célula aplicando una presión a una suspensión celular (hasta 40,000 psi) y entonces de repente liberando la presión. Así, se puede inactivar la cepa deficiente de esporulación de la invención por la aplicación y liberación
15 de una presión de aproximadamente 40,000 psi, 20,000, 10,000, 5,000, 2,000, 1,000 psi y cualquier combinación de éstas.

Sin embargo otro enfoque que puede utilizarse para inactivar las células de la invención implica someter las células a un alcohol a una concentración final de
20 aproximadamente el 70%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 20%, aproximadamente 10%, aproximadamente 5%, aproximadamente 2%, o aproximadamente el 1% (v/v).

25 Sin embargo otro enfoque que puede utilizarse para

inactivar las celdas de la invención implica someter a las células a un detergente a una concentración final de aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 2%, aproximadamente el 1%, aproximadamente el 0.5%, aproximadamente el 0.2% o aproximadamente el 0.1% (p/v).

Sin embargo otro enfoque que puede utilizarse para inactivar las células de la invención implica someter las células a deshidratación por reducción del contenido de agua en las células vecinas de *B. texasporus* del entorno a un nivel por debajo de aproximadamente el 80%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 2% o aproximadamente el 1%.

En una modalidad ejemplar, un cultivo de células deficientes de esporulación según la invención se prepara, trata por uno o más métodos de inactivación y se aplica a la alimentación animal. Por ejemplo, un cultivo de células deficientes de esporulación puede cultivarse mediante un sistema de alto rendimiento y, a continuación, se seca por aspersion para producir un polvo. En este escenario, el

secado por aspersión se utiliza para inactivar las células y producir un producto que puede agregarse a las poblaciones de alimento seco. Alternativamente, el cultivo de células puede ser inactivado por adición de calor y/o presión, como durante
5 el proceso de preparación de alimentación de pellets.

En otra modalidad ejemplar, un cultivo de células deficientes de esporulación de acuerdo a la invención, como MYG107, MYG110 o MYG113, se cultiva en un medio líquido y después se agrega a una mezcla de ingredientes de alimento de
10 animales sustancialmente seca o, a granos de alimentación de animales para producir una mezcla con un contenido de humedad final entre aproximadamente 10% y aproximadamente 25% (en relación con los sólidos), la mezcla humedecida, a continuación, se ejecuta a través de un molino de pellets
15 para producir pellets de tamaño adecuado, que luego se secan con un contenido de humedad final, por ejemplo, aproximadamente del 5%. En este ejemplo, la adición de células a la mezcla de ingredientes de alimento de animal sustancialmente seca proporciona una forma de deshidratación
20 que luego se acentúa por la adición de calor y el secado de los pellets. Bajo estas condiciones se cree que todas o casi todas las células serán inactivadas.

En otra modalidad ejemplar, ingredientes de alimentación, incluyendo maíz amarillo #2, harina de soya,
25 cáscaras de arroz, productos proteicos procesados, fosfato de

piedra caliza en polvo, sal, grasa animal líquida y colina líquido se utilizan para producir un alimento que contiene células inactivadas de la invención. Un lote de alimento generalmente se prepara mezclando los ingredientes en polvo o molidos secos en un estado homogéneo y, a continuación, agregando los ingredientes líquidos, que pueden incluir una cultivo deficiente de esporulación de las células *B. texasporus* (una forma de deshidratación). La mezcla humedecida es transmitida a una cámara de condicionamiento, donde vapor se agrega (proporcionando una forma de choque de calor) y la alimentación se convierte en una mescolanza. Esta mescolanza es mezclada exhaustivamente antes de la granulación y la entrada en el molino de pellets. En el molino de pellets, la mescolanza suave y caliente es forzada a través de un troquel y formada en los pellets formados en cilindro. Los pellets son enviados a un enfriador/secador, donde un ventilador extrae el aire a través del lecho de pellets para quitar humedad (deshidratar adicional) y el calor de los pellets. Un transportador y ascensor de cubo pueden utilizarse para mover el alimento a un proceso de recubrimiento líquido, donde grasa animal se rocía sobre la alimentación en aproximadamente 2% en peso. La alimentación terminada, a continuación, está lista para usarse.

En otra modalidad ejemplar, aproximadamente 1.0×10^{10} , 1.0×10^{11} , 1.0×10^{12} , 1.0×10^{13} , 1.0×10^{14} o 1.0×10^{15}

células inactivadas de una cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación se agregan a unos 1000 kg de alimento para animales.

En otra modalidad ejemplar, una dosis efectiva de
5 las células *B. texasporus* deficientes de esporulación se
administra a un animal. En otra modalidad aún ejemplar, una
dosis efectiva en agua o en alimento de las células *B.*
texasporus deficientes de esporulación comprende péptidos BT
entre aproximadamente 5 ppm y aproximadamente 1000 ppm, entre
10 aproximadamente 15 ppm y aproximadamente 1000 ppm, entre
aproximadamente 20 ppm y aproximadamente 1000 ppm, entre
aproximadamente 5 ppm y aproximadamente 100 ppm, entre
aproximadamente 10 ppm y aproximadamente 100 ppm, entre
aproximadamente 20 ppm y aproximadamente 100 ppm, entre
15 aproximadamente 5 ppm y aproximadamente 75 ppm, entre
aproximadamente 10 ppm y aproximadamente 75 ppm, entre
aproximadamente 20 ppm y aproximadamente 75 ppm, entre
aproximadamente 5 ppm y aproximadamente 50 ppm, entre
aproximadamente 10 ppm y aproximadamente 50 ppm o entre
20 aproximadamente 20 ppm y aproximadamente 50 ppm.

En otra modalidad ejemplar, la deshidratación de una
cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación de la invención
se realiza por; secado por congelamiento, secado al vacío,
secado por aspersión, deshidratación osmótica, deshidratación
25 de lecho fluidizado, deshidratación por evaporación de

27

solvente, deshidratación asistida por sonicación, deshidratación asistida por microondas, deshidratación asistida por RF y/o combinaciones de los mismos.

En otra modalidad ejemplar, la deshidratación de las células *B. texasporus* deficientes de esporulación o cultivo se realiza por adición de una sustancia de absorción de agua (por ejemplo, un ingrediente de alimentación), calor (como el generado en un proceso de granulación de alimento para animales) y/o evaporación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 ilustra el consumo de los péptidos BT por esporas de PTA-5854. PTA-5854 fue inoculado en LB y crece en un agitador de aire a 37°C. Las muestras fueron tomadas cada día y los péptidos BT fueron extraídos y ensayados para actividades. Una unidad artificial es de 0.8 ug/ml de péptidos BT. En el día 3, el cultivo se dividió en tres alícuotas (# 1, # 2 y # 3). La alícuota # 1 fue no tratada. La alícuota # 2 fue irradiada con UV en un reticulador de UV durante 10 minutos. La alícuota # 3 fue hervida durante 10 minutos. Las alícuotas luego fueron incubadas en el agitador de aire a 37°C.

La figura 2 muestra el crecimiento de las aves durante la primera (1) y segunda (2) prueba.

La figura 3 muestra el peso promedio de aves

combinado de ambas pruebas en el día 20 (media $\pm$ SE). N = 39-42 de aves desafiadas por tratamiento y N = 16-19 de aves no desafiadas por tratamiento. * $p \leq 0.05$.

La figura 4 muestra las relaciones promedio de conversión de alimento de ambas pruebas como se mide para el tratamiento de alimentación completa (media $\pm$ SE, N = 3 corrales/tratamiento/aves desafiadas por prueba, N = 1 corrales/tratamiento/aves no desafiadas por prueba) (1 = prueba 1, 2 = prueba 2). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

La figura 5 muestra el promedio de la longitud del intestino delgado (media $\pm$ SE) en aves desafiadas-Eimeria (N = 20-24) y para aves no desafiadas (N = 8) de ambas pruebas (1 = prueba 1, 2 = prueba 2).

La figura 6 muestra la relación promedio del peso del saco al peso del ave (media $\pm$ SE) en las aves desafiadas-Eimeria (N = 10-12) y aves no desafiadas (N = 4).

La figura 7 muestra los resultados puntaje de lesión Eimeria (media $\pm$ SE) para el control (N = 8) y en el grupo de péptidos BT (N = 12). Hay una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($p = 0.098$).

La figura 8 muestra el porcentaje promedio de materia seca del digesto de íleon (media $\pm$ SE) en aves desafiadas (N = 5-6 grupos por tratamiento) y las aves no desafiadas (N = 2 grupos por tratamiento).

La figura 9 muestra el porcentaje promedio de

materia seca del digesto del intestino ciego (media $\pm$ SE) en aves desafiadas (N = 4-6 grupos por tratamiento) y en las aves no desafiadas (N = 2 grupos por tratamiento).

5 La figura 10 muestra el conteo microbiano total (media $\pm$ SE) en el íleon de aves desafiadas (N = 5-6 grupos por tratamiento) y de las aves no desafiadas (N = 2 grupos por tratamiento).

10 La figura 11 muestra el conteo microbiano total en el intestino ciego (media $\pm$ SE) de aves desafiadas (N = 5-6 grupos por tratamiento) y de las aves no desafiadas (N = 2 grupos por tratamiento).

15 La figura 12 muestra la cantidad de microbios diferentes en el íleon de aves desafiadas-Eimeria de ambas pruebas N = 5-6 grupos por tratamiento). Control de valor-P vs. BT, prueba 1 = 0.037.

La figura 13 muestra la cantidad de microbios diferentes en el íleon de aves no desafiadas de ambas pruebas (N = 2 grupos por tratamiento). No hay diferencias significativas entre los grupos.

20 Figura 14 muestra la cantidad de microbios diferentes en intestino ciego de aves desafiadas-Eimeria de ambas pruebas N = 5-6 grupos por tratamiento). No hay diferencias significativas entre los grupos.

25 La figura 15 muestra la cantidad de microbios diferentes en el intestino ciego de aves no desafiadas de

ambas pruebas N = 2 grupos por tratamiento). No hay diferencias significativas entre los grupos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 Como se utiliza en el presente y en las reivindicaciones anexadas, las formas singulares, por ejemplo, "un", "uno" y "el/la", incluye el plural, a menos que el contexto claramente dicte lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "una bacteria *B. texasporus*" incluye una
10 pluralidad de tales bacterias, y la referencia a una "célula" es también una referencia a una pluralidad de células similares y sus equivalentes.

 En este documento, "aproximadamente" significa razonablemente cerca, aproximadamente, o un poco más o menos
15 que el número indicado o cantidad.

 Como se utiliza en el presente, "animal" significa cualquier invertebrado o vertebrado, incluyendo caballos, cabras, ovejas, ganado, cerdos, pollos, pavos, gallinas de caza, gansos, patos, perros, gatos, loros, peces, cangrejos,
20 camarones, tortugas de agua dulce, los seres humanos y lo similar.

 En este documento, "alimento" o "comida" significa cualquier sustancia o mezcla de sustancias que contiene aminoácidos, antioxidantes, carbohidratos, condimentos,
25 enzimas, grasas, minerales, productos de nitrógeno sin

proteínas, proteínas, vitaminas y/o aglutinantes y puede
contener agentes de granulación, colorantes, espumantes y/o
saborizantes, fabricados, vendidos o presentados para su
consumo por animales como el ganado y animales domésticos o
5 un ser humano, para proporcionar al menos una parte de las
necesidades nutricionales de los animales o humanos, y/o con
el fin de prevenir o tratar trastornos nutricionales en el
animal. Como nutriente esencial, el agua se considera un
ingrediente de alimento y una bebida acuosa es un alimento o
10 comida.

En este documento, "inactivar" o "inactivación"
significa cualquier tratamiento o estrés, como la inanición,
choque de temperatura, deshidratación/liofilización/secado
(por ejemplo, secado con calor, secado por congelamiento,
15 secado por aspersión, secado en el sol, secado en el aire y/o
secado por vacío), cambios de pH (por ejemplo, acidificación
o alcalinación), tratamiento de alcohol, tratamiento con un
detergente, filtración, tratamiento con metales como la plata
y el zinc, tratamiento con presión tales como procesamiento
20 de alta presión, interrupción enzimática (por ejemplo, el
tratamiento con lisozima), fuerza mecánica (por ejemplo,
sonicación), tratamiento con cationes de amonio cuaternario,
agentes oxidantes (por ejemplo, óxido de cloro, peróxido de
hidrógeno, hipoclorito y/ ozono), salinización, tratamiento
25 de campo eléctrico, tratamiento de microondas, tratamiento de

haz de electrones, irradiación y/o combinaciones de los mismos, que es generalmente incapaz de matar esporas y que reduce la eficiencia formadora de colonia relativa (tasa de supervivencia) de un cultivo a menos de aproximadamente 1×10^{-3} , menos de aproximadamente 1×10^{-4} , menos de aproximadamente 1×10^{-5} , menos de aproximadamente 1×10^{-6} , menos de aproximadamente 1×10^{-7} , menos de aproximadamente 1×10^{-8} , o menos de aproximadamente 1×10^{-9} .

Como se usa en este documento, "células inactivadas o cultivo" de una cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación significa una mezcla de células *B. texasporus* no viables, contenido celular al menos parcialmente liberado y/o ingredientes de medio de cultivo. Debe señalarse que la inactivación de una cepa deficiente de esporulación de la invención puede dar lugar a la lisis de muchas, más o todas las células, dependiendo de las condiciones de inactivación utilizadas. Por lo tanto, una "célula inactivada", "cultiva inactivada" y frases equivalentes, incluido dentro de su significado un lisado celular producido, al menos en parte, por el proceso de inactivación.

En este documento, "mutación" significa cualquier cambio en la secuencia de un ácido nucleico, incluyendo inserciones, eliminaciones, transiciones y cruzamientos de uno o más nucleótidos. El tamaño de la eliminación o inserción puede variar desde un solo nucleótido a muchos

genes.

En este documento, "fenotipo" significa las características observadas bioquímicas, fisiológicas y/o morfológicas de una célula o cultivo de células.

5 Como se utiliza en el presente, "deficiente de esporulación" se refiere a una cepa bacteriana que exhibe cualquier defecto detectable en el proceso de formación de esporas o producto en comparación con la cepa de contraparte tipo salvaje (wt), totalmente competente de esporulación. El
10 término "deficiente de esporulación" por lo tanto se refiere a cualquier cepa que tiene una sensibilidad a un estrés como inanición, choque de temperatura, deshidratación, acidificación, alcalinación, alcoholes, detergentes, lisozima, fuerza mecánica, cationes de amonio cuaternario,
15 agentes oxidantes y/o irradiación que reduce la colonia relativa formando eficiencia (tasa de supervivencia) de un cultivo a menos de aproximadamente 8.1×10^{-7} , menos de aproximadamente 3.5×10^{-3} , menos de aproximadamente 1×10^{-4} , menos de aproximadamente 1×10^{-5} , menos de aproximadamente 1
20 $\times 10^{-6}$, menos de aproximadamente 1×10^{-7} , menos de aproximadamente 1×10^{-8} o menos de aproximadamente 1×10^{-9} , que incluye células incompetentes de esporulación y sustancialmente de esporulación deficiente o fraseadas de otra manera, células donde no se forman esporas porque la
25 cepa no es capaz, o las células tienen una capacidad

disminuida de formar esporas o células donde esporas se forman, pero las esporas pueden no ser viables o las esporas son sensibles a un estrés de inactivación y las hacen inviables a la exposición a esto. Deficiencias de esporulación pueden medirse por cualquiera de los métodos descritos, por ejemplo, un cultivo activamente creciente puede ser sujeto a un choque térmico de aproximadamente 50°C o aproximadamente 70°C por unos cinco minutos y la colonia relativa formando eficiencia medida contra un cultivo sin tratar o una alícuota del cultivo que no ha sido sometido a choques de calor.

"Inanición" es una privación de nutrientes que provoca una reducción en el número de células activas o vegetativas (y estimula la formación de esporas y/o muerte celular). Las células *B. texasporus* tipo silvestre experimenta esporulación al menos en parte para sobrevivir la inanición, pero las células *B. texasporus* deficientes de esporulación no pueden evitar la muerte celular provocada por inanición. Así, un cultivo inactivado de una cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación puede obtenerse simplemente por inoculación de la cepa en un medio de crecimiento e incubación de la cepa durante un período prolongado de tiempo tal que las células mueren de hambre después de la fase de crecimiento inicial.

En este documento "choque de temperatura" significa

un calor de aproximadamente 50°C a aproximadamente 100°C, frío de aproximadamente 0°C a aproximadamente 16°C o congelamiento.

"Deshidratación" se define como cualquier proceso o
5 tratamiento que lleva a una reducción del contenido de agua en las células *B. texasporus* circundantes en el medio ambiente, choque osmótico, por ejemplo, reducción del contenido de agua en el entorno circundante a un nivel por debajo de aproximadamente el 80%, aproximadamente el 70%,
10 aproximadamente el 60%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%,
15 aproximadamente el 5%, aproximadamente el 2% o aproximadamente el 1%.

Una cantidad efectiva de células de la invención preferentemente está determinada por un médico o veterinario basado en factores tales como el tamaño del animal, edad,
20 peso y/o condición médica.

La formación de esporas en PTA-5854 limita el nivel de rendimiento de los péptidos BT, puesto que las esporas PTA-5854 parecen degradar los péptidos BT. Sin querer ligarse por una teoría, parece que esa formación de esporas y/o
25 activación de esporas reduce la producción de los péptidos BT

por PTA-5854. Como se muestra en la figura 1, el cultivo
continúo de PTA-5854 en cultivo LB más allá de 3 días a 37°C,
momento en el que al menos ha comenzado el agotamiento de los
nutrientes, resulta en una disminución de los péptidos BT
5 (#1). Este agotamiento de péptido BT podría evitarse por
irradiación UV en el día 3, que mató ambas células activas
(vegetativas) y esporas (#2). Sin embargo, el agotamiento de
BT no podría ser evitado por ebullición el día 3, que sólo
mató a las células activas pero no inactivar las esporas
10 (#3).

Además de la reducción en los niveles de péptido BT,
la formación de esporas en PTA-5854 impide que el método más
económico utilice la cepa como un aditivo de alimentación. En
particular, el uso de los péptidos BT como un aditivo de
15 alimentación requiere un costo de producción bajo, que
prácticamente descarta cualquier paso de purificación de
péptidos. Como resultado, el aditivo de alimentación más
económico basada en BT sería un cultivo *B. texasporus*
deshidratado. La deshidratación sólo puede inactivar células
20 vegetativas pero no las esporas de *B. texasporus*, por lo
tanto, la deshidratación no puede inactivar una cepa hábil de
esporulación. Además, las esporas de esa cepa pueden germinar
y agotar péptidos BT circundantes, donde la degradación de
los péptidos BT por las esporas de germinación también poseen
25 un problema grave para la estabilidad de cualquier producto

de alimentación.

Finalmente, un aditivo de alimentación que contiene esporas *B. texasporus* pueden no satisfacer las preocupaciones de estándares y causas reglamentarias con respecto a la
5 dispersión de la cepa productora. Como resultado es altamente deseable poder efectivamente desactivar o eliminar las esporas.

Sin embargo, *B. texasporus* continuamente forma esporas que son difíciles de eliminar o inactivar. Técnicas
10 comunes que podrían utilizarse para inactivar *B. texasporus* y las esporas resultantes incluyen, radiación gamma, esterilización en autoclave y otros tratamientos extremos. Aunque la radiación gamma es eficaz en la eliminación de esporas sin dañar los péptidos BT en particular configuración
15 física, se considera generalmente ni práctica ni rentable por la industria. Esterilización en autoclave es otro método efectivo para eliminar las esporas, pero el proceso daña los péptidos BT, lo que hace que este método sea indeseable.

Un método más práctico y rentable de inactivación de
20 células en un entorno industrial es un breve tratamiento de calor moderado (tal como la pasteurización, por ejemplo, 70°C durante 30 minutos) y/o deshidratación, que pueden soportar los péptidos BT. Ya que esporas *B. texasporus* son muy resistentes al tratamiento térmico (las esporas pueden
25 resistir niveles de estrés importantes, tales como la

ebullición a 100°C durante 60 minutos, tabla 1 y deshidratación, tabla 2), una cepa deficiente de esporulación sensible a temperatura moderada y/o deshidratación es necesaria para el uso práctico y/o rentable de *B. texasporus*,
5 tal como para un DFM. La presente invención proporciona una cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación que puede inactivarse utilizando técnicas seguras para el péptido BT, tales como la pasteurización, granulación, liofilización y/o secado, en donde las condiciones de inactivación son capaces
10 de inactivar células vegetativas, pero generalmente no esporas tipo silvestre.

Ejemplos de técnicas útiles para la inactivación de células vegetativas incluyen, pero no se limitan a, inanición, choque de temperatura (calor tal como
15 pasteurización o frío como congelamiento), deshidratación/liofilización/secado (por ejemplo, secado con calor, secado por congelamiento, secado por aspersión, secado en el sol, secado en el aire y/o secado por vacío), cambios de pH (por ejemplo, acidificación o alcalinación),
20 tratamiento de alcohol, tratamiento con un detergente, filtración, tratamiento con metales como la plata y el zinc, tratamiento con presión tales como procesamiento de alta presión, interrupción enzimática (por ejemplo, el tratamiento con lisozima), fuerza mecánica (por ejemplo, sonicación),
25 tratamiento con cationes de amonio cuaternario, agentes

oxidantes (por ejemplo, óxido de cloro, peróxido de hidrógeno, hipoclorito y/o ozono), salinización, tratamiento de campo eléctrico (pulso) mediante el uso de energía de radiofrecuencia (RF), tratamiento de microondas, tratamiento de haz de electrones, irradiación (por ejemplo, UV, rayos X o rayos gamma) y combinaciones del mismo. En una modalidad ejemplar una o más de estas técnicas pueden utilizarse para inactivar las células deficientes de esporulación de la invención.

Según el mejor conocimiento del inventor, no hay ninguna publicación que documente una deficiencia de esporulación que cumpla el estándar reglamentario percibido por un DFM inactivado a una tasa de supervivencia de estrés de $< 10^{-6}$, $< 10^{-7}$, $< 10^{-8}$, o $< 10^{-9}$. Por ejemplo, en publicaciones académicas, una tasa de supervivencia de estrés de bacilo en 10^{-2} se llama deficiente de esporulación (LEE et. al., 2001); considerando que métodos publicados en patentes de E.U.A. emitidas 4,302,544, 4,450,235, 4,450,236, 4,465,773, 6,284,490 y 7,655,452 sólo podrían producir cepas de bacilos deficientes de esporulación ("asporugenus" o "asporugénico") con una tasa de supervivencia de estrés en el orden de 10^{-7} . Por lo tanto, la técnica para producir cepas de bacilo con una deficiencia de esporulación a una tasa de supervivencia de estrés de $< 10^{-9}$ parece ser deficiente. La necesidad de crear esa técnica fue grande teniendo en cuenta

40

el hecho de que el método de eliminación de genes más potente no es una elección adecuada (y el método sólo utilizable de mutagénesis es un químico que provoca en su mayoría mutaciones puntuales silenciosas o "agrietadas") por dos

5 razones. En primer lugar, *B. texasporus* es un organismo no genéticamente tratable y no se puede realizar una eliminación de genes. En segundo lugar, una cepa nocaout de gen resultante sería un organismo genéticamente modificado (GMO) que está prohibido en la alimentación humana en regiones como la Unión

10 Europea. En otra modalidad ejemplar, el método de inactivación es suficiente para reducir la tasa de supervivencia de una cepa deficiente de esporulación según la invención a menos de aproximadamente 1×10^{-4} , menos de aproximadamente 1×10^{-5} , menos de aproximadamente 1×10^{-6} ,

15 menos de aproximadamente 1×10^{-7} , menos de aproximadamente 1×10^{-8} , o menos de aproximadamente 1×10^{-9} , pero en donde el método de inactivación es insuficiente para reducir la tasa de supervivencia de PTA-5854 competente de esporulación abajo de aproximadamente 3.3×10^{-1} o debajo de aproximadamente 4.3

20 $\times 10^{-1}$.

Ejemplo 1

Un intento de aislar un mutante deficiente de esporulación de PTA-5854 se hace como sigue. Células PTA-5854

25 fueron mutagenizadas con EMS y luego colocadas en placas de

LB-agar. Aproximadamente 50,000 colonias fueron seleccionadas para sensibilidad al tratamiento a 75°C durante 1 hora y 42 cepas candidato sensibles a la temperatura fueron aisladas. Estas cepas candidato iniciales fueron purificadas de colonia y re-analizadas para sensibilidad al calor. La cepa PTA-5854 y las cepas candidato sensibles a la temperatura fueron cultivadas en medio líquido de LB a 37°C durante tres días. Las células fueron luego dispensadas en tubos de microfuga estériles como alícuotas de 100 µl e incubadas a distintas temperaturas (75, 70, 65, 60, 55, 50 o 37°C) por diferentes longitudes de tiempo (5, 15, 30 o 60 minutos). Las células tratadas fueron colocadas en placas LB-agar y se incubaron a 37°C durante la noche para determinar la eficiencia de platinado. La tasa de supervivencia después de un tratamiento de choque térmico se calculó como la eficiencia de platinado en placas después del choque térmico dividido por la eficiencia de platinado a 37°C sin choques de calor.

De los 42 aislados iniciales, se confirmaron varios mutantes sensibles a la temperatura. La cepa B7 mostró el mejor fenotipo sensible a la temperatura (tabla 1). Un breve tratamiento de 5 minutos a 50°C se traduce en una tasa de supervivencia de 8.1×10^{-7} (aproximadamente 1×10^{-6}), y las temperaturas más altas e incubaciones más largas no disminuyen la tasa de supervivencia significativamente. Este nivel de inactivación celular es considerado inadecuado para

propósito de utilizar *B. texasporus* como un DFM. Mutagénesis repetida y aislamientos mutantes de PTA-5854 no producen una cepa que tiene un mejor fenotipo sensible a la temperatura que B7. Se razonó que más de una mutación podría ser
5 necesaria para un fenotipo sensible a la temperatura más estrecho que permite una inactivación celular más eficiente. Sin embargo, la mutagénesis de B7 no produce mutantes con un fenotipo mejorado sensible a la temperatura, posiblemente debido a la mala salud de B7 (relativo a PTA-5854 parental).

10

Tabla 1. Sensibilidades a la temperatura de células *B. texasporus* (como cultivos de caldo-L de dos días)

15

20

Cepa	Genotipo	Sensibilidad a la temperatura		
		Temperatura (°C)	Duración (min)	tasa de supervivencia
PTA-5854	Spo+++	100	60	3.3 x10 ⁻¹
PTA-5854	Spo+++	75	60	4.3 x10 ⁻¹
B7	Spo-	50	5	8.1 x10 ⁻⁷
B7	Spo-	75	5	1.2 x10 ⁻⁶
MYG11 (PTA-12310)	Spo+/-	50	5	3.5 x10 ⁻³
MYG11 (PTA-12310)	Spo+/-	75	5	3.7 x10 ⁻³
MYG107 (PTA-12309)	Spo---	50	5	<10 ⁻⁹
MYG110 (PTA-12308)	Spo---	50	5	<10 ⁻⁹
MYG113 (PTA-12307)	Spo---	50	5	<10 ⁻⁹

25

Una nueva cepa bacteriana (MYG11, número de acceso PTA-12310) fue aislada de una muestra de suelo. La secuenciación S16 ADNr de esta cepa muestra que es de la

misma especie como PTA-5854, pero posee un fenotipo significativamente diferente con respecto a un tratamiento térmico. MYG11 crece rápidamente en medio de caldo-L a 37°C y demuestra una sensibilidad inicial a alta temperatura, o una
5 deficiencia de esporulación. Un tratamiento a 50°C durante 5 minutos se tradujo en una tasa de supervivencia de 3.5×10^{-3} (tabla 1). Por lo tanto, MYG11 fue mutagenizado y aproximadamente 50,000 colonias fueron seleccionadas para mutantes que muestran mayor sensibilidad a la temperatura. Al
10 menos tres mutantes, MYG107 (número de acceso PTA-12309), MYG110 (número de acceso PTA-12308) y MYG113 (número de acceso PTA-12307), fueron aislados por este método y se encontró que muestran deficiencias de esporulación severas. En contraste con PTA-5854 y B7, el tratamiento a una
15 temperatura de 50°C durante 5 minutos resulta en tasas de supervivencia para MYG107, MYG110 y MYG113 inferior a 10^{-9} . Así, la invención proporciona cepas *B. texasporus* que tienen una tasa de supervivencia inferior a aproximadamente 10^{-8} o aproximadamente 10^{-9} cuando se expone a una temperatura de al
20 menos 50°C durante al menos 5 minutos.

MYG107 tiene un tiempo de duplicación de aproximadamente 45 minutos en una cultivo de caldo-L de fase log y se caracterizó además. Dado que la tasa de supervivencia de MYG107, MYG110 y MYG113 están en o por
25 debajo del límite detectable de los cultivos utilizados en

este experimento, se cree que MYG107, MYG110 y MYG113 tienen un defecto fundamental en esporulación, son cepas altamente deficientes de esporulación, que es apoyado además por el hecho de que el rendimiento BT de MYG107 se cree que es más del triple en comparación con PTA-5854.

Además, las endosporas laterales típicas son detectables en un cultivo de PTA-5854 en casi todas las etapas. Tales endosporas laterales no han sido observadas en cultivos de MYG107 en cualquier etapa, apoyando la idea de que MYG107 tiene un defecto fundamental en la esporulación. Además, MYG107 muestra sensibilidad a otros tipos de estrés que inactivan las células vegetativas pero no las esporas (tabla 2).

Tabla 2. Sensibilidades a la temperatura de células B. texasporus (como cultivos de caldo-L de dos días)

Estrés	Cepa	Tasa de supervivencia
Congelamiento (-20°C durante 1 h)	PTA-5854	4.2 x10 ⁻¹
	MYG107	<10 ⁻⁹
pH 1.0 (transitorio, a temperatura ambiente)	PTA-5854	4.5 x10 ⁻¹
	MYG107	<10 ⁻⁹
pH 13.0 (transitorio, a temperatura ambiente)	PTA-5854	5.1 x10 ⁻¹
	MYG107	<10 ⁻⁹
1% Butanol (transitorio, a temperatura ambiente)	PTA-5854	5.6 x10 ⁻¹
	MYG107	<10 ⁻⁹

5

10

15

20

25

Estrés	Cepa	Tasa de supervivencia
1% SDS (transitorio, a temperatura ambiente)	PTA-5854	3.3×10^{-1}
	MYG107	$<10^{-9}$
1% peroxide de hidrógeno (transitorio, a temperatura ambiente)	PTA-5854	3.3×10^{-1}
	MYG107	$<10^{-9}$
Lisozima (1 mg/ml a 37°C durante 1 h)	PTA-5854	7.2×10^{-1}
	MYG107	$<10^{-9}$
Presurización francesa (tres veces, a temperatura ambiente)	PTA-5854	1.5×10^{-1}
	MYG107	$<10^{-9}$
Inanición (durante 7 días a 37°C)	PTA-5854	3.3×10^{-3}
	MYG107	$<10^{-9}$
Deshidratación (en velocidad de vacío a 23°C durante 1 h)	PTA-5854	3.9×10^{-1}
	MYG107	$<10^{-9}$

En una prueba de sensibilidad al congelamiento, la cepa tipo silvestre PTA-5854 y MYG107 fueron cultivados en medio líquido LB a 37°C durante dos días, y las células fueron luego dispensadas en tubos de microfuga estériles como alícuotas de 100 µl y se incuban a -20°C durante 60 minutos (o en la formación de hielo). Las células sin tratar y tratadas con congelamiento fueron colocadas en placas en LB-agar y se incuban a 37°C durante la noche para determinar la eficiencia del platinado. Se calculó la tasa de supervivencia para el congelamiento (la eficiencia de platinado para las células tratadas / la eficiencia de platinado de células no tratadas). El congelamiento se tradujo en una tasa de

supervivencia de menos de aproximadamente 10^{-9} para MYG107 en comparación con la tasa de supervivencia de PTA-5854 en aproximadamente 4.2×10^{-1} .

En una prueba de sensibilidad a la acidificación, la
5 cepa PTA-5854 tipo silvestre y MYG107 fueron cultivados en medio líquido LB a 37°C durante dos días y las células fueron luego dispensadas en tubos de microfuga estériles como alícuotas de 100 µl. El pH fue ajustado a aproximadamente 1.0 (a temperatura ambiente) al añadir 10 µl de 1 M HCl a cada
10 alícuota y entonces inmediatamente se neutraliza mediante la adición de 10 µl de NaOH 1 M. Las células sin tratar y tratadas con ácido fueron colocadas en placas LB-agar y se incuban a 37°C durante la noche para determinar la eficiencia de platinado. La acidificación se tradujo en una tasa de
15 supervivencia de menos de 10^{-9} para MYG107 en comparación con una tasa de supervivencia de PTA-5854 en aproximadamente 4.5×10^{-1} .

Una prueba de sensibilidad de alcalinación se realizó de manera similar excepto que NaOH se agregó primero
20 para ajustar el pH a 13.0 luego se añadió HCl para neutralización. La alcalinación se tradujo en una tasa de supervivencia de aproximadamente menos de 10^{-9} para MYG107 en comparación con la tasa de supervivencia de PTA-5854 en aproximadamente 5.1×10^{-1} .

25 Se realizó una prueba de sensibilidad de alcohol de

manera similar excepto que butanol se agregó al 1% (v/v). El tratamiento con butanol se tradujo en una tasa de supervivencia menor de aproximadamente 10^{-9} para MYG107 en comparación con la tasa de supervivencia de PTA-5854 en
5 aproximadamente 5.6×10^{-1} .

Se realizó una prueba de sensibilidad al detergente en forma similar excepto que SDS fue añadido al 1% (p/v). El tratamiento con SDS resultó en una tasa de supervivencia de menos de aproximadamente 10^{-9} para MYG107 en comparación con
10 la tasa de supervivencia de PTA-5854 en aproximadamente 3.3×10^{-1} .

Una prueba de sensibilidad a la oxidación se realizó de una manera similar excepto que se añadió el peróxido de hidrógeno al 1% (p/v). El tratamiento de peróxido de
15 hidrógeno se tradujo en una tasa de supervivencia de menos de 10^{-9} para MYG107 en comparación con la tasa de supervivencia de PTA-5854 en aproximadamente 3.3×10^{-1} .

En una prueba de sensibilidad de la lisozima, cepa PTA-5854 tipo silvestre y MYG107 fueron cultivados en medio
20 líquido LB a 37°C durante dos días, y las células fueron luego dispensadas en tubos de microfuga estériles como alícuotas de 100 µl. Lisozima se agregó a una concentración de 1 mg/ml y las células se incubaron a 37°C durante 60 minutos. Las células sin tratar y tratadas con lisozima
25 fueron colocadas en placas LB-agar y se incuban a 37°C

durante la noche para determinar la eficiencia de platinado. El tratamiento de la lisozima se tradujo en una tasa de supervivencia de menos de 10^{-9} para MYG107 en comparación con una tasa de supervivencia de PTA-5854 en aproximadamente 7.2×10^{-1} .

En una prueba de sensibilidad a la presión, la cepa PTA-5854 de tipo silvestre y MYG107 fueron cultivadas en medio líquido LB a 37°C durante dos días. Una parte del cultivo fue tratada con presión (a 40,000 psi) en una prensa francesa tres veces a temperatura ambiente. Se calculó la tasa de supervivencia para la presión francesa (la eficiencia de platinado de células tratadas / la eficiencia de platinado de células sin tratar). El tratamiento con presión francesa resultaron en una tasa de supervivencia de menos de 10^{-9} para MYG107 en comparación con una tasa de supervivencia de PTA-5854 en aproximadamente 1.5×10^{-1} .

En una prueba de sensibilidad a la inanición, la cepa PTA-5854 tipo silvestre y MYG107 fueron cultivadas en medio líquido LB a 37°C durante siete días. Se calculó la tasa de supervivencia de inanición (la eficiencia de platinado en el día 7 / la eficiencia de platinado en el día 2). El tratamiento de inanición resultó en una tasa de supervivencia de menos de aproximadamente 10^{-9} para MYG107 en comparación con una tasa de supervivencia de PTA-5854 en aproximadamente 3.3×10^{-1} .

En una prueba de sensibilidad a la deshidratación, la cepa PTA-5854 tipo silvestre y MYG107 fueron cultivadas en medio líquido LB a 37°C durante dos días, y las células fueron entonces dispensadas en tubos de microfuga estériles como alícuotas de 100 µl y se someten a una velocidad de vacío durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las células secadas al vacío (se re-hidratan con 100 µl de agua destilada estéril) y células no tratadas fueron colocadas en placas LB-agar incubadas a 37°C durante la noche para determinar la eficiencia de platinado. Se calculó la tasa de supervivencia para secado al vacío (la eficiencia de platinado para células tratadas / la eficiencia de platinado de células no tratadas). El secado al vacío dio lugar a una tasa de supervivencia de menos de aproximadamente 10^{-9} para MYG107 en comparación con la tasa de supervivencia de PTA-5854 en aproximadamente 3.9×10^{-1} .

En otra prueba de sensibilidad a la deshidratación, la cepa PTA-5854 tipo silvestre y células MYG107 fueron inoculadas en medios de crecimiento que contienen harina de soya 10% y 20% respectivamente. Crecimiento celular se logró para ambas cepas en medio que contiene harina de soya 10% pero no en el medio que contiene harina de soya 20%. La dilución de los cultivos de harina de soya 20% con agua destilada estéril (1:1) restauró el crecimiento de PTA-5854 pero no MYG107, lo que indica que las células de una cepa *B*.

texasporus deficiente de esporulación requiere un nivel de contenido de agua de al menos aproximadamente 80% en el medio ambiente para mantener la viabilidad.

Las características de MYG107, MYG110 y MYG113 y el
5 método de creación de estas cepas, permiten que las cepas *B. texasporus* deficientes de esporulación se utilicen como un DFM económicamente viable. En particular, las cepas de la invención se proporcionan para el uso de varios métodos de inactivación que son incompatibles con la inactivación de
10 células *B. texasporus* tipo silvestre (por ejemplo, pasteurización y/o deshidratación), que proporciona cepas que pueden utilizarse como un DFM económicamente viable.

Las células *B. texasporus* inactivadas se compararon con péptidos purificados para demostrar que las células
15 inactivadas funcionaban equivalentemente a los péptidos purificados. Los péptidos BT se producen dividiendo activamente las células *B. texasporus*, que indica que los péptidos BT no son "metabolitos secundarios" producidos en respuesta a la inanición. En un cultivo LB, 10^6 células BT
20 contienen unos 10 microgramos de péptido BT. En otras palabras, 10^{11} células BT contendrán aproximadamente 1 gramo de péptido BT.

Se determina la concentración de péptido BT en células *B. texasporus* inactivadas y una cantidad de células
25 inactivadas equivalentes a una concentración deseada del

péptido purificado fue utilizada en el estudio. Pollitos recién salidos del cascarón fueron alimentados con dietas con diferentes concentraciones de péptidos BT purificados o células *B. texasporus* inactivadas durante dos días. En el día 3, los pollitos fueron inoculados con una cepa serovar Enteritidis *Salmonella* entérica (SE). En el día 4, los pollitos fueron sacrificados. El hígado y el bazo fueron cosechados y homogenizados. La presencia o ausencia de la cepa SE en el homogenado se determinó. Se encontraron aves que no recibieron algún péptido BT o células que tenían una tasa de infección SE del 60%, las aves que reciben 12 ppm de péptido purificado o una cantidad de células inactivadas equivalentes a 12 ppm tenían tasas de infección SE del 28% y 52% para el péptido purificado y 35% para las células inactivadas. Las aves que recibieron 24 ppm o la cantidad equivalente de las células inactivadas tuvieron tasas de infección del 36% y 16% para el péptido purificado y 25% con las células inactivadas. Las aves que recibieron 48 ppm o la cantidad equivalente de las células inactivadas tuvieron tasas de infección del 27% y 24% para el péptido purificado y 10% para las células inactivadas.

Los péptidos BT no purificados en las células inactivadas muestran la misma eficacia *in vivo* en impedir la invasión de órgano de *Salmonella* como proteínas purificadas. Por lo tanto, las células inactivadas *B. texasporus* son

equivalentes a los péptidos purificados.

Ejemplo 2

A fin de evaluar el efecto de péptidos BT grado
5 veterinario (integrado por células *B. texasporus* inactivadas
que contienen péptidos catiónicos inmunomoduladores BT) en la
prevención de la enteritis necrótica causada por un desafío
oral de *Clostridium perfringens* (tipo A), lesiones de
enteritis necrótica y/o mortalidad se obtienen en las aves
10 del desafío.

En el experimento 1, BT grado veterinario a
aproximadamente 24 ppm y aproximadamente 48 ppm suministrado
en los puntajes de lesión de enteritis necrótica de
alimentación reducida de 2.3 a 0.6 y 0.5 respectivamente,
15 mortalidad del 17% al 6% y 7%, respectivamente y recuperación
intestinal de *C. perfringens* de 3.60 a 2.36 y 2.48 ($\log_{10}$
cfu/g) respectivamente ($p \leq 0.05$).

En el experimento 2, BT grado veterinario en
aproximadamente 24 ppm y aproximadamente 48 ppm suministrado
20 en los puntajes de lesión de enteritis necrótica de
alimentación reducida de 2.8 a 0.8 y 0.6 respectivamente,
mortalidad del 21% al 5% y 1%, respectivamente y recuperación
intestinal de *C. perfringens* de 3.12 a 1.88 y 1.31 ($\log_{10}$
cfu/g) respectivamente ($p < 0.05$).

25 Estos resultados demuestran que las células *B.*

texasporus oralmente suministradas inactivadas son eficaces en la prevención de la enteritis necrótica en pollos.

Resultados:

5 Tabla 3. Prevención de entiritis necrótica en pollos con suministro oral de células inactivadas B. texasporus

10

Tratamiento ¹	Dosis	Puntaje de lesión ²	Mortalidad ³	Log ₁₀ cfu/g ⁴
Experimento 1:				
Dieta control	NA	2.3	17/100 (17%)	3.60 ^A
BT grado veterinario	24 ppm	0.6	10/150* (6%)	2.36 ^B
BT grado veterinario	48 ppm	0.5	11/150* (7%)	2.48 ^B
Experimento 2:				
Dieta control	NA	2.8	21/100 (21%)	3.12 ^A
BT grado veterinario	24 ppm	0.8	5/100* (5%)	1.88 ^B
BT grado veterinario	48 ppm	0.6	1/100* (1%)	1.31 ^B

15

20

1 Grupos de tratamiento representados por las 24 y 48 ppm son concentraciones de BT administradas desde el primer día.

25

2 Puntajes de lesión están representados por el medio del subconjunto de tratamiento *n = 25) con error de media cuadrado.

3 La mortalidad está representada por datos de
incidencia en comparación con el control positivo (dieta de
control) ($p < 0.05$).

4 Log₁₀cfu/g está representada por la media del
5 subconjunto de tratamiento ($n = 10$).

A-B medios dentro de la misma columna con ningún
superíndice común difieren significativamente ($p < 0.05$).

Materiales y métodos:

10 En el día del empollado, los pollitos fueron
obtenidos de Sanderson Farms (Bryan) y aleatoriamente se
dividieron en grupos experimentales y colocados en cada piso
que tiene corrales en anaqueles de pino limpios. Todos los
animales recibieron una dieta de arranque para pollos a base
15 de trigo entero comercial que cumplieron o superaron las
directrices de la NRC y agua ad libitum. Las aves se
alimentaron con dieta de control o dietas que contienen 24
ppm o 48 ppm de péptidos BT grado veterinario desde el primer
día hasta el día 24.

20 Varios aislados de *C. perfringens* (tipo A) obtenidos
de cajas de campo activas en Virginia, Carolina del Norte y
Georgia fueron utilizados en esta investigación. El aislado
fue cultivado en medio de tioglicolato. Medio de tioglicolato
estéril fue utilizado para inocular los pollos; las aves
25 fueron desafiadas una vez al día durante tres días (días 17-

19 después del empollado) por sonda oral (1.5 ml/desafío).

Cada lote de *C. perfringens* producido para el desafío fue diluido en serie y colocado en placas de agar SFP y luego se coloca en la incubadora a 37°C por 24 horas. Las
5 placas fueron entonces contadas y registradas a fin de determinar la cantidad de *C. perfringens* suministrados a las aves. Para medir cuantitativamente la recuperación de *C. perfringens*, se quitó una sección del intestino delgado; esta pieza de intestino fue craneal al divertículo de Meckel. Una
10 vez que se quitó el intestino fue colocado en una bolsa Whirl pak con 10 ml de tioglicolato y tragada durante 30 segundos. Luego 0.5 ml se eliminaron y colocaron en un tioglicolato anaeróbico y diluido en serie y colocados en SFP agar. El SFP agar fue preparado conforme a las instrucciones de la
15 etiqueta. Este medio es un medio de superposición que la capa inicial fue vertida varios días antes del experimento e incubada para probar la contaminación. La segunda capa se aplicó el día de la necropsia en condiciones aerobias, después que la muestra fue colocada en placas. Las placas
20 fueron transportadas luego en una caja modesta, y las placas se incubaron por 24 horas y se leyeron al día siguiente.

Para evaluar las lesiones graves asociadas con NE, se analizaron el yeyuno e íleon del intestino delgado. Se registran los puntajes de lesión utilizando los siguientes
25 criterios:

0 = sin lesiones graves, apariencia normal intestinal.

1 = Paredes delgadas o friable, gris de apariencia

2 = Necrosis focal, pared delgada, aspecto gris,
5 pequeñas cantidades de producción de gas.

3 = Paredes delgadas, parches considerables de necrosis, intestino llenado de gas, pequeñas manchas de sangre.

4 = Necrosis extensa severa, marcada hemorragia,
10 grandes cantidades de gas en el intestino.

Este estudio demuestra la eficacia de células *B. texasporus* inactivadas en el cebado del sistema inmunológico del animal antes de un desafío bacteriano y que un sistema inmunológico cebado responde más rápido o más eficazmente a
15 dicho desafío.

Ejemplo 3

BT grado veterinario (células *B. texasporus* inactivadas) son realmente no antibióticas, aunque las
20 células llevan los péptidos BT naturales que parecen tener una actividad antibiótica cuando se mide con una prueba *in vitro*. Sin embargo, se cree que la prueba *in vitro* produce un resultado artificial. BT no actúa como un antibiótico *in vivo*, en su lugar se cree que mejora/ceba el sistema
25 inmunológico del animal, explicando por qué niveles

bacterianos beneficiosos y comensales permanecen relativamente no afectados pero se reducen los niveles de bacterias perjudiciales en animales tratados con péptidos BT o células. Esto también explica por qué el BT grado veterinario oralmente suministrado (en células inactivadas) en 96 ppm no tiene impacto *in vivo* sobre lo que parecería, utilizando la prueba *in vitro*, para ser bacterias intestinales beneficiosas y comensales sensibles de BT (véase el ejemplo 4).

10

Ejemplo 4

El objetivo de este experimento fue evaluar la seguridad de alimentación de BT grado veterinario (células inactivadas *Brevibacillus texasporus* que contienen péptidos BT, contempladas como "péptido BT") a un alto nivel de 96 ppm en pollos con o sin el estrés de un desafío con *Eimeria maxima*. La prueba de alimentación fue realizada como dos pruebas separadas secuenciales.

20

Material y métodos:

Pollitos de engorda tipo Ross 508 fueron incubados en dos días separados aproximadamente un mes en una incubadora comercial. En ambas pruebas 66 gallos fueron transportados a la jaula de pollos. Los pollitos fueron pesados y enjaulados en grupos de cuatro o cinco. En el día

25

13 después de la llegada en las horas de los pollos las aves fueron trasladadas a cuatro habitaciones con dos corrales, con cada corral alojando ocho aves. Un grupo de control y un grupo de péptido BT estuvieron presentes en cada habitación.

5 Después que las aves se habían trasladado a los corrales los oocitos de E. maxima (agua del grifo para aves de control) fueron alimentados con tubo en cultivos de las aves.

La temperatura y humedad relativa fueron medidas automáticamente 24 horas al día. Durante el primer y segundo

10 día experimental, la temperatura fue de más de 30°C y luego descendió a aproximadamente 0.5°C diariamente hasta llegar a 20°C. El programa luz fue de 24 horas con luz durante todo el experimento.

15 Tabla 4. La cantidad de aves por tratamiento

	Control	Péptido BT
Prueba 1	32+2 extra ave	32
Prueba 2	32+2 extra ave	32

La dieta consistía en trigo, harina de soya, cebada,

20 harina de colza, aceite de colza, vitaminas, minerales y aminoácidos. Los alimentos no modificados fueron obtenidos de Agrifood Research Finlandia MTT, Jokioinen. La alimentación fue en forma de malla y no se agregaron coccidiostato o enzimas. BT grado veterinario fue añadido a los alimentos al

25 equivalente de una concentración de péptido BT de 96 ppm. Los

grupos de tratamiento recibieron la misma dieta durante todo el experimento. El alimento y el agua se ofrecieron ad libitum.

5 Tabla 5. Composición de la dieta

10

15

20

Composición de alimento experimental	g/kg dieta	Composición química calculada	g/kg dieta
trigo	549.8	DM	890.00
cebada	40.00	proteína cruda	220.80
harina de soya	288.00	grasa cruda	60.45
harina de colza	39.00	fibra cruda	31.31
Fosfato de monocalcio	39.00	ceniza	59.44
Ca	19.00	Ca	10.11
Sal	14.00	P	8.32
caliza	4.20	P digerible	4.79
Vit/Min	2.00	Na	1.72
Metionina	2.00	Lys	11.91
Lisina	1.60	Met	4.82
		Cys	3.87
		Thr	8.24

Contenido de energía calculado	MJ / kg DM
ME	12.20

Alimento 1 = alimento de control

Alimento 2 = alimento de control + BT grado veterinario en el

25 equivalente de péptidos 0.096 g por kg

Todas las aves en tres de las cuatro habitaciones recibieron oocistos de *E. maxima* en el día 13, mientras que la cuarta habitación fue una habitación de control de aves no desafiadas. La dosis fue aproximadamente 25,000 oocistos esporulados por ave. Los oocistos fueron alimentados con tubo en el cultivo en 2 ml de agua del grifo. Los oocistos de *Eimeria* fueron comprados a la Agencia de laboratorios veterinarios, Surrey, Reino Unido. Una habitación no tuvo el desafío.

10 Las aves fueron pesadas en la base de la jaula a la llegada, 6, 13, 17, (18 y 19 en la prueba 2) y 20 días de edad. La ingesta de alimento se midió 6, 13 y 20 días de edad. Se midió la ingesta de alimento basándose en una jaula o corral. La condición de las aves fue marcada por lo menos
15 dos veces por día. La tasa de mortalidad y el peso de las aves que murieron fueron grabados. Las aves que estaban muy enfermas o dañadas fueron sacrificadas humanamente. A la edad de 20 días, los pollitos fueron muertos por dislocación cervical y muestreados para digestos ileal y del intestino
20 ciego, produciendo 32 muestras de digesto por tratamiento y prueba.

Análisis microbiano de las muestras de digesto y lisis celular y aislamiento de ADN cromosómico

25 El ADN bacteriano recuperado fue analizado por PCR

cuantitativo, permitiendo que la cantidad de los diferentes grupos bacterianos se calcule. Las bacterias siguientes fueron analizadas *Bifidobacterium* spp, *E. coli*, *Lactobacillus* spp y el grupo *C. perfringes* racimo I. Para la determinación
5 de ADN, se utilizaron muestras por triplicado y se calculó la cantidad media de bacterias por gramo de peso de digesto fresco.

Los conteos de células bacterianas totales en las muestras de digesto fueron determinados por citometría de
10 flujo.

La puntuación de lesión de *Eimeria* se realizó sólo para la primera prueba y el experto imparcial identifica las lesiones. La identificación de las lesiones de *Eimeria* se hace en la última parte del yeyuno e íleon completo. Las
15 lesiones se marcaron en una escala de 0-4, donde 0 indica un intestino normal y 4 indica un intestino seriamente lesionado.

El peso de las cavidades se midió de dos aves de cada grupo. Las cavidades fueron pesadas sólo para la segunda
20 prueba.

La longitud total del intestino delgado (yeyuno + íleon) fue medida de cada ave.

Las pruebas T se calcularon y utilizaron para medir las diferencias estadísticas entre los tratamientos.

Resultados:

El desafío de Eimeria disminuyó significativamente el crecimiento de las aves de control. Sin embargo, la dieta complementada con el péptido BT indicó algo de mayor
5 crecimiento de las aves, tanto en los grupos no desafiados como desafiados con Eimeria en comparación con el grupo de control (figura 2). En el día 20 las aves en el grupo péptido BT parecen un poco más pesadas pero ninguna diferencia estadísticamente significativa puede ser identificada (figura
10 3). Si el peso de las aves no desafiadas en el día 20 fue examinado por separado de la primera y segunda prueba, el peso de las aves en la segunda prueba fue significativamente ($p = 0.026$) aumentada por la dieta complementada con péptido BT en comparación con el grupo de control.

15 Durante el desafío de Eimeria (entre el día 13 y 20) la relación de conversión de alimento (FCR) mejoró en el grupo de péptido BT en comparación con el grupo de control ($p = 0.02$ para la primera prueba y $p = 0.006$ para la segunda prueba) (figura 4).

20 El desafío de Eimeria aumentó la longitud del intestino delgado como se esperaba. La mayor longitud del intestino delgado puede indicar crecimiento compensatorio debido a la menor absorción de nutrientes. Sin embargo, no
25 hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa en la longitud media del intestino delgado entre los tratamientos

(figura 5).

La cavidad de Fabricio es un órgano epitelial y linfoide encontrado sólo en las aves. La cavidad es el sitio de hematopoyesis y es un órgano especializado de órganos para el desarrollo de células B. La cavidad se desarrolla como un divertículo dorsal de la región proctadael de la cloaca. Para la segunda prueba, las cavidades se pesaron y compararon con el peso de las aves vivas. La proporción del peso de las cavidades cuando se compara con el peso de las aves vivas pareció ligeramente mayor en las aves no desafiadas que las aves desafiadas con Eimeria. No se observaron diferencias entre el péptido BT complementado y el grupo de control. Sin embargo, las cavidades de las aves no desafiadas parecen algo mayores en el grupo de control que en el grupo de péptido BT (figura 6).

La E. maxima infecta principalmente la región media del intestino delgado, el yeyuno distal e íleon proximal. No se detectaron puntajes altos de infección probablemente porque el pico de la infección ya fue superado, cuando el marcador de lesión fue realizado, en el día siete después de la inoculación de E. maxima. El ciclo de vida promedio de E. maxima está entre cinco a seis días. El puntaje promedio fue menor en las aves complementadas con péptido BT ($p = 0.098$) como una indicación de una recuperación más rápida o inflamación reducida (figura 7).

No hay mortalidad en las aves no desafiadas con cualquier dieta en ambas pruebas. La mortalidad de las aves desafiadas con Eimeria era relativamente alta. Durante la primera prueba la mortalidad fue la más alta en el grupo de control y el menor en el grupo de péptidos BT ($p = 0.011$), mientras que la situación se invirtió durante la segunda prueba. Cuando se combinó la mortalidad de ambas pruebas, la mortalidad sobre todo apareció algo menor en el grupo péptido BT que en el grupo de control, pero la diferencia no fue significativa (tabla 6). La razón de por qué la tasa de mortalidad fue diferente entre los tratamientos en la prueba 1 que la prueba 2 podría ser aquellos en la prueba 2, aves muy gravemente enfermas fueron asesinadas sin dolor con prontitud. En la prueba 1 ninguna de las aves del grupo péptido BT y tres aves desde el grupo de alimentación de control fueron sacrificadas antes del final de la prueba. En la prueba 2 tres aves desde el grupo péptido BT y una forma de ave el grupo de alimentación de control fueron sacrificados antes del final de la prueba.

20

Tabla 6. Mortalidad (%)

25

Tramiento	Prueba 1	Prueba 2	Mortalidad de ambas pruebas
Control	23.5	11.8	17.6
BT	3.13	15.6	9.4

El porcentaje de materia seca de digesto es un parámetro de fondo importante, como lo indica la salud de los intestinos y el equilibrio de la microbiota. El desafío de Eimeria inflige diarrea a las aves y disminuye el contenido de materia seca de los digestos ileal e intestino ciego. Estos resultados sugieren que las aves desafiadas tuvieron algún problema con la salud intestinal y que el desafío de Eimeria afecta el equilibrio de la microbiota intestinal. El efecto del péptido BT en la materia seca de íleon de Eimeria desafiada y aves no desafiadas no fue significativa (figura 8).

Los contenidos de materia seca de digesto de los intestinos ciegos fueron inferiores en el desafío que en las aves no desafiadas. La materia seca de los intestinos ciegos de aves desafiadas con Eimeria puede han aumentado ligeramente hacia valores normales por la complementación de péptido BT (figura 9).

El número total de microbios fue superior en el intestino ciego que el íleon. El desafío de Eimeria aumentó el número total de microbios en el íleon en el control y los grupos complementados con péptidos BT. Los números de microbios en el intestino ciego se redujeron en pruebas y ambos grupos de tratamiento debido al desafío de Eimeria. Ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los dos tratamientos del alimento en cualquier prueba podría ser

detectado (figuras 10 y 11).

Durante estas dos pruebas, el desafío de *Eimeria* tiende a aumentar el número de *Lactobacillus* spp y bifidobacterias spp en los digestos ileal y del intestino ciego en el alimento de control y los grupos complementados con el péptido BT. En la prueba 2, hay una tendencia estadísticamente insignificante hacia niveles bacterianos disminuidos en íleon en el grupo de péptidos BT, pero en la prueba 1, hay un aumento en los niveles del íleon del grupo C. coccoides-E. rectal en el grupo de péptidos BT (figura 12). No se observaron diferencias en las aves no desafiadas (figuras 13 y 15). Contenido bacteriano del intestino ciego no es afectado por el BT (figuras 14 y 15). No se detecta *Salmonella* spp. en cualquier prueba. Tomados en conjunto, el análisis de microbiota sugiere que en la dosis actual, péptido BT tiene poco o ningún efecto sobre las poblaciones bacterianas (no patógenas) nativas, que indica que los péptidos BT son bien tolerados por los animales tratados y no presentan efectos antibióticos.

Este experimento demuestra que no hay efectos adversos sobre bacterias intestinales nativa o deseadas se detectaron en pollos complementados con el péptido BT en 96 ppm. FCR mejoró significativamente en el grupo complementado con péptido BT en pollos desafiados con *Eimeria* en comparación con el grupo de control ($p = 0.02$ y $p = 0.006$

para la primera y segunda prueba, respectivamente). El peso de las aves en la segunda prueba fue significativamente ($p = 0.026$) mejorado por la dieta complementada con péptido BT en comparación con el grupo de control. La mortalidad de los pollos desafiados con *Eimeria* en la primera prueba fue significativamente ($p = 0.011$) disminuida en el tratamiento de péptido BT en comparación con el grupo de control. Además, la complementación de la alimentación por el péptido BT reduce los puntajes promedio de la lesión en el tejido infectado ($p = 0.098$).

Ejemplo 5

Este estudio es para probar el uso de BT grado veterinario (células inactivadas *B. texasporus*) como un aditivo alimenticio en cerdos por su efecto sobre el peso, la colonización de *Salmonella* y la función de leucocitos.

Materiales y métodos

Diseño experimental. Al destete (17-21 días de edad), los lechones fueron colocados al azar en corrales con lámparas de calor para un calentamiento adicional en grupos de 5 individuos. Los lechones fueron provistos de agua y una dieta fase I no medicada ad libitum que cumple con las directrices del Consejo de Investigación Nacional (1994). Los pesos corporales se registraron en los días 0, 3, 5 y 7 post-

destetado. Los cerdos fueron colocados en 4 grupos experimentales. Los grupos 1 y 2 cada uno contiene 5 cerdos alimentados con una dieta a base de harina de soya y maíz no medicada equilibrada de control que contiene 0 ppm o 12 ppm (repetición 1) o 24 ppm (repeticiones 2, 3) de péptidos BT, respectivamente. Los grupos 3 y 4 se alimentaron con dietas que contenían 0 o 12 (o 24) ppm péptidos BT, pero los cerdos en estos grupos fueron desafiados con *Salmonella typhimurium* (ST). Los cerdos fueron alimentados con estas dietas a lo largo de los experimentos. Los péptidos BT fueron entregados en forma de células *B. taylori* inactivadas como una premezcla.

Salmonella typhimurium serovar *Typhimurium* (ST). Se utilizó un aislado de *S. entérica* serovar *typhimurium* (ST) (National Veterinary Sciences Laboratory [NVSL]), Ames, IA (24 PT) y es una cepa que ha sido seleccionada por su resistencia a carbenicilina y novobiocina (CN) y se mantiene en TSB o agar soya triptica a 4°C. Agar verde brillante (BGA), un medio de cultivo selectivo para *Salmonella*, se utilizó para cultivar el aislado resistente en estudios experimentales y contiene 100 µg/ml de carbenicilina y 25 µg/ml de novobiocina (es decir, BGA + CN) para inhibir el crecimiento de otras bacterias. El inóculo de desafío fue preparado de 18 a 24 horas (cultivos TSB + CN mantenidos a 41°C y diluidos en PBS estéril (pH 7.2)). Se prepara una

solución madre (1×10^9 cfu/ml) para los experimentos de desafío.

En post-destetado el día 3, los lechones en grupos de desafío fueron administrados, por sonda oral, 10^7 cfu St.

5 Cinco días después del desafío (post-destetado 7 días), los cerdos fueron sacrificados y se recogieron muestras de 1.0 g de contenido cecal de cada cerdo de manera aséptica. Las muestras cecales fueron diluidas en serie y difundidas en placas en agar verde brillante (BGA). Las placas fueron luego

10 incubadas durante 24 horas a 37°C y el número de cfu de ST por gramo de contenidos cecales determinados. Además, tejidos (hígado, bazo, ganglios linfáticos de íleo cecal, intestino ciego y recto serán cultivados para la presencia de ST usando métodos establecidos. Las colonias de Salmonella esperadas

15 fueron confirmadas por pruebas bioquímicas en agar azúcar triple y agar de hierro lisina y se confirma además como ST utilizando antisuero de Salmonella O. Los conteos de placa de colonia salmonella se expresan como $\log_{10}$ Salmonella por gramo de contenido cecal.

20 *Respuesta inmune innata en cerdos destetados.* Los leucocitos fueron aislados utilizando separación de gradiente por densidad como se describe anteriormente (KOGUT et al. 2010). Se realizaron pruebas funcionales para evaluar las capacidades de neutrófilos aislados de cerdos reciben

25 tratamientos diferentes. Se investigaron dos métodos de

eliminación microbiana utilizada por neutrófilos. Específicamente se analizaron la desgranulación de neutrófilos, la liberación de productos bactericidas de gránulos dentro de los neutrófilos y la explosión oxidativa, la producción de especies reactivas de oxígeno bactericida (ROS). Brevemente, las pruebas se describen a continuación.

Prueba funcional. El estallido oxidativo de leucocitos fue medido por la oxidación de DCFH-DA al DCF fluorescente como se describe por (HE et al. 2003). Los leucocitos son estimulados con forbol A-miristato 13 acetato (PMA [2.0 µg/ml], Sigma) o medio RPMI 1640 durante 60 minutos antes de la medición. Las células fueron colocadas en placas de 96 cavidades y la fluorescencia se midió mediante un lector de microplacas de fluorescencia GENios Plus [(485/530 nm) Tecan US Inc., Research Triangle Park, Carolina del Norte].

Análisis estadístico: se realizó un análisis estadístico sobre datos utilizando un software estadístico SigmaStat® (Jandel científico, San Rafael, CA, USA). Las diferencias entre los grupos experimentales se determinarán mediante la prueba T de Student. $P \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados.

De los datos presentados a continuación, parece que

los cerdos se alimentan de células BT tienen mayor promedio diario de ganancia en peso (ADG) que los cerdos alimentados con la dieta de control, incluso en presencia de una infección de Salmonella (en 24 ppm) (tabla 7).

5

Tabla 7. Ganancia diaria promedio. Rep 3, 24 ppm BT. Valores en libras (lbs). Los datos de pesos recolectados en los días 0, 3, 5 y 7 post-destete de cerdos individuales se combinaron para cada momento. Los datos representan la ganancia promedio +/- desviación estándar.

10

15

Tratamiento	Ganancia diaria promedio (lbs)	
	Repetición 2	Repetición 3
Cont	1.7±0.3	0.04±0.12
Cont Pept 24ppm	4.2±0.7	0.15±0.06
Cont ST	3.2±0.4	0.14±0.09
Pept ST 24ppm	4.6±0.5	0.18±0.06

20

25

Se observaron algunas reducciones en excreción fecal de ST como se muestra en los datos de hisopo rectal (tabla 8). En la Rep 1, ninguna diferencia fue vista en la excreción fecal en 12 ppm BT, excepto en el día 5. En la Rep 2, control y BT en 24 ppm fueron similares en excreción ST, excepto en el día 4, donde el grupo BT 24 ppm tiene más cerdos positivos que el grupo de control. En Rep 3, el grupo BT en 24 ppm tiene menos excreción ST por los cerdos que el grupo de control en todos los días medidos. En Rep 3, los cerdos

fueron seguidos para la post-infección 7 días en lugar de 5 días, como en Rep 1 y 2.

Tabla 8. Datos de hisopo Rectal diario

5

Días Post- infección	Número de cerdos positivos para ST					
	Rep 1		Rep 2		Rep 3	
	Control	BT 12ppm	Control	BT 24ppm	Control	BT 24ppm
1	2	3	4	3	5	2
2	5	5	4	4	3	1
10 3	5	5	3	4	4	2
4	4	5	2	5	4	1
5	3	1	1	1	5	2
6	-	-	-	-	5	1
7	-	-	-	-	4	3

15

Los cerdos alimentados con el péptido tenían menos Salmonella en los órganos: los ganglios linfáticos, hígado, bazo, en comparación con los cerdos de control generales, pero no mostraron reducciones en los tejidos del intestino - íleon (excepto rep 3), intestino ciego, recto. En Rep 1, el

20

grupo BT en 12 ppm tuvo menos cerdos positivos para ST en el hígado y el bazo, pero la recuperación de ST fue la misma en los ganglios linfáticos y el intestino ciego y el recto (tabla 9). En Rep 2, el grupo BT tuvo menos cerdos positivos en todos los tejidos, excepto en el intestino ciego. En Rep

25

3, menos cerdos en el grupo BT fueron positivos para ST en

los ganglios linfáticos, el bazo, el íleon, el intestino ciego y el recto. Los datos de colonización (CFU) fueron indeterminados debido a la baja recuperación de ST (datos no mostrados). Parece que el péptido tenía algunos efectos positivos sobre la invasión de Salmonella y colonización en cerdos destetados.

Tabla 9. Salmonella aislada de tejidos

Tejido	Número de cerdos positivos para ST					
	Rep 1		Rep 2		Rep 3	
	Control	BT 12ppm	Control	BT 24ppm	Control	BT 24ppm
Ganglio linfático ileocecal	3	3	5	1	4	2
Hígado	3	1	5	1	2	2
Bazo	2	0	3	1	1	2
Íleon	-	-	5	4	4	0
intestino ciego	4	4	5	5	5	4
Recto	5	5	5	4	4	3

Los leucocitos de cerdos alimentados con la cepa deficiente de esporulación BT tuvieron una respuesta de rápida oxidativa significativamente mayor (tabla 10) que los leucocitos de cerdos de control en los días 3, 5 y 7 de ser alimentados con el péptido BT ($P < 0.05$).

Tabla 10. Actividad rápida oxidativa de leucocitos porcinos. Los cerdos fueron alimentados con dietas respectivas durante todo el período de estudio (24 ppm BT). Los cerdos fueron sangrados en los días 3, 5 y 7 post-destetado. Los datos representan dos repeticiones, agrupados de 10 cerdos/grupos. Datos expresados como la media +/- desviación estándar. RFU = unidades fluorescentes reflectantes (en 1,000).

10

Tratamiento	Día 3	Día 5	Día 7
Cont	0.8±0.1	1.2±0.1	1.5±0.3
Pept	1.5±0.2	1.7±0.3	2.2±0.2
Cont PMA	23.0±1.3	14.2±1.0	30.4±3.3
Pept PMA	39.2±4.8	38.0±3.5	40.5±5.3

15

Los datos sugieren que las células *B. taylori* inactivadas son un efectivo inmunomodulador en cerdos con potenciales efectos positivos sobre la ganancia de peso y el transporte de la Salmonella en el intestino y tejidos.

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

5

1. Una cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación que tiene una tasa de supervivencia de menos de aproximadamente 3.5×10^{-3} , caracterizada porque la deficiencia de esporulación puede medirse al someter un
10 cultivo a una temperatura de aproximadamente 50°C durante aproximadamente 5 minutos y medir la tasa de supervivencia.

2. La cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la tasa de supervivencia es menor de aproximadamente 1×10^{-5} .

15 3. La cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la tasa de supervivencia es menor de aproximadamente 1×10^{-7} .

4. La cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque
20 la tasa de supervivencia es menor de aproximadamente 1×10^{-9} .

5. La cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la cepa es MYG11 (PTA-12310), MYG107 (PTA-12309), MYG110 (PTA-12308) o MYG113 (PTA-12307).

25 6. Un método de inactivación de la cepa *B.*

texasporus deficiente de esporulación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque comprende someter un cultivo de células *B. texasporus* a un estrés suficiente para inactivar las células.

5 7. El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque el estrés está seleccionado del grupo que consiste de inanición, choque de temperatura, deshidratación, cambios de pH, exposición a alcohol, tratamiento con un detergente, tratamiento con presión,
10 alteración enzimática, fuerza mecánica y combinaciones de los mismos.

 8. El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque comprende reducir la tasa de supervivencia del cultivo de *B. texasporus* a menos de
15 aproximadamente 1×10^{-8} .

 9. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque el estrés se selecciona del grupo que consiste en calentamiento de células a al menos 50°C durante al menos 5 minutos, congelamiento de las células en la
20 ausencia de un crioprotector, deshidratación de las células a un contenido de agua de menos de aproximadamente 80%, adición de un detergente, secado por aspersion de las células, aplicación de una fuerza mecánica y sus combinaciones.

 10. Un alimento o bebida para animal mejorado,
25 caracterizado porque comprende una cepa *B. texasporus*

deficiente de esporulación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

11. La cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque tiene un contenido de humedad menor de aproximadamente 10% en peso.

12. Un método para mejorar la tasa de crecimiento y la conversión de alimento de un animal, caracterizado porque el método comprende:

10 administrar un alimento o bebida para animal mejorado de la reivindicación 10 a un animal; y

 mejorar la ganancia de peso o la conversión del alimento del animal con relación a un animal que recibe un alimento o bebida que carecen de la cepa *B. texasporus*
15 deficiente de esporulación.

13. Uso de una cepa *B. texasporus* deficiente de esporulación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad en un animal.

20 14. El uso de conformidad con la reivindicación 13, en donde la prevención y/o tratamiento de la enfermedad implica reducir una población microbiana patógena en el animal, en donde el patógeno es seleccionado del grupo que consiste de *Acinetobacter*, *Bacilli*, *Borrelia*, *Campylobacter*,
25 *Clostridia*, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Gonorrhea*, virus

de la fiebre aftosa, Hemofilus, virus de la gripe, Mannheimia, micobacterias, Mycoplasma, Pasteurella, Pseudomonas, Salmonella, Estafilococo y Estreptococo.

15. El uso de conformidad con la reivindicación 13,
5 en donde la enfermedad es seleccionada del grupo que consiste de colibacilosis, salmonelosis, enteritis necrótica, coccidiosis, gripe, fiebre aftosa, síndrome reproductivo porcino y respiratorio, neumonía bovina de fiebre de embarque, infección del conducto urinario, obesidad/síndrome
10 metabólico y diabetes mellitus tipo 2.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se proporcionan nuevas cepas y métodos para su uso. Particularmente, alimentos y otros productos o tratamientos orales que contengan cepas *Brevibacillus* deficientes de esporulación cuando se administra a un sujeto pueden inhibir o reducir el número de patógenos en el sujeto y mejorar la salud del mismo.

Figura 1

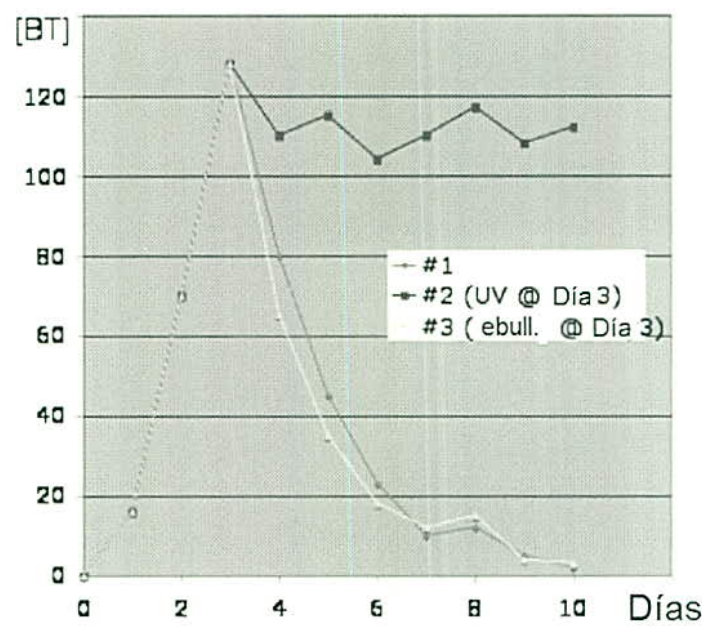


Figura 2

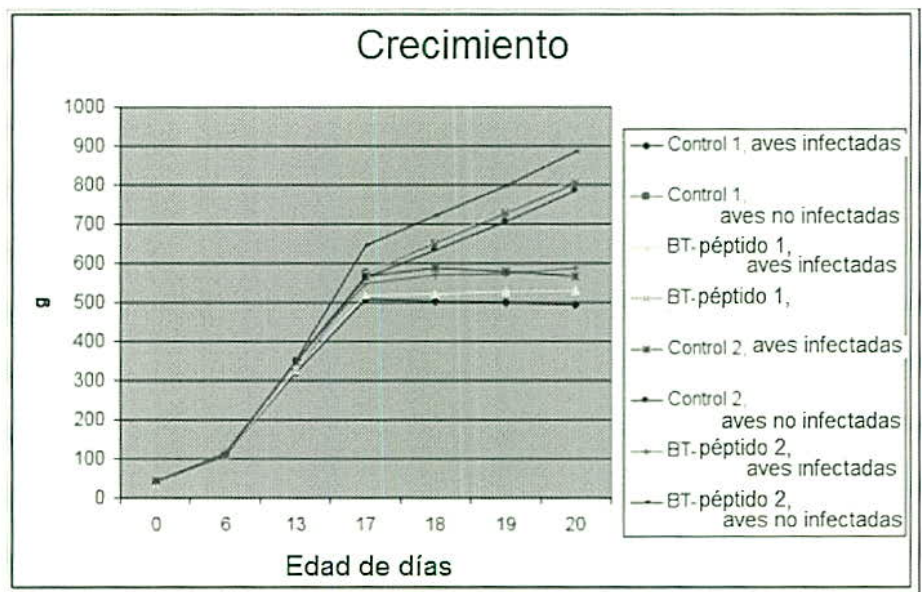


Figura 3

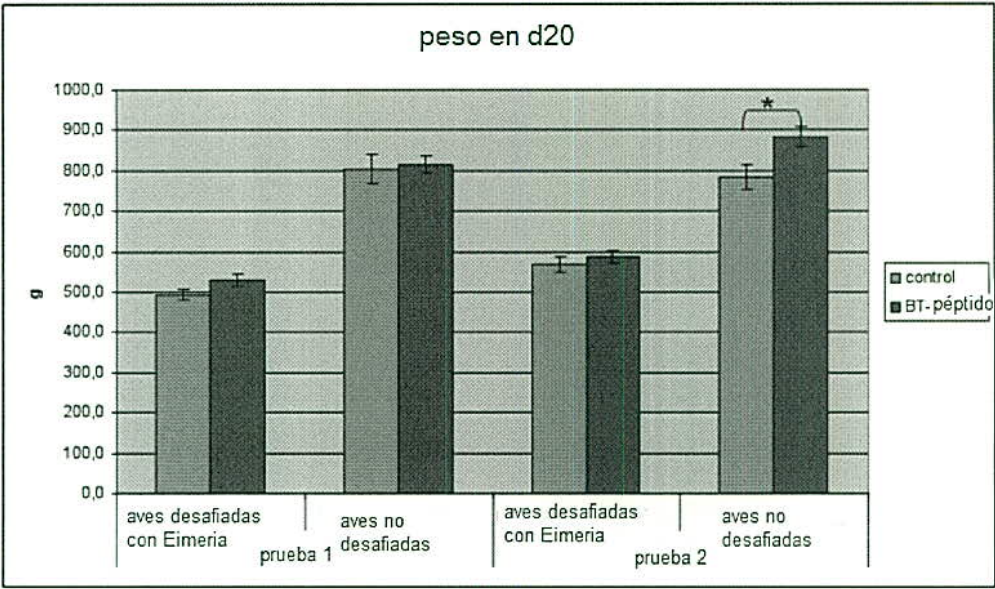


Figura 4

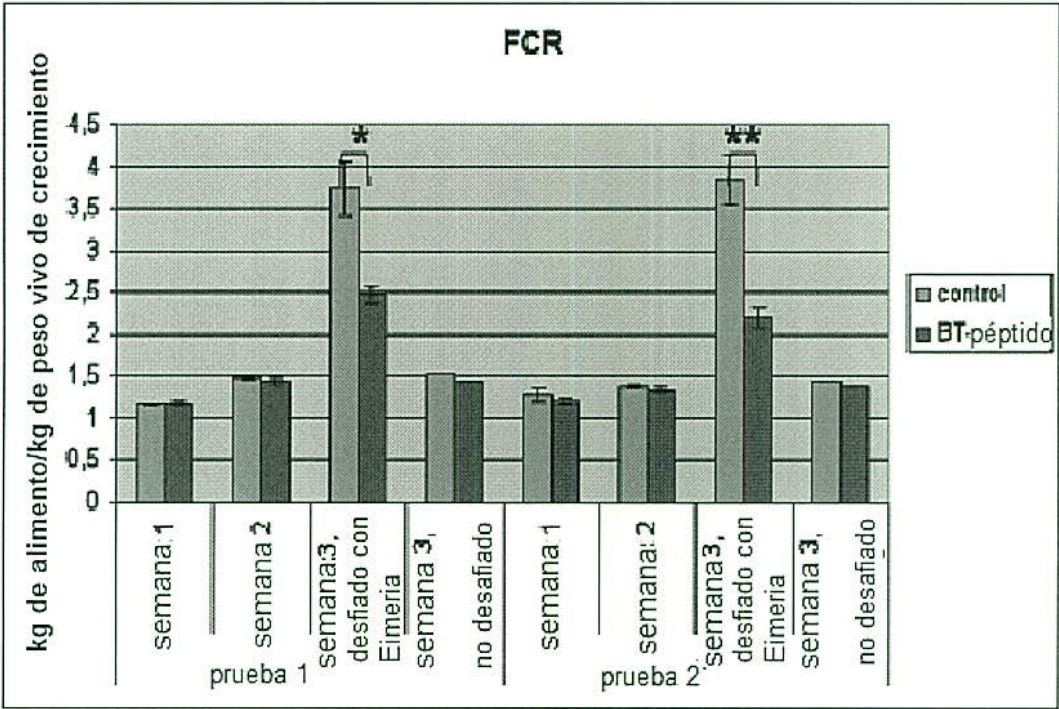


Figura 5

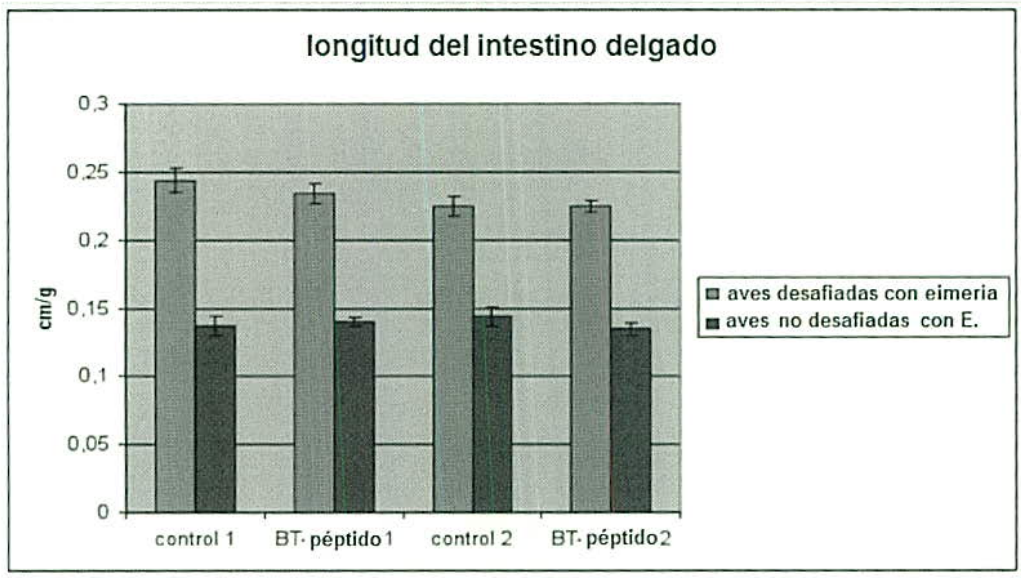


Figura 6

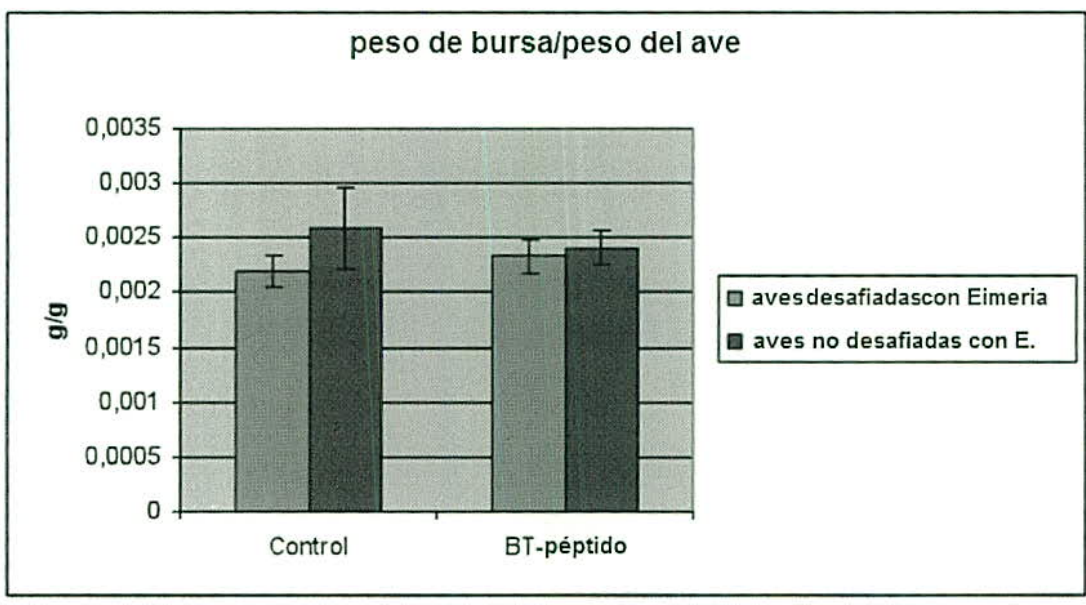


Figura 7

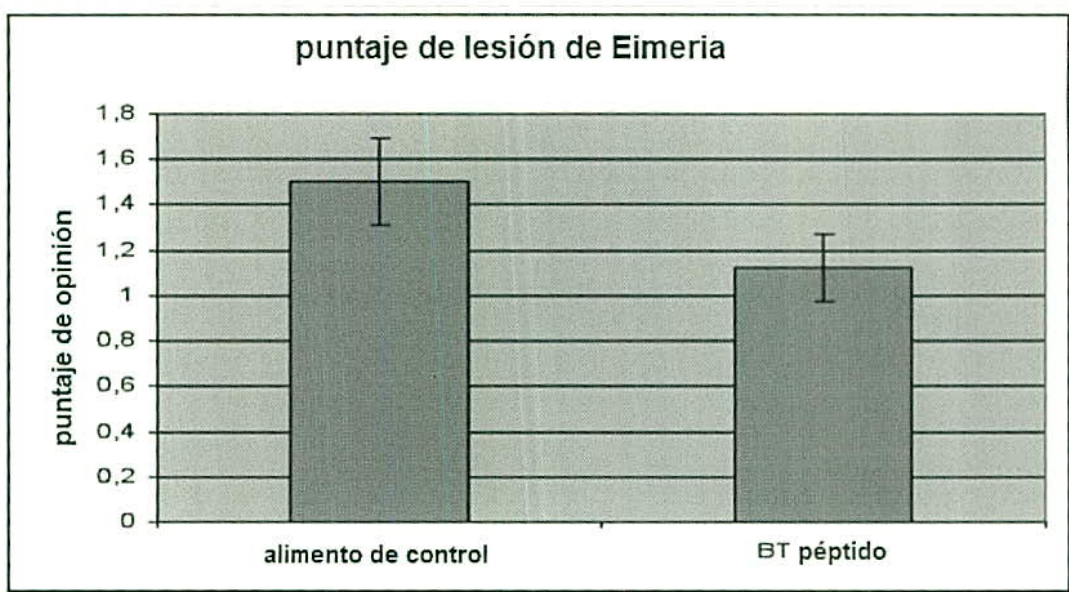


Figura 8

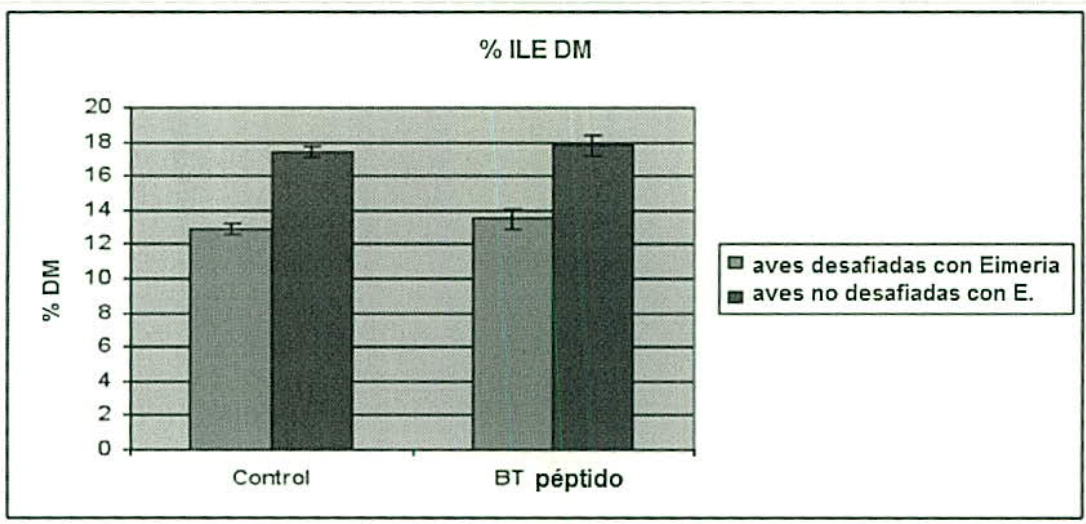


Figura 9

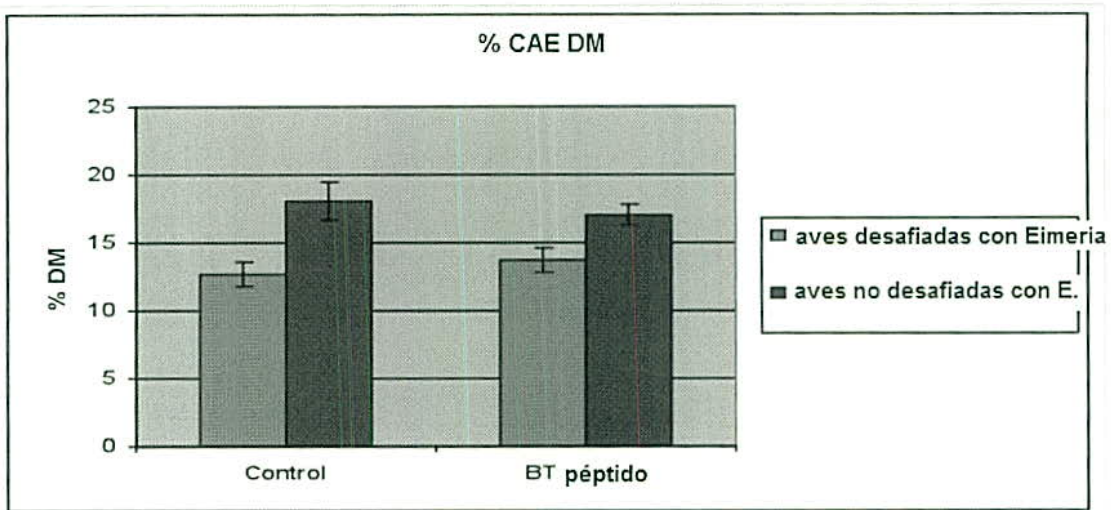


Figura 10

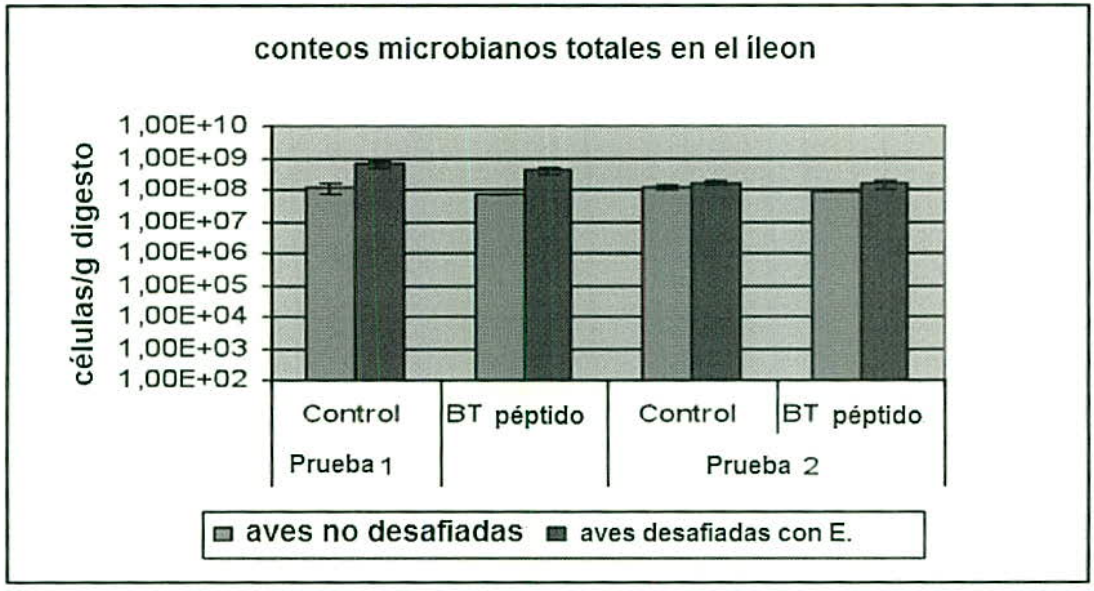


Figura 11

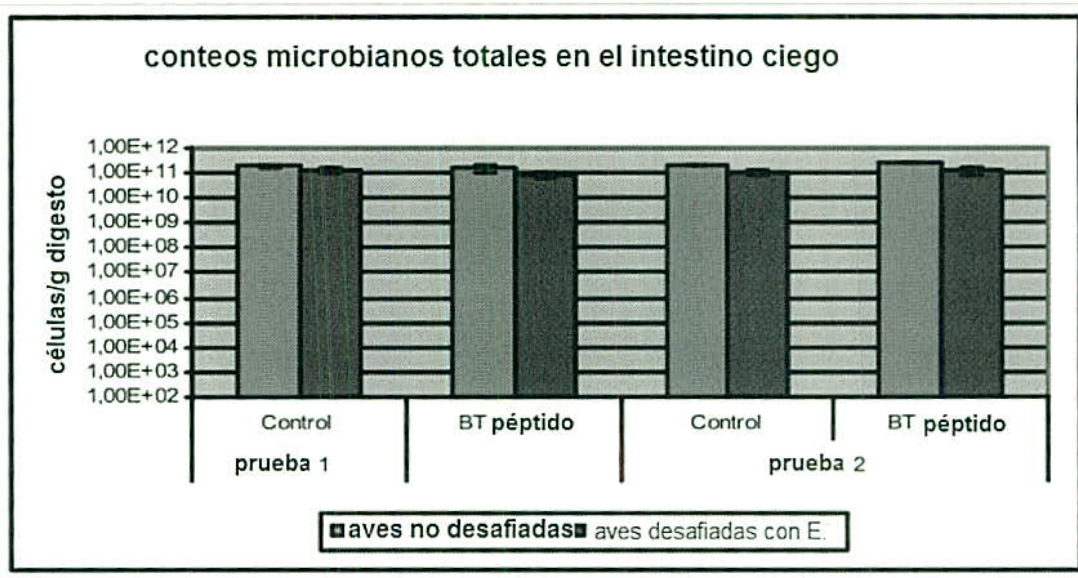


Figura 12

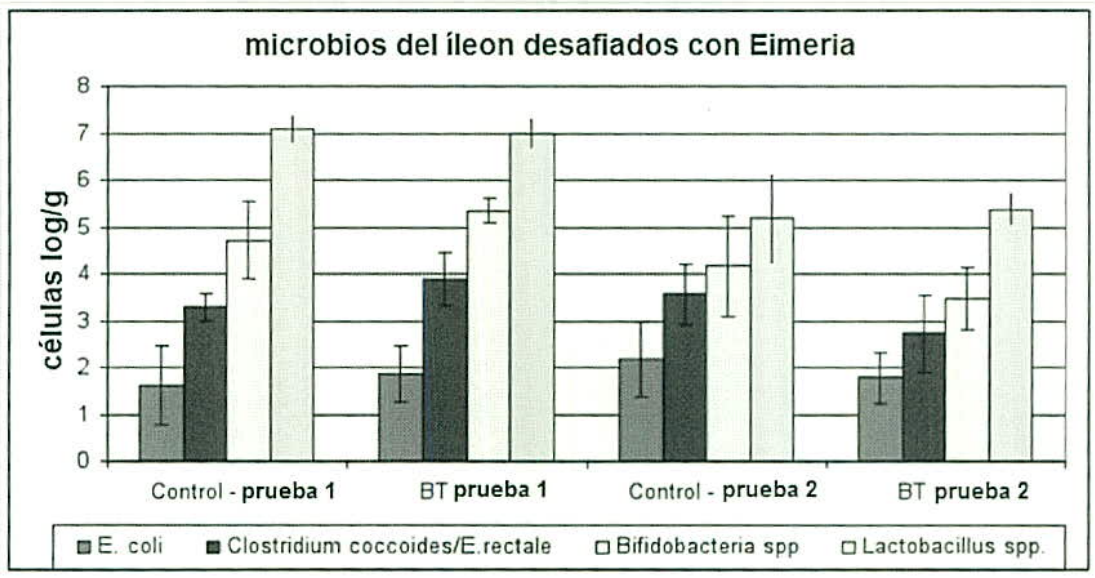


Figura 13

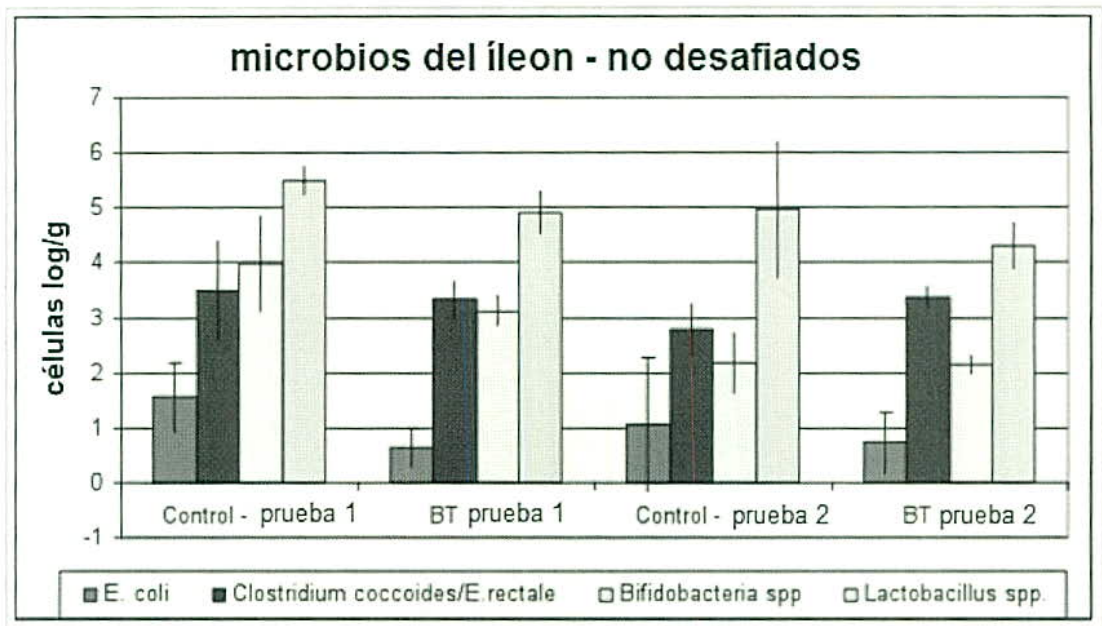


Figura 14

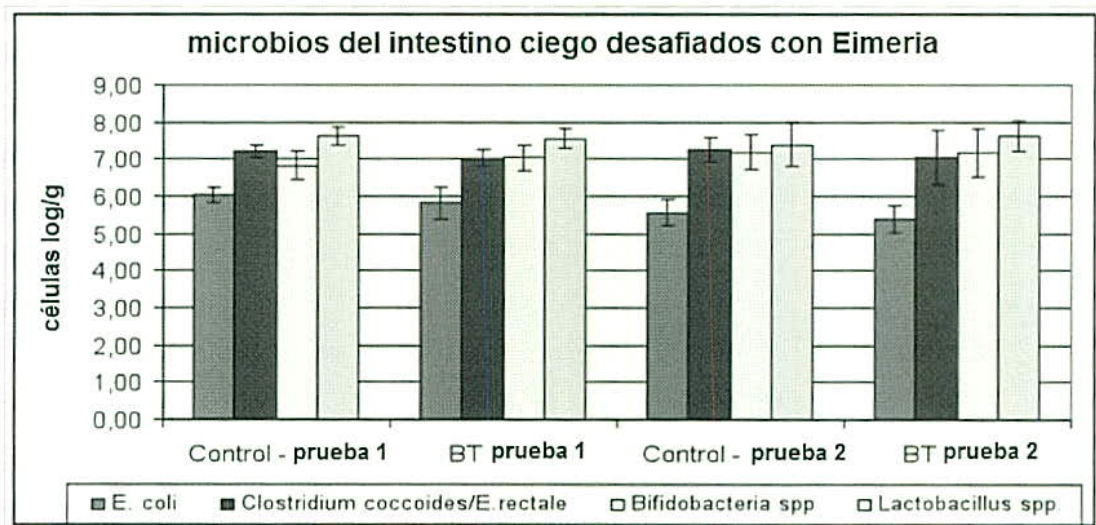
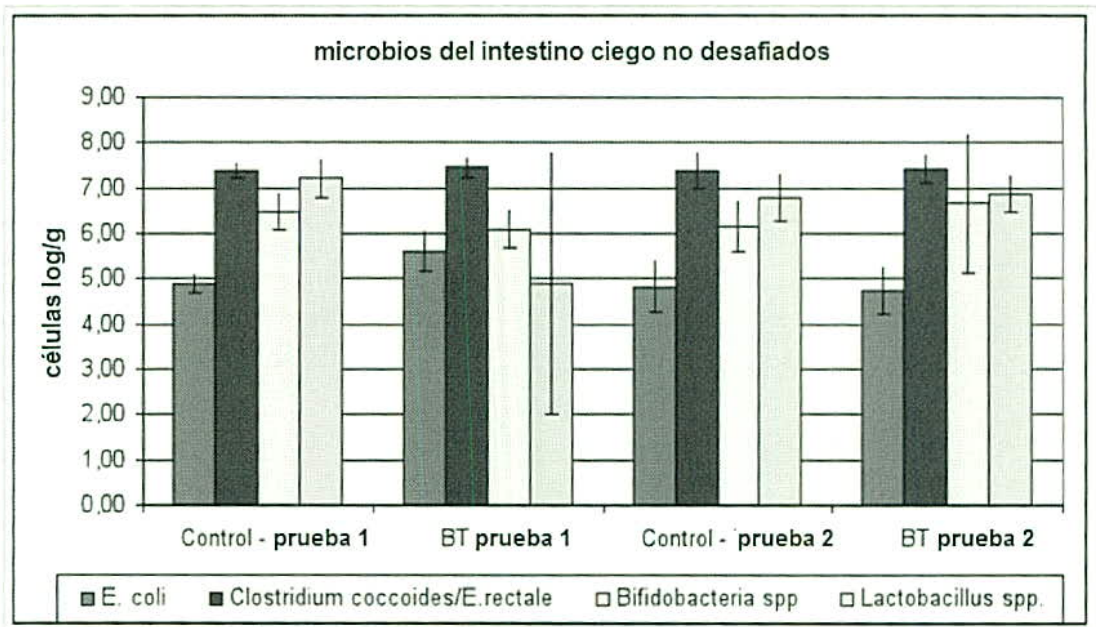


Figura 15



88

Applicant's or agent's file reference 0001.02PCT	International application No.
---	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 7, line 22-26	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☒	
Name of depositary institution American Type Culture Collection (ATCC)	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, USA	
Date of deposit December 7, 2011	Accession Number PTA-12307
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only ☐ This sheet was received with the international application Authorized officer	For International Bureau use only ☐ This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer
---	--

Applicant's or agent's file reference 0001.02PCT	International application No.
---	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 7 , line 22-26 .	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☒	
Name of depositary institution American Type Culture Collection (ATCC)	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, USA	
Date of deposit December 7, 2011	Accession Number PTA-12308
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only
☐ This sheet was received with the international application
Authorized officer

For International Bureau use only
☐ This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer

Applicant's or agent's file reference 0001.02PCT	International application No.
---	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 7 , line 22-26	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☒	
Name of depositary institution American Type Culture Collection (ATCC)	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, USA	
Date of deposit December 7, 2011	Accession Number PTA-12309
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only
☐ This sheet was received with the international application
Authorized officer

For International Bureau use only
☐ This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer

Applicant's or agent's file reference 0001.02PCT	International application No.
---	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 7 , line 22-26	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☒	
Name of depositary institution American Type Culture Collection (ATCC)	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, USA	
Date of deposit December 7, 2011	Accession Number PTA-12310
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only
☐ This sheet was received with the international application
Authorized officer

For International Bureau use only
☐ This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer

CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, 8 - COLOMBIA

REPRESENTACION

REPRESENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

MYGALAXY LIMITED COMPANY

domiciliado (s) 3801 Mattison Ave., #B Fort Worth, TX
en/of 76107, Estados Unidos de América

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Círculo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial e Intelectual, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial and Intellectual Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this

Aug 7th, 2013

En/in

Fort Worth, Texas, USA

Por/by

Yiwei Jiang

Firma/Signature

Yiwei Jiang

94

CAVELIER

A B O G A D O S

Señor Director

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

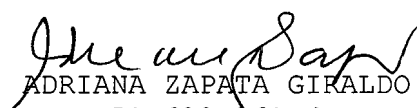
E. S. D.

Asunto :Solicitud de patente para **CÉLULAS B. TEXASPORUS DEFICIENTES DE ESPORULACIÓN Y MÉTODOS PARA INACTIVACIÓN EFICIENTE Y RENTABLE Y SU USO**
PCT/US2012/026999
Solicitante :**MYGALAXY LIMITED COMPANY**

Yo, ADRIANA ZAPATA GIRALDO mayor de edad, vecina de esta ciudad, identificada con cédula de ciudadanía No. 51.680.061 de Bogotá, en mi calidad de representante legal de la sociedad CAVELIER ABOGADOS domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35, en desarrollo de la representación que le fue otorgada por **MYGALAXY LIMITED COMPANY**, confiero poder a los doctores LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 de Usaquén, portadora de la Tarjeta Profesional No. 23.555 y JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL, T.P.A. No.40.119, identificado con cédula de ciudadanía número 16.209.330 de Cartago (Valle), para presentar la solicitud de registro de la patente indicada en la referencia.

Los apoderados quedan facultados para interponer recursos, transigir, conciliar, desistir, cancelar, recibir, renunciar, sustituir y revocar las sustituciones, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Señor Director,


ADRIANA ZAPATA GIRALDO
C.C. No. 51.680.061 de Bogotá

Acepto:


LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
T.P.A. No. 23.555 del C.S. de la J
C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

 SCT\SDC\COLO-20460-841-001-3

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel.: (57-1) 347.3611 - Fax (57-1) 211.8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675.7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43-A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - Tel: (57-4) 604.4794 Ext: 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604.4731- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

CESION

ASSIGNMENT

Yo, (nosotros) abajo firmado (s)

Yiwei Jiang

domiciliado(s) en

**3801, Mattison Ave., #B, Fort Worth, TX 76107
 Estados Unidos de América**

declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es)
 de la invención:

**CELULAS B. TEXASPORUS DEFICICIENTES DE
 ESPORULACION Y METODOS PARA INACTIVACION
 EFICIENTE Y RENTABLE Y SU USO**

declaro(amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero(erimos), sin
 limitación, a favor de la sociedad

MYGALAXY LIMITED COMPANY

constituida y existente de conformidad con las leyes de
Estados Unidos de América

domiciliada en

**3801 Mattison Ave., #B Fort Worth,
 TX 76107,
 Estados Unidos de América**

Por los derechos inherentes a dicha invención y que la citada
 Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de
 invención correspondiente en la República de Colombia.

I (we), the undersigned

Yiwei Jiang

of

3801, Mattison Ave., #B, Fort Worth, TX 76107 USA

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:

**SPORULATION-DEFICIENT B. TEXASPORUS
 CELLS AND METHODS FOR EFFICIENT AND
 COST-EFFECTIVE INACTIVATION AND USE
 THEREOF**

state as well, that assign, without reservations or limitations in favour
 of

MYGALAXY LIMITED COMPANY

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of
United States of America

domiciled in

**3801 Mattison Ave., #B Fort Worth, TX
 76107 USA**

all rights inherent to said invention and that the above mentioned
 company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding
 patent invention, in the Republic of Colombia

Dado y firmado hoy/Given and signed this
 en/in

**Aug 7th, 2013
 Fort Worth, TX, USA**

por/by **Yiwei Jiang**

Firma/Signature

Yiwei Jiang

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0081051
		Bogotá D.C., Agosto 14 de 2013 - 11:24:00

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS					NI 860.041.367	
*** Soporte del Pago ***						
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO	
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	599246690	14/08/2013	8.791.000.00	

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-204350-00000-0000
Fecha: 2013-08-28 16:45:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 98

0010: 20460-841-001-3

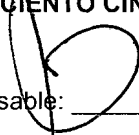
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0083337
		Bogotá D.C., Agosto 22 de 2013 - 07:57:24

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS					NI 860.041.367	
*** Soporte del Pago ***						
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO	
RECIBO DE CA	999999999	83336	22/08/2013		1.200.000.00	

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	
5	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	
			Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
			30.000.00 150.000.00
			\$150.000.00
			=====

SON: **CIENTO CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

****_
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-204350- -00000-0000
Fecha: 2013-08-28 16:45:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 98

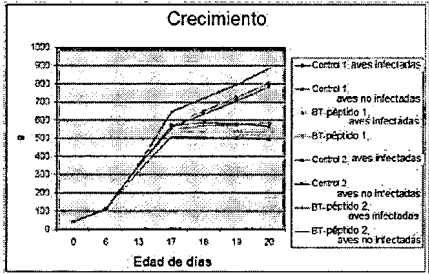
Colo: 20460 - 841-001-3

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD FASE NACIONAL PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 61/447,703 2011/03/01 US 13/406,202 2012/02/27 US		(51) Int Cl: C12R 001/007 (71) Solicitante(s) MYGALAXY LIMITED COMPANY (72) Inventor(es) YIWEI JIANG (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 2013/10/01 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 2012/02/28 No. de solicitud PCT/US2012/026999		(87) Publicación internacional Fecha: 2012/09/07 N° publicación: WO 2012/118845 A1	
(54) Titulo: CÉLULAS B. TEXASPORUS DEFICIENTES DE ESPORULACIÓN Y MÉTODOS PARA INACTIVACIÓN EFICIENTE Y RENTABLE Y SU USO			

Resumen:

Se proporcionan nuevas cepas y métodos para su uso. Particularmente, alimentos y otros productos o tratamientos orales que contengan cepas Brevibacillus deficientes de esporulación cuando se administra a un sujeto pueden inhibir o reducir el número de patógenos en el sujeto y mejorar la salud del mismo.

Figura 2





No. 13-204350- -00000-0000

Fecha: 2013-08-28 16:45:36

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 98

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 ☐