

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 929 893**

51 Int. Cl.:

A23L 33/125 (2006.01)

C12N 11/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2016** **PCT/IB2016/000933**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2016** **WO16181228**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2016** **E 16792262 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2022** **EP 3294073**

54 Título: **Sistemas y métodos para hacer crecer una biopelícula de bacterias probióticas en partículas sólidas para la colonización de bacterias en el intestino**

30 Prioridad:

11.05.2015 US 201562159849 P

11.05.2015 US 201562159846 P

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

02.12.2022

73 Titular/es:

MYBIOTICS PHARMA LTD (100.0%)

2 Ilan Ramon Street

7403635 Ness Ziona, IL

72 Inventor/es:

BARAM, DAVID;

DIAMANT, RACHEL y

DABOUSH, DAVID

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 929 893 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistemas y métodos para hacer crecer una biopelícula de bacterias probióticas en partículas sólidas para la colonización de bacterias en el intestino

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para hacer crecer y encapsular al menos una cepa de bacterias en forma de biopelícula, configurada para la liberación dirigida dependiente del pH de la biopelícula bacteriana en el tracto gastrointestinal.

Resumen

Según un primer aspecto, se proporciona un método para formar una biopelícula, en donde la biopelícula comprende una población de al menos una cepa bacteriana unida a partículas,

comprendiendo el método:

- a. obtener una población que comprende al menos una cepa de bacterias;
- b. inocular un medio de crecimiento que contiene partículas con la población que comprende al menos una cepa de bacterias;
- c. incubar las partículas con la población de al menos una cepa bacteriana durante un tiempo suficiente para que la población de al menos una cepa de bacterias se una a las partículas; y
- d. cultivar la población de al menos una cepa de bacterias unidas a las partículas en un medio de crecimiento, durante un tiempo suficiente para formar una biopelícula,

en donde la población de al menos una cepa de bacterias unidas a las partículas se cultiva en condiciones anaeróbicas, y en donde la biopelícula está configurada para colonizar el intestino de un sujeto que lo necesita durante al menos cinco días, cuando se ingiere por el sujeto.

En una realización, la biopelícula comprende: *Lactobacillus plantarum* unido a una matriz de granada/partícula de semilla; o (ii) *Escherichia coli* DH5 alfa unida a una partícula de fosfato de dicalcio, una partícula de Solka o una partícula Avicel, es tolerante al ácido.

En una realización, la biopelícula unida a la partícula se encapsula con alginato.

En una realización, la partícula es una partícula porosa que oscila entre 30 y 500 micrómetros de diámetro.

En una realización, la partícula se selecciona del grupo que consiste en: fosfato de dicalcio, semillas, arcilla, arena y celulosa.

En una realización, la partícula consiste en fosfato de dicalcio.

En una realización, la población que comprende al menos una cepa bacteriana se selecciona de la microflora intestinal.

En una realización, la biopelícula comprende dos o más cepas de bacterias.

En una realización, la al menos una cepa bacteriana se selecciona del grupo que consiste en: *Lactobacillus plantarum*, *Christensenella minuta* y *Acetobacter pomorum*.

En una realización, el método comprende además una etapa (e) liofilizar la biopelícula formada en la etapa (d).

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra una ilustración de una realización a modo de ejemplo de la presente invención, que muestra un sistema de flujo usado según los métodos según algunas realizaciones de la presente invención.

Las figuras 2A a 2C muestran imágenes de algunas realizaciones a modo de ejemplo de biopelículas generadas por los métodos según algunas realizaciones de la presente invención.

La figura 3 muestra la tolerancia a la acidez de una biopelícula según algunas realizaciones de la presente invención.

La figura 4 muestra la tolerancia a la acidez de otra biopelícula según algunas realizaciones de la presente invención.

La figura 5 muestra la tolerancia de una biopelícula según algunas realizaciones de la presente invención a la liofilización.

La figura 6 muestra la tolerancia a la acidez de otra biopelícula según algunas realizaciones de la presente invención.

La figura 7 muestra la capacidad de una biopelícula según algunas realizaciones de la presente invención para colonizar el intestino de un modelo animal, usando las composiciones indicadas.

La figura 8 muestra la liberación dependiente del pH de bacterias de las biopelículas según algunas realizaciones de la presente invención.

La figura 9 muestra la capacidad de otra biopelícula según algunas realizaciones de la presente invención para colonizar el intestino de un modelo animal

La figura 10 muestra la capacidad de otra biopelícula según algunas realizaciones de la presente invención para colonizar el intestino de un modelo animal, en comparación con otras biopelículas formadas usando otros métodos.

Descripción detallada

Para mayor claridad de la descripción, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las siguientes subsecciones que describen o ilustran determinadas características, realizaciones o aplicaciones de la presente invención.

En toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, los siguientes términos toman los significados explícitamente asociados en el presente documento, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Las expresiones “en una realización” y “en algunas realizaciones”, tal como se usan en el presente documento, no se refieren necesariamente a la(s) misma (s) realización/realizaciones, aunque puede ser así. Además, las expresiones “en otra realización” y “en algunas otras realizaciones” tal como se usan en el presente documento no se refieren necesariamente a una realización diferente, aunque puede ser así.

Además, tal como se usa en el presente documento, el término “o” es un operador inclusivo “o”, y es equivalente al término “y/o”, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término “basado en” no es exclusivo y permite estar basado en factores adicionales no descritos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, en toda la memoria descriptiva, el significado de “un/uno”, “una” y “el/la” incluyen las referencias en plural. El significado de “en” incluye “en” y “sobre”.

La presente invención se refiere a un método para hacer crecer y encapsular al menos una cepa de bacterias en forma de biopelícula, configurada para la liberación dirigida dependiente del pH de la biopelícula bacteriana en el tracto gastrointestinal.

Según las reivindicaciones, la presente invención proporciona un método,

en donde el método forma una biopelícula,

en donde la biopelícula comprende una población de al menos una cepa bacteriana unida a partículas,

en donde la biopelícula está configurada para colonizar el intestino de un sujeto que lo necesita durante al menos cinco días, cuando se ingiere por el sujeto, comprendiendo el método:

- a. obtener una población que comprende al menos una cepa de bacterias;
- b. inocular un medio de crecimiento que contiene partículas con la población que comprende al menos una cepa de bacterias;
- c. incubar las partículas con la población que comprende al menos una cepa bacteriana durante un tiempo suficiente para que la población de al menos una cepa de bacterias se una a las partículas; y
- d. cultivar la población que comprende al menos una cepa de bacterias unidas a las partículas en un medio de crecimiento, durante un tiempo suficiente para formar una biopelícula, en donde la población de al menos una cepa de bacterias unidas a las partículas se cultiva en condiciones anaeróbicas.

En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para que la población de al menos una cepa de bacterias se una a las partículas es de desde 2 horas hasta 12 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para que la población de al menos una cepa de bacterias se una a las partículas es de 2 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para que la población de al menos una cepa de bacterias se una a las partículas es de 4 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para que la población de al menos una cepa de bacterias se una a las partículas es de 6 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para que la población de al menos una cepa de bacterias se una a las partículas es de 8 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para que la población de al menos una cepa de bacterias se una a las partículas es de 10 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para que la población de al menos una cepa de bacterias se una a las partículas es de 12 horas.

En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de desde 12 horas hasta 48 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 12 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 14 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 16 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 18 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 20 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 22 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 24 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 26 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 28 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 30 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 32 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 34 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 36 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 38 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 40 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 42 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 44 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 46 horas. En algunas realizaciones, el tiempo suficiente para formar una biopelícula es de 48 horas.

En algunas realizaciones, la población de al menos una cepa de bacterias unidas a las partículas se cultiva en el medio de crecimiento en condiciones de flujo. Tal como se usa en el presente documento, el término “condiciones de flujo” se refiere al movimiento del medio de cultivo en relación con las bacterias unidas a una superficie, en donde el movimiento del medio de cultivo ejerce una fuerza de cizalladura sobre las bacterias.

Sin pretender limitarse a ninguna teoría particular, cultivar la población de al menos una cepa de bacterias unidas a las partículas en condiciones de flujo crea incluso fuerzas de cizalladura suaves en la biopelícula en crecimiento y aumenta la rápida creación de la biopelícula (por ejemplo, en un período de tiempo más corto en comparación con los métodos de crecimiento estacionarios típicos). En algunas realizaciones, un sistema de flujo permite la introducción de medio de cultivo recién preparado en la biopelícula en crecimiento, y la retirada de residuos bacterianos.

En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden una velocidad de flujo de 10 ml/hora a 100 ml/hora. En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden una velocidad de flujo de 20 ml/hora. En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden una velocidad de flujo de 30 ml/hora. En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden una velocidad de flujo de 40 ml/hora. En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden una velocidad de flujo de 50 ml/hora. En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden una velocidad de flujo de 60 ml/hora. En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden una velocidad de flujo de 70 ml/hora. En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden una velocidad de flujo de 80 ml/hora. En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden una velocidad de flujo de 90 ml/hora. En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden una velocidad de flujo de 100 ml/hora. En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden una velocidad de flujo de 10 ml/hora.

En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden agitar el cultivo de bacterias desde 90 hasta 150 rpm. En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden agitar el cultivo de bacterias a 100 rpm. En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden agitar el cultivo de bacterias a 110 rpm. En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden agitar el cultivo de bacterias a 120 rpm. En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden agitar el cultivo de bacterias a 130 rpm. En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden agitar el cultivo de bacterias a 140 rpm. En algunas realizaciones, las condiciones de flujo comprenden agitar el cultivo de bacterias a 150 rpm.

En algunas realizaciones, cultivar la población de al menos una cepa de bacterias unidas a las partículas en condiciones de flujo da como resultado la producción de una biopelícula robusta y saludable en un período de tiempo más corto en comparación con los métodos típicos (por ejemplo, pero sin limitarse a, el 5, el 10, el 20, el 25, el 50 % menos de tiempo). En algunas realizaciones, la biopelícula resultante tiene una mayor resiliencia en condiciones duras en comparación con otros métodos de cultivo, y se detalla adicionalmente en el presente documento.

Con referencia a la figura 1, se muestra un sistema de flujo que puede usarse en el método de la presente invención. Con referencia a la figura 1, el sistema incluye un recipiente que contiene las partículas sólidas para el cultivo de biopelículas, una fuente de medio de crecimiento, tubos que conducen el medio de crecimiento dentro y fuera del recipiente, y una bomba que mueve el medio a través de los tubos. La salida de fluido del recipiente puede volver al depósito de medio para recircularse, o puede drenarse. En algunas realizaciones, este sistema de flujo puede cerrarse, abrirse o semicerrarse. Las flechas que se mueven en sentido horario en la figura 1 representan la dirección del flujo y son sólo con fines ilustrativos.

En algunas realizaciones, la población de al menos una cepa de bacterias unidas a las partículas se cultiva en el medio de crecimiento en condiciones estáticas. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “condiciones estáticas” se refiere a condiciones de cultivo en donde no se ejercen fuerzas de cizalladura sobre las bacterias.

En algunas realizaciones, la población de al menos una cepa de bacterias unidas a las partículas se cultiva en primer lugar en el medio de crecimiento en condiciones estáticas, seguido por cultivo en el medio de crecimiento en condiciones de flujo.

Según la invención, la población de al menos una cepa de bacterias unidas a las partículas se cultiva en condiciones anaeróbicas. Tal como se usa en el presente documento, el término “condiciones anaeróbicas” se refiere a condiciones de cultivo que comprenden la ausencia de oxígeno libre o unido.

5 Partículas

En algunas realizaciones, las partículas son porosas y se seleccionan del grupo que consiste en: semillas, fosfato de dicalcio, arcilla, arena y celulosa.

10 En algunas realizaciones, las semillas se seleccionan del grupo que consiste en: semillas de granada y semillas de fruta de la pasión. En algunas realizaciones, las semillas se trituran.

En algunas realizaciones, las partículas de celulosa comprenden celulosa comercializada con el nombre comercial AVICEL®. En algunas realizaciones, las partículas de celulosa comprenden celulosa comercializada con el nombre comercial SOLKA®.

15 En algunas realizaciones, se usa una pluralidad de partículas en el método para formar una biopelícula según algunas realizaciones de la presente invención. En algunas realizaciones, las partículas oscilan desde 5 micrómetros hasta 1 cm de diámetro. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 5 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 10 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 15 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 20 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 30 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 40 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 50 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 60 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 70 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 80 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 90 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 100 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 200 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 300 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 400 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 500 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 600 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 700 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 800 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro de 900 micrómetros. En algunas realizaciones, las partículas tienen 1 cm de diámetro.

35 Cepas bacterianas

En algunas realizaciones, la población que comprende al menos una cepa bacteriana se deriva de la flora intestinal.

En algunas realizaciones, la población que comprende al menos una cepa bacteriana es una cepa probiótica. Tal como se usa en el presente documento, el término “probiótica” se refiere a una cepa bacteriana que estimula el crecimiento de microorganismos, especialmente aquellos con propiedades beneficiosas (tales como las de la flora intestinal).

En algunas realizaciones, la población que comprende al menos una cepa bacteriana es *Lactobacillus plantarum*.

En algunas realizaciones, la población que comprende al menos una cepa bacteriana es *Acetobacter pomorum*.

En algunas realizaciones, la biopelícula formada mediante el método está configurada para la liberación dirigida dependiente del pH de la biopelícula bacteriana en el tracto gastrointestinal.

En algunas realizaciones, la biopelícula comprende dos o más cepas de bacterias.

La figura 2A muestra imágenes de algunas realizaciones a modo de ejemplo de biopelículas generadas por los métodos de la presente invención. En algunas realizaciones, se han sometido a prueba varios tipos de partículas sólidas apropiadas para cultivar bacterias probióticas y los resultados se muestran en el presente documento. La figura 2A muestra imágenes de microscopio electrónico de una biopelícula de *Lactobacillus plantarum* hecha crecer en diferentes partículas sólidas, tales como, por ejemplo, semillas de fruta de la pasión, semillas trituradas de granada, arcilla de bentonita, partículas de arena, arcilla blanca, fibras de SOLKA, fosfato de dicalcio (DCP), AVICEL. Con la excepción de la arcilla blanca, las bacterias crecen en todos los tipos de partículas.

La figura 2B muestra imágenes de algunas realizaciones a modo de ejemplo de biopelículas generadas por los métodos de la presente invención, que muestran el crecimiento de biopelículas de *Acetobacter pomorum* en semillas trituradas de fruta de la pasión, semillas trituradas de granada y arena. *Acetobacter pomorum* creció y formó una biopelícula en semillas de granada. Sin embargo, se observó un crecimiento muy pequeño en arena. *Acetobacter pomorum* no creció en semillas de fruta de la pasión. Otras especies bacterianas sometidas a prueba, por ejemplo *Pseudomonas spp*, no creció en las partículas sólidas sometidas a prueba, tal como se muestra en la figura 2C.

Sin estar limitado por la teoría, diferentes partículas proporcionan microentornos distinguibles para que las bacterias crezcan, tales como el tamaño de poro, la rugosidad de la superficie, los nutrientes disponibles en las partículas, la viscosidad, la carga superficial, etc., que pueden influir en la capacidad de diversas bacterias para unirse y crecer en diversas clases de partículas.

En algunas realizaciones de los métodos de la presente invención, el método genera una biopelícula que contiene al menos dos cepas de bacterias probióticas (por ejemplo, pero sin limitarse a, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.), donde la biopelícula se genera usando una combinación de al menos dos partículas diferentes (por ejemplo, pero sin limitarse a, semillas de fruta de la pasión, semillas trituradas de granada, etc.). En algunas realizaciones, para crear tales combinaciones, las condiciones de crecimiento (y, por ejemplo, pero sin limitarse a tipo(s) de partículas) se seleccionan según la(s) cepa(s) para su uso en la generación de una biopelícula. En una realización a modo de ejemplo, si dos cepas bacterianas se combinarán eventualmente para generar una biopelícula, cada una de las cepas bacterianas se hará crecer usando la partícula más adecuada para el crecimiento de cada cepa. En algunas realizaciones, cuando dos o más cepas bacterianas se hacen crecer por separado, las cepas bacterianas se combinan durante el procedimiento de encapsulación.

Tratamiento (proporcionado sólo para referencia)

Tal como se describe en el presente documento, puede administrarse una biopelícula a un animal que lo necesite, para colonizar el intestino del animal con la biopelícula.

La biopelícula que comprende una población de al menos una cepa bacteriana unida a partículas se encapsula con un compuesto configurado para liberar la al menos una cepa bacteriana a un pH hallado en el intestino del animal.

El compuesto configurado para liberar la al menos una cepa bacteriana a un pH hallado en el intestino del animal es alginato.

El pH hallado en el intestino del animal es pH 8.

La biopelícula se administra a un animal que lo necesita en una cantidad suficiente para colonizar el intestino. La colonización se confirma por la presencia de la al menos una población de bacterias que está presente en las heces del animal durante al menos 5 días después de la administración.

Las bacterias colonizadas derivadas de la biopelícula pueden poblar el intestino de un mamífero durante al menos una semana (por ejemplo, pero sin limitarse a, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc. semanas). En algunas realizaciones, las bacterias colonizadas derivadas de la biopelícula son sostenibles dentro del intestino de mamífero, es decir, no mueren después de 3 días.

La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^4 a 2×10^9 bacterias por día, durante de 1 a 5 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^4 a 2×10^6 bacterias por día, durante de 1 a 5 días.

La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^4 bacterias por día, durante 5 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^5 bacterias por día, durante 5 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^6 bacterias por día, durante 5 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^7 bacterias por día, durante 5 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^8 bacterias por día, durante 5 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^9 bacterias por día, durante 5 días.

La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^4 bacterias por día, durante 4 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^5 bacterias por día, durante 4 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^6 bacterias por día, durante 4 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^7 bacterias por día, durante 4 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^8 bacterias por día, durante 4 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^9 bacterias por día, durante 4 días.

La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^4 bacterias por día, durante 3 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^5 bacterias por día, durante 3 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^6 bacterias por día, durante 3 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^7 bacterias por día, durante 3 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^8 bacterias por día, durante 3 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^9 bacterias por día, durante 3 días.

La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^4 bacterias por día, durante 2 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^5 bacterias por día, durante 2 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^6 bacterias por día, durante 2 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^7 bacterias por día, durante 2 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^8 bacterias por día, durante 2 días. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^9 bacterias por día, durante 2 días.

La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^4 bacterias por día, durante 1 día. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^5 bacterias por día, durante 1 día. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^6 bacterias por día, durante 1 día. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^7 bacterias por día, durante 1 día. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^8 bacterias por día, durante 1 día. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^9 bacterias por día, durante 1 día.

bacterias por día, durante 1 día. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^8 bacterias por día, durante 1 día. La cantidad suficiente para colonizar el intestino es de 2×10^9 bacterias por día, durante 1 día.

La cantidad suficiente se administra en una sola partícula. Alternativamente, la cantidad suficiente se administra en una pluralidad de partículas.

La cantidad suficiente se mezcla con alimento y se ingiere.

La biopelícula se administra al animal inmediatamente después de que se cultive la biopelícula. Alternativamente, la biopelícula puede almacenarse, antes de la administración. La biopelícula puede almacenarse congelada o, alternativamente, en una forma liofilizada.

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, los cuales junto con las descripciones anteriores ilustran algunas modalidades de la invención de una manera no limitante.

Ejemplos

Ejemplo 1: Tolerancia a la acidez de una biopelícula según algunas realizaciones de la presente invención

Se sometió a prueba la resiliencia de la biopelícula hecha crecer en partículas sólidas en el sistema de flujo tal como se describió anteriormente. Específicamente, el primer parámetro sometido a prueba fue la tolerancia a la acidez y los resultados se muestran en la figura 3.

Se inoculó un cultivo durante la noche de *L. plantarum* en una matriz de granada empapada en medio MRS al 25 % (para estimular la formación de biopelículas, condiciones de inanición (es decir, menos de una concentración del medio de crecimiento del 100 %) en el recipiente de matriz y se dejó todavía durante 2,5 horas (es decir, sin mezclar), y luego se inició el sistema de flujo. Se movió el medio desde el depósito de medio hasta el recipiente de matriz usando una bomba peristáltica a una velocidad de 12 ml/hora durante 5 días. No se recirculó el medio. El medio recién preparado entró en el cultivo y la salida drenó el medio usado. Como control, se usaron bacterias hechas crecer de manera planctónica (es decir, no unidas a una partícula), dando como resultado una falta de formación de biopelículas. Para el control planctónico, se inocularon 4-5 colonias de *L. plantarum* en 6 ml de caldo MRS al 100 % y se dejaron en incubadora a 37 °C durante la noche.

Para someter a prueba la tolerancia a la acidez, se transfirió una serie de viales con PBS ajustado para aumentar el pH usando HCl (disolución madre 0,5 M) preparado por adelantado para crear pH 1, 2, 3 y 2 gramos de las partículas que tenían una biopelícula a los viales y se incubaron durante 1 h. Luego se lavaron las bacterias en PBS y se sembraron 5 microlitros tal como se muestra en la figura 3.

Para el control planctónico, se tomaron 100 µl del cultivo durante la noche en los viales de pH y se incubaron durante 1 h, luego se lavaron las bacterias en PBS y se sembraron 5 microlitros tal como se muestra en la figura 3. Tal como se muestra en la figura 3, las bacterias de la biopelícula muestran una mayor resiliencia a la acidez ya que sobrevivieron bien a pH 2, mientras que las bacterias planctónicas no sobrevivieron.

Sin pretender limitarse a ninguna teoría particular, el pH en el estómago es aproximadamente pH 2. Por tanto, tras la administración de la biopelícula a un sujeto, la biopelícula sobrevivirá al entorno del estómago del sujeto (es decir, pH de 2) y colonizará al sujeto.

Ejemplo 2: Tolerancia a la acidez de otra biopelícula según algunas realizaciones de la presente invención

Se realizó un segundo conjunto de experimentos y demuestra una resiliencia bacteriana a la acidez (es decir, en forma de una biopelícula) que se describe en la figura 4 y se muestra en las tablas 1 y 2 a continuación.

Se inoculó un cultivo durante la noche de *L. plantarum* en 7 gramos de partículas de semilla de granada (POM) empapadas en medio MRS al 25 % (condiciones de inanición), y se dejaron todavía durante 2,5 horas. A continuación, se realizó el sistema de flujo durante 5 días, usando una bomba peristáltica que movió el medio a una velocidad máxima (aproximadamente de 380 ml/hora). En este experimento, se recirculó el medio, para comparar con el control sin flujo/estacionario. Para el control planctónico, se inocularon 4 colonias de *L. plantarum* en 6 ml de caldo MRS al 100 % y se dejaron en incubadora a 37 °C durante la noche + 5 horas. Los resultados se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1: Crecimiento celular

pH	Planctónicas (células/ml)		Flujo de biopelícula (células/l g de matriz)	
1,5	2×10^4	$2,3 \times 10^4$	-	-
2	$5,6 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	5×10^8	4×10^8
2,5	3×10^6	$6,6 \times 10^6$	$4,5 \times 10^8$	$5,6 \times 10^8$

3	$6,3 \cdot 10^8$	$6,3 \cdot 10^8$	$4,3 \cdot 10^8$	$5,1 \cdot 10^8$
4	$6,3 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^8$	109	$1,3 \cdot 10^9$
7,4	$1,1 \cdot 10^9$	$1,1 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$

Tabla 2: Datos de la figura 4 (logaritmo de los resultados)

pH	Planctónicas (células/ml)		Flujo de biopelícula (células/l g de matriz)	
1,5	4,3	4,36	-	-
2	5,7	5,51	8,69	8,6
2,5	6,47	6,81	8,65	8,74
3	8,79	8,79	8,63	8,7
4	8,79	8,6	9	9,11
7,4	9,04	9,04	8,47	8,57

- 5 Tal como se muestra en la figura 4, la bacteria planctónica mostró una disminución de la supervivencia cuando se expuso a un pH decreciente.

Ejemplo 3: Reconstitución de una biopelícula según algunas realizaciones de la presente invención

- 10 Se hizo crecer la biopelícula y se atrapó en alginato recuperado después del secado. Se hizo crecer *L. plantarum* en 25 ml de MRS al 100 % + 2 g de POM durante 4 días a temperatura ambiente para formar biopelículas. Para el control planctónico, se hizo crecer *L. plantarum* en 25 ml de MRS al 100 % durante 4 días a temperatura ambiente. Se sembraron una muestra de POM + biopelícula y control en placas de MRS en diluciones en serie. Otra muestra de cada uno se centrifugó brevemente, se resuspendió en 5 ml de tampón de secado por congelación, se liofilizó durante 24 horas, y se suspendió en 25 ml de MRS. En esta etapa (después de la liofilización pero antes del crecimiento adicional), se sembraron las muestras mediante diluciones en serie. Se dejó crecer el resto de la muestra durante 48 horas adicionales y se volvió a sembrar. Tal como se muestra en la figura 5, las bacterias que crecieron como biopelícula en partículas sólidas mostraron una resistencia y supervivencia mejoradas a la liofilización (es decir, la reconstitución después del secado).

- 20 Ejemplo 4: Tolerancia al ácido de células de *E. coli* DH5a

Se sometió a prueba la tolerancia al ácido de la cepa DH5a de *E. coli* en tres condiciones:

- 25 1. Crecimiento planctónico-*E. coli* en 20 ml de iniciador de LB en agitador durante 5 días a 23 °C.
- 30 2. Crecimiento en condiciones estáticas de biopelícula-*E. coli* en 20 ml de LB con 2 g de diferentes matrices cultivadas durante 5 días en condiciones estáticas a 37 °C.
3. Crecimiento en condiciones de flujo de biopelícula-*E. coli* en sistema de flujo en columna con DCP durante 5 días a temperatura ambiente a una velocidad de aproximadamente 12 ml/hora de LB al 25 % recién preparado. Se tomaron muestras de la parte superior de la columna (cerca de la superficie de aire) y de la parte inferior de la columna.

Se hizo crecer la cepa DH5a de *E. coli* durante la noche con agitación a 37 °C. Se transfirió 1041 desde el iniciador a:

- 35 1. 2 g de Avicel + 20 ml de LB-para cultivo estático de biopelículas.
2. 2 g de fibras de Solka + 20 ml de LB-para cultivo estático de biopelículas.
- 40 3. 3 g de DCP + 20 ml de LB-para cultivo estático de biopelículas.
4. 20 ml de LB-para cultivo planctónico.

- Se transfirieron 2 ml del iniciador durante la noche a 20 ml de LB y se inocularon en la columna del sistema de flujo. Se detuvo el flujo durante 2 horas para permitir la unión de *E. coli* al DCP. Después de 2 horas, se puso en marcha el flujo durante 5 días a temperatura ambiente.

- Después de 5 días de incubación, se tomó una muestra de cada una de las matrices de los experimentos estáticos (DCP, Avicel y Solka) y una muestra del DCP forman la parte superior de la columna y el DCP forma la parte inferior de la columna y se insertó en cinco tubos Eppendorf diferentes ("Eppendorfs"). Se lavaron suavemente las muestras una vez con PBS.

- 50 A partir de cada muestra, se tomó la siguiente cantidad de matriz en dos viales:

1. DCP en condiciones estáticas-0,02 g

2. Avicel en condiciones estáticas-0,03 g

3. Solka en condiciones estáticas-0,02 g

4. DCP en condiciones de flujo de la parte superior-0,03 g

5. DCP en condiciones de flujo de la parte inferior-0,03 g

Se lavó suavemente el contenido de cada Eppendorf una vez con PBSX1. Para cada par de Eppendorf (de cada muestra), se añadió 1 ml de PBSX1(pH=7,4) o 1 ml de PBS (pH=2). Se incubaron los Eppendorf en su lado durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron los Eppendorf a 13.000 rpm durante 2 min, se desechó el sobrenadante. Se añadió 1 ml de PBSX1 a cada Eppendorf y se agitaron con vórtex los Eppendorf a plena potencia durante 30 segundos para liberar las bacterias de la matriz.

Manipulación del cultivo planctónico: Se transfirió 1 ml de cultivo a un Eppendorf y se centrifugó a velocidad completa durante 2 min. Se desechó el sobrenadante y se añadió 1 ml de PBS. 1041 de esto se añadió a:

1. Eppendorf con 1 ml de PBSX1 (pH=7,4)

2. Eppendorf con 1 ml de PBS (pH=2)

Se incubaron los Eppendorf durante 1 hora a temperatura ambiente en su lado, y esta incubación se siguió por centrifugación a 13.000 rpm durante 2 min. Se añadieron 100 µl de PBSX1 a cada Eppendorf.

Recuentos viables:

Se transfirieron 10 µl de cada Eppendorf a 90 µl de PBSX1. Se realizaron siete diluciones en serie 1:10. Se sembraron 3 µl de cada dilución en una placa de LB y se dejaron en la incubadora durante la noche.

Los cálculos fueron los siguientes para retener bacterias/ml para planctónicas o bacterias/g:

Para matrices: $\text{Número de colonias} \times 10^{\text{número de dilución}} \times 333,33 \times (1/\text{g tomado})$

Para planctónicas: $\text{Número de colonias} \times 10^{\text{número de dilución}} \times 333,3$

Todos los materiales en este experimento se esterilizaron en autoclave para la esterilización. Los resultados que se muestran en las tablas a continuación y en la figura 6 demuestran que la biopelícula aumentó la tolerancia al ácido de las bacterias, en las condiciones estáticas y mostró un mayor aumento en las condiciones de flujo.

Tabla 3: Resultados (E. coli DH5α):

	pH = 2	pH = 7	% de supervivencia en pH 2
Biopelícula en condiciones de flujo en la parte superior	$1,2 \times 10^{10}$	$2,7 \times 10^{10}$ bacterias/g	44,4 %
Biopelícula en condiciones de flujo en la parte inferior con DCP	$6,6 \times 10^9$	$1,4 \times 10^{10}$ bacterias/g	47,1 %
Biopelícula en condiciones estáticas con DCP	$1,8 \times 10^9$	$3,8 \times 10^9$ bacterias/g	47,36 %
Biopelícula en condiciones estáticas con Solka	$2,3 \times 10^8$	$1,8 \times 10^9$ bacterias/g	12,7 %
Biopelícula en condiciones estáticas	$2,3 \times 10^8$	$2,6 \times 10^9$ bacterias/g	8,8 %
Planctónicas	0 bacterias/ml	$1,9 \times 10^9$ bacterias/ml	0 %

Tabla 4: Escala logarítmica

	pH = 2	pH = 7	% de supervivencia en pH 2
Biopelícula en condiciones de flujo en la parte superior	10,07	10,43	44,4 %

Biopelícula en condiciones de flujo en la parte inferior con DCP	9,8	10,14	47,1 %
Biopelícula en condiciones estáticas con DCP	9,25	9,57	47,36 %
Biopelícula en condiciones estáticas con Solka	8,36	9,25	12,7 %
Biopelícula en condiciones estáticas	8,36	9,41	8,8 %
Planctónicas	0	9,27	0 %

Ejemplo 5: Colonización de intestino murino usando una composición según algunas realizaciones de la presente invención

Para someter a prueba si las bacterias hechas crecer como biopelícula muestran una capacidad mejorada para colonizar el intestino, se preparó la biopelícula tal como se describió anteriormente, y se alimentó la biopelícula a ratones desnudos. Se sometió a prueba la presencia de bacterias en las heces de ratón. En la figura 7 se muestran los resultados.

Protocolo:

1. 6 ratones libres de gérmenes
2. La biopelícula de *Lactobacillus plantarum* hecha crecer en matriz.
3. Alimento molido para ratones mezclado sólo con matriz estéril (triturados conjuntamente).
4. Alimento molido para ratones mezclado con la biopelícula de *L. plantarum* en la matriz (triturados conjuntamente).
5. Alimento molido para ratones mezclado con la biopelícula de *L. plantarum* en perlas de alginato.
6. Kit de tinción para células vivas-muertas (para determinar la presencia de bacterias vivas).
7. Matriz de autoclave para ratones control.
8. Se dividieron los ratones en 3 grupos (2 ratones para cada grupo):
 - a. Ratones de control que se alimentan con alimento+sólo matriz.
 - b. Ratones con biopelícula que se alimentan con alimento+biopelícula en matriz.
 - c. Los ratones con alginato en biopelícula que se alimentan con alimento+biopelícula en matriz en perlas de alginato.
9. Ratones con alimentación con alimento correspondiente durante 7 días (D1-D7).
10. Heces de muestra en el día 8 (D8), día 9 (D9), día 10 (D10), día 11 (D11), día 12 (D12), día 13 (D13) y día 14 (D14).
11. Comprobar la presencia de *L. plantarum* en muestras de heces.

12. Tomar una sección del intestino interno para obtener imágenes de la biopelícula de *L. Plantarum* en el intestino, y teñir para determinar las células vivas-muertas usando un kit de tinción designado.

La figura 7 muestra que las bacterias colonizaron el intestino de los ratones. Se colonizó el intestino de los ratones con las bacterias derivadas de la biopelícula durante más de 3 días y, de hecho, durante hasta, pero sin limitarse a, 14 días.

Ejemplo 6: Liberación dependiente del pH de bacterias de una composición según algunas realizaciones de la presente invención

Se encapsuló una biopelícula que comprendía *E. coli* en DCP en alginato mezclando el DCP con la biopelícula en alginato al 4 % y haciendo gotear gotitas con el material en disolución de CaCl₂ al 2 %, y se hizo crecer una biopelícula que comprendía *L. plantarum* en la parte superior de las perlas de alginato. Luego se trataron las composiciones resultantes según el ejemplo 1 anterior. En la figura 8 se muestran los resultados.

Sólo se liberó *Lactobacillus plantarum* cuando las perlas se insertaron en una disolución a pH=2. A pH=8 se liberaron *E. coli* y *L. plantarum* de las perlas.

Ejemplo 7: Colonización de intestino murino usando una composición que comprende *C. minuta* según algunas realizaciones de la presente invención

- 5 Se proporcionó una biopelícula que comprendía *C. minuta* en semillas de granada a ratones SPF una vez a una concentración de 2×10^7 bacterias el día 1 del experimento mezclada con el alimento. Se comprobaron las heces el día 1 (antes del tratamiento con probiótico), 2, 4, 7, 11 y 15 para determinar el % de *C. minuta* en las heces.

Se trató a los animales de la siguiente manera (tres ratones por grupo de tratamiento):

- 10 1. Control-sólo alimento (6 g).
2. Control-alimento (3 g) mezclado con granos de granada (3 g) sólo
15 3. Experimento-alimento (3 g) mezclado con biopelícula de *C. minuta* en granos de granada (3 g).
Se administró a ratones SPF 2×10^7 células de *C. minuta* en una biopelícula en granos de granada (*C. minuta*), granos de granada (sólo POM) o solo dieta (HFD) en el primer día del experimento. Se tomaron muestras de heces antes del tratamiento probiótico (día 1), 2 días, 4 días, 7 días, 11 días y 15 días después del tratamiento probiótico y se enviaron a secuenciación de 16S. Se calculó el porcentaje de *C. minuta* en la población total de bacterias en cada muestra de heces. En la figura 9 se muestran los resultados. Estos datos muestran que la biopelícula que
20 comprende *C. minuta* fue capaz de colonizar el intestino de los ratones durante hasta 15 días, cuando se terminó el experimento, tal como se evidencia por la presencia de *C. minuta* en muestras fecales.

- 25 Ejemplo 8: Colonización de intestino murino usando una composición según algunas realizaciones de la presente invención-Comparación con otros métodos

Se hizo crecer una biopelícula que comprendía *L. plantarum* según las condiciones descritas a continuación, y se dio a ratones SPF una vez a una concentración de 2×10^9 bacterias por día, durante 5 días. Después de este tiempo, se alimentó a los ratones con alimento sólo durante 5 días adicionales.

Se trató a los animales de la siguiente manera (dos ratones por grupo de tratamiento):

- 35 1. Control — sólo alimento
2. Control — alimento con partículas (granos de granada, POM) sólo.
3. Planctónicas. Se hizo crecer *L. Plantarum* durante la noche en agitación a 37 °C en caldo MRS.
40 4. Condiciones estáticas de biopelícula en granos de granada (POM) — 5 g de partículas con bacterias (aproximadamente 10^6 bacterias/día) (según los métodos descritos en el documento DE202013103204)
5. Condiciones de flujo de biopelícula en granos de granada (POM) — 1,5 g de partículas con bacterias.
45 6. Condiciones de flujo de biopelícula en granos de granada (POM) y liofilizadas — 1,5 g de partículas con bacterias (según los métodos descritos en Biomacromolecules 2013, 14, 3214-3222).
7. Complemento probiótico comercial — 2 píldoras por día durante 5 días
50 Se cuantificó la cantidad de *Lactobacillus* usando recuentos de colonias de las heces de ratones tomadas el día 5 (el último día de la admisión de muestra), el día 3 y el día 5 (3 y 5 días después del cese de la admisión de muestra). En la figura 10 se muestran los resultados. Estos datos muestran que la biopelícula que comprendía *L. plantarum* formada según los métodos de la presente invención fue capaz de colonizar el intestino de los ratones durante hasta 5 días, cuando se terminó el experimento, tal como se evidencia por la presencia de *L. plantarum* en muestras fecales. Sin embargo, las composiciones formadas según los métodos descritos en el documento DE202013103204, o en Biomacromolecules 2013, 14, 3214-3222 no fueron capaces de colonizar el intestino de los ratones durante hasta 5 días.
55

REIVINDICACIONES

1. Un método para formar una biopelícula, en donde la biopelícula comprende una población de al menos una cepa bacteriana unida a partículas, comprendiendo el método:
 - (a) obtener una población que comprende al menos una cepa de bacterias;
 - (b) inocular un medio de crecimiento que contiene partículas con la población que comprende al menos una cepa de bacterias;
 - (c) incubar las partículas con la población de al menos una cepa bacteriana durante un tiempo suficiente para que la población de al menos una cepa de bacterias se una a las partículas; y
 - (d) cultivar la población de al menos una cepa de bacterias unidas a las partículas en un medio de crecimiento, durante un tiempo suficiente para formar una biopelícula, en donde la población de al menos una cepa de bacterias unidas a las partículas se cultiva en condiciones anaeróbicas, y en donde dicha biopelícula está configurada para colonizar el intestino de un sujeto que lo necesita durante al menos cinco días, cuando se ingiere por el sujeto.
2. El método según la reivindicación 1, en donde la biopelícula comprende: (i) *Lactobacillus plantarum* unido a una matriz de granada/partícula de semilla; o (ii) *Escherichia coli* DH5 alfa unida a una partícula de fosfato de dicalcio, una partícula de Solka o una partícula Avicel, y es tolerante al ácido.
3. El método según la reivindicación 1 ó 2, en donde la biopelícula unida a dicha partícula se encapsula con alginato.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la partícula es una partícula porosa que oscila entre 30 y 500 micrómetros de diámetro.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha partícula se selecciona del grupo que consiste en: fosfato de dicalcio, semillas, arcilla, arena y celulosa.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha partícula consiste en fosfato de dicalcio.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la población que comprende al menos una cepa bacteriana se selecciona de la microflora intestinal.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la biopelícula comprende dos o más cepas de bacterias.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la al menos una cepa bacteriana se selecciona del grupo que consiste en: *Lactobacillus plantarum*, *Christensenella minuta* y *Acetobacter pomorum*.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además una etapa (e) de liofilización de la biopelícula formada en la etapa (d).

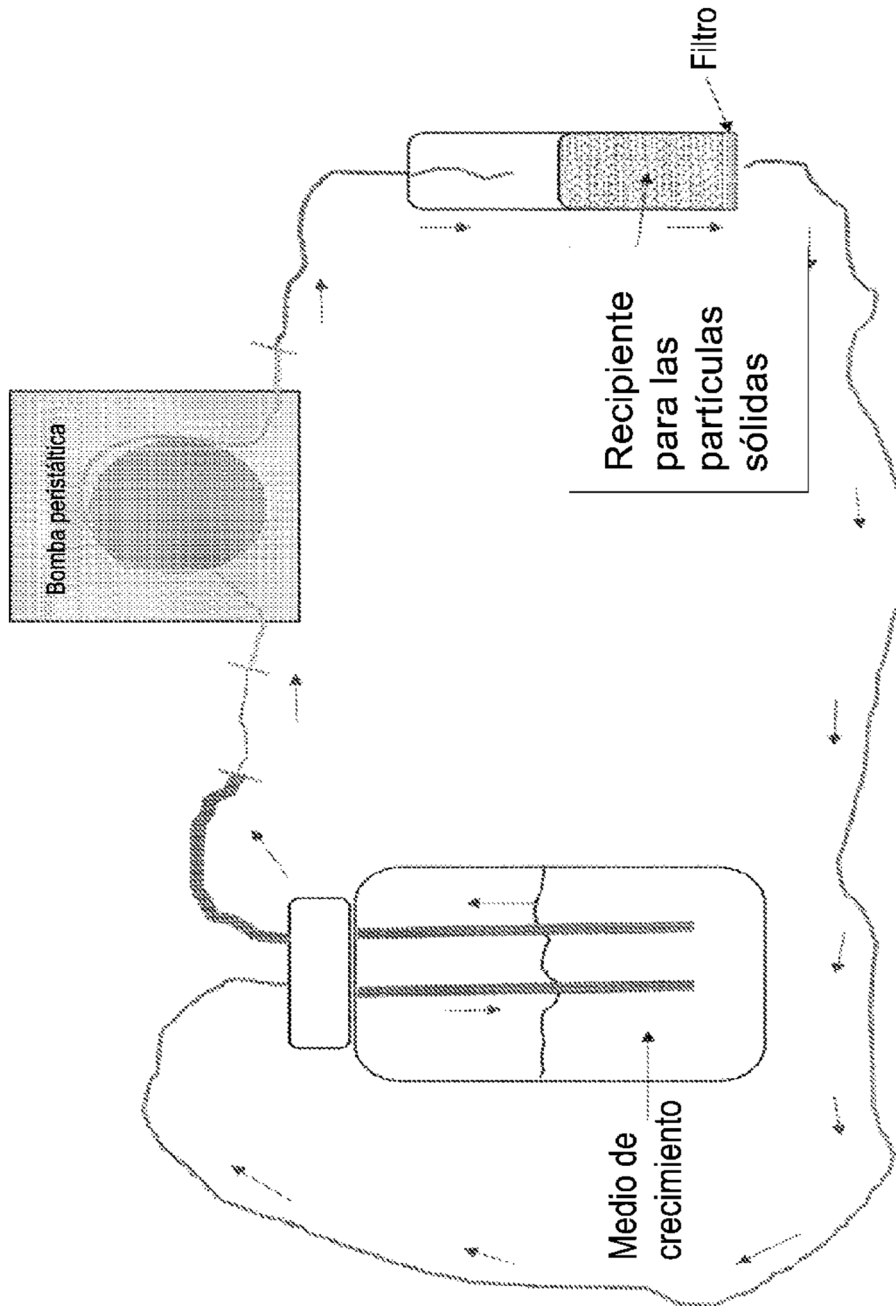
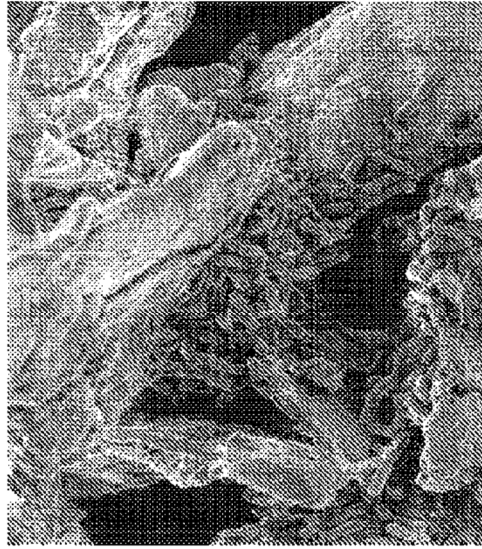


Figura 1

Biopelícula de *Lactobacillus plantarum* en diversas matrices

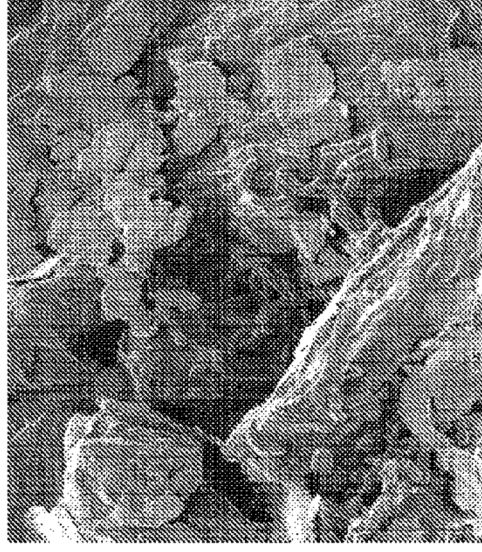
Matrices sintéticas



Fibras de Solka



DCP

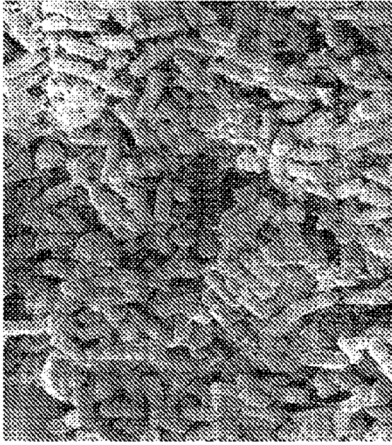


Avicel

Figura 2A
continuación

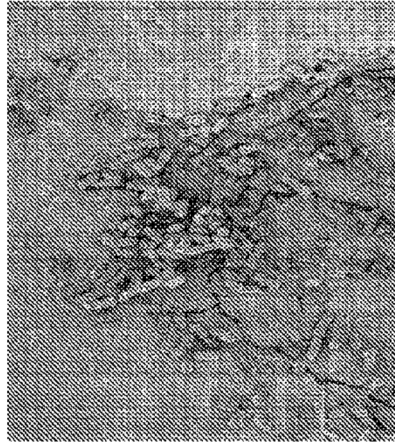
Biopelícula de *Lactobacillus plantarum* en diversas matrices

Matrices orgánicas

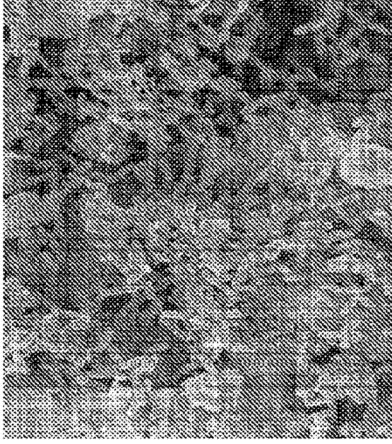


Fruta de la pasión

Matrices inorgánicas



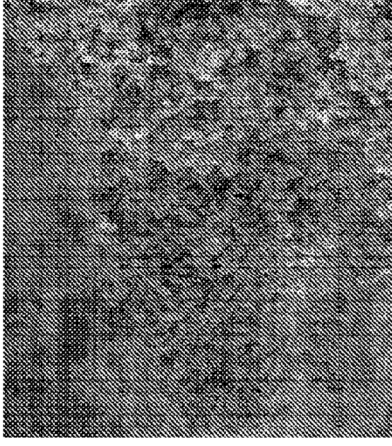
Arena



Granada



Arcilla blanca

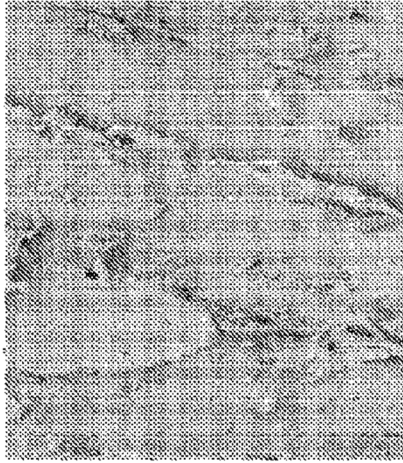


Arcilla de bentonita

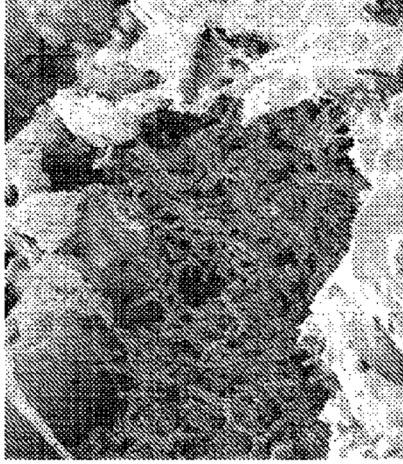
Figura 2A

Biopelícula de *Acetobacter pomorum* en diversas matrices

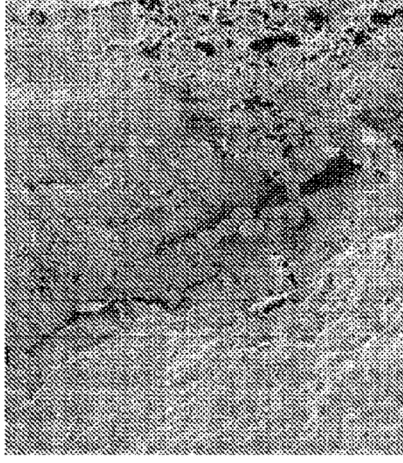
Orgánicas



**Fruta de la
pasión**



Granada

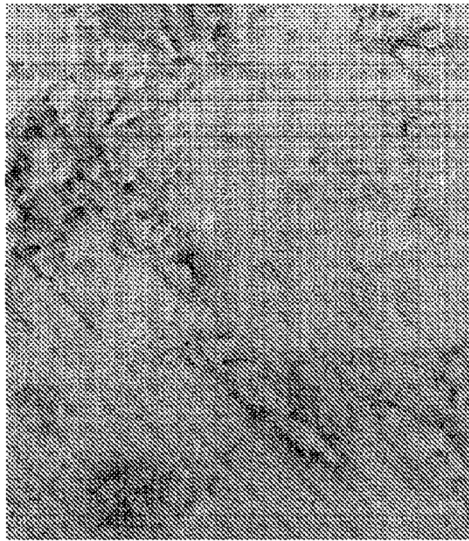


Arena

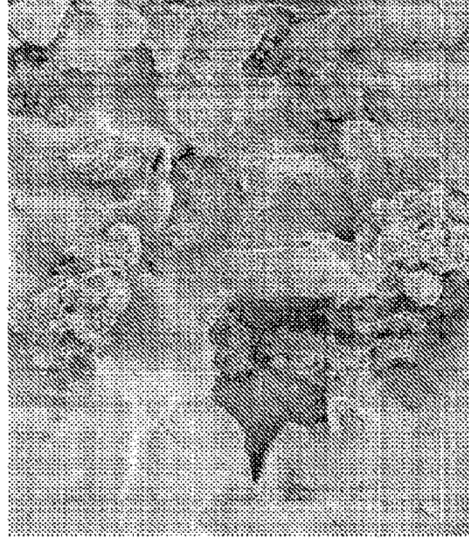
Figura 2B

Biopelícula de *Pseudomonas* spp. en diversas matrices

Matrices
orgánicas



Granada



Fruta de la
pasión

Figura 2C



Figura 3

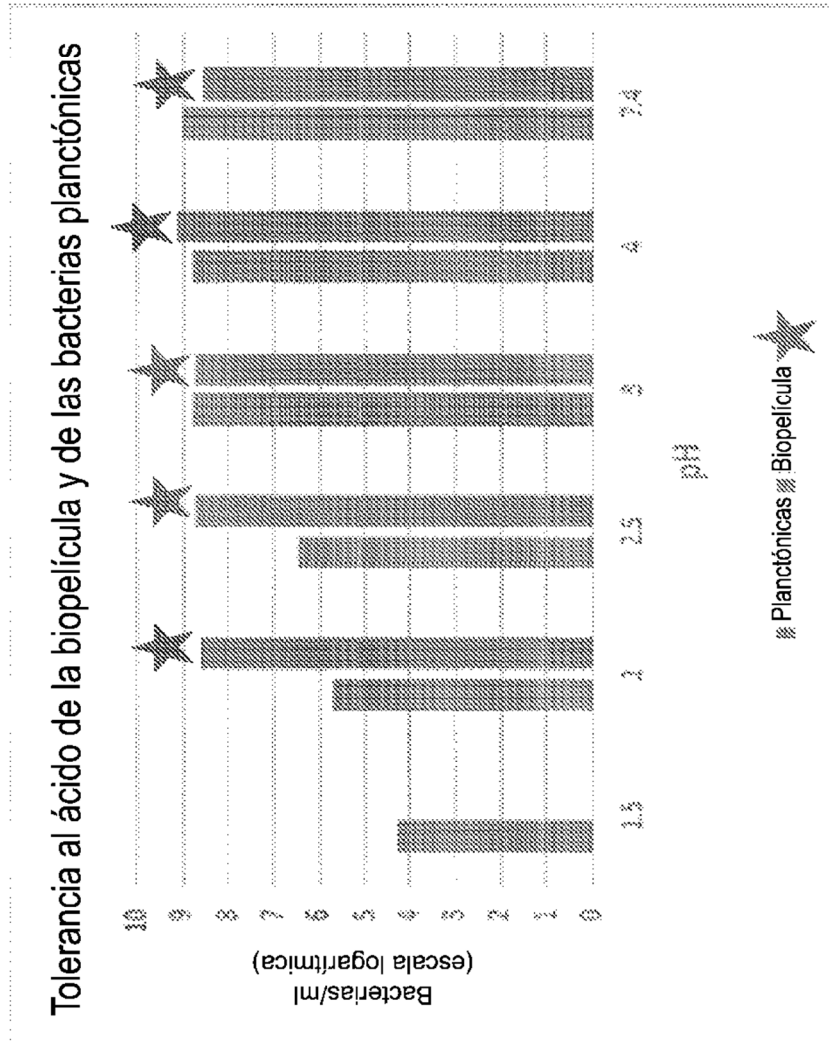


Figura
4

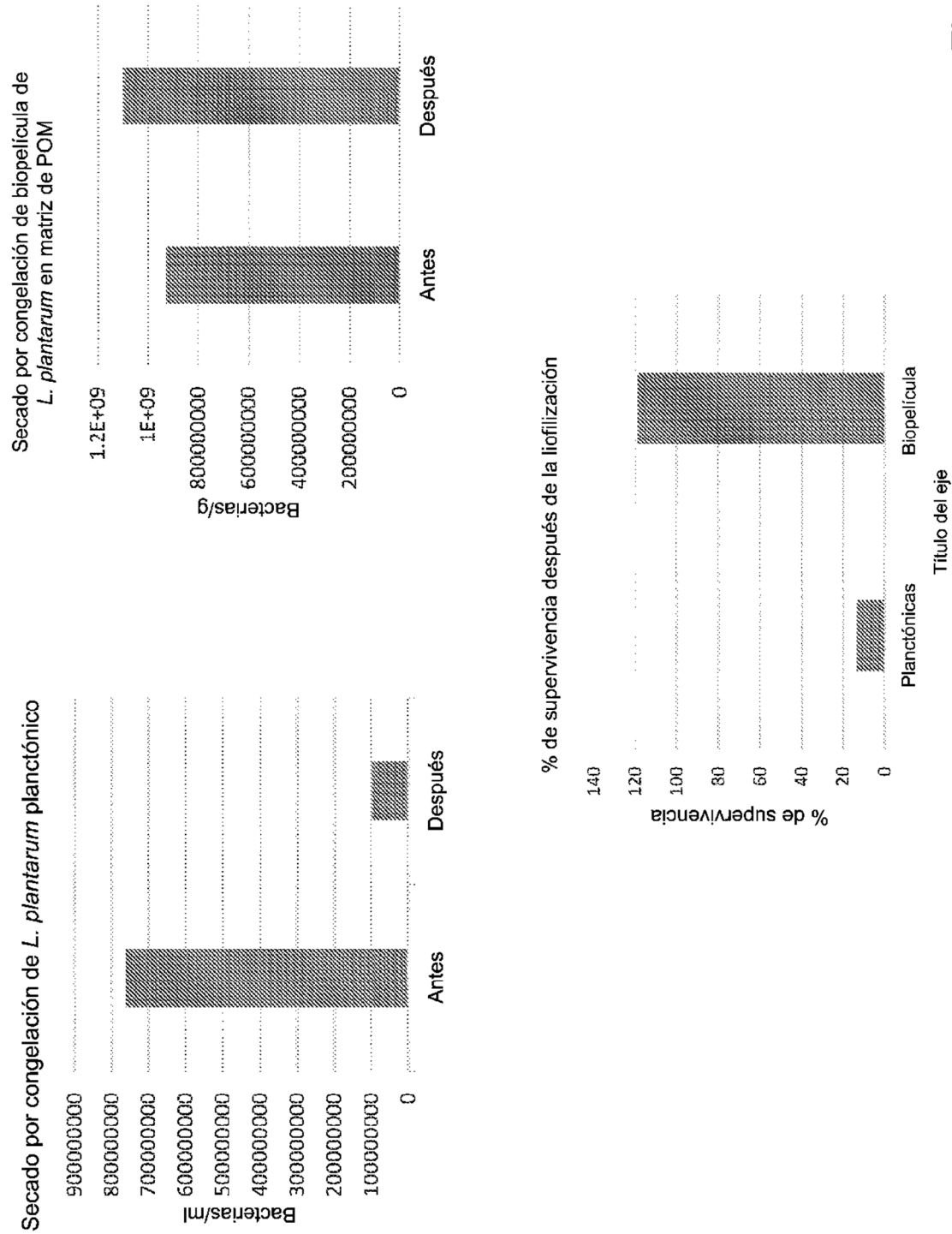


Figura 5

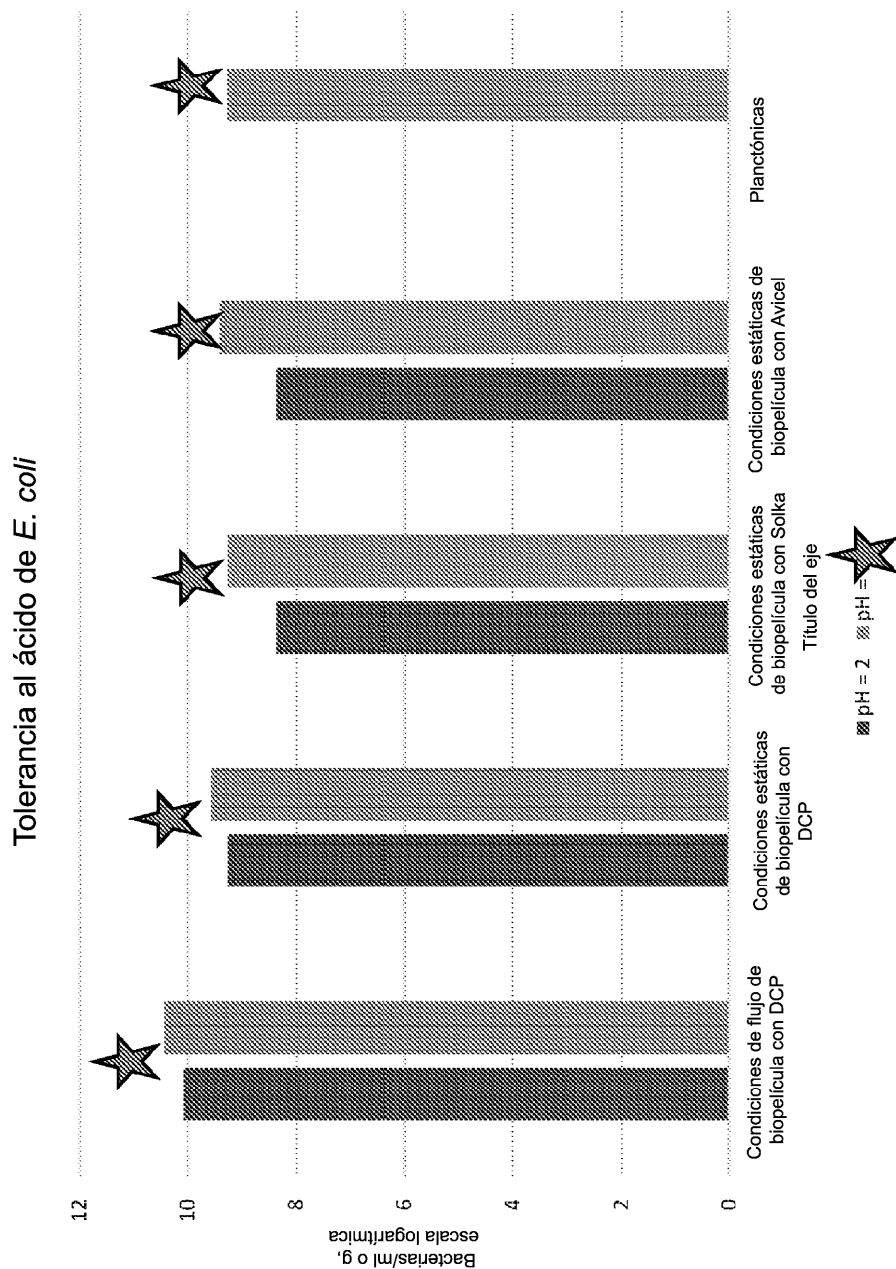


Figura 6

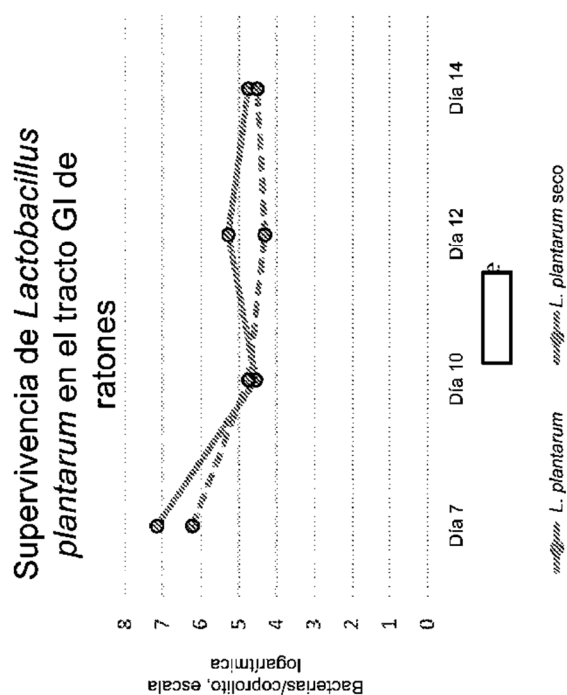
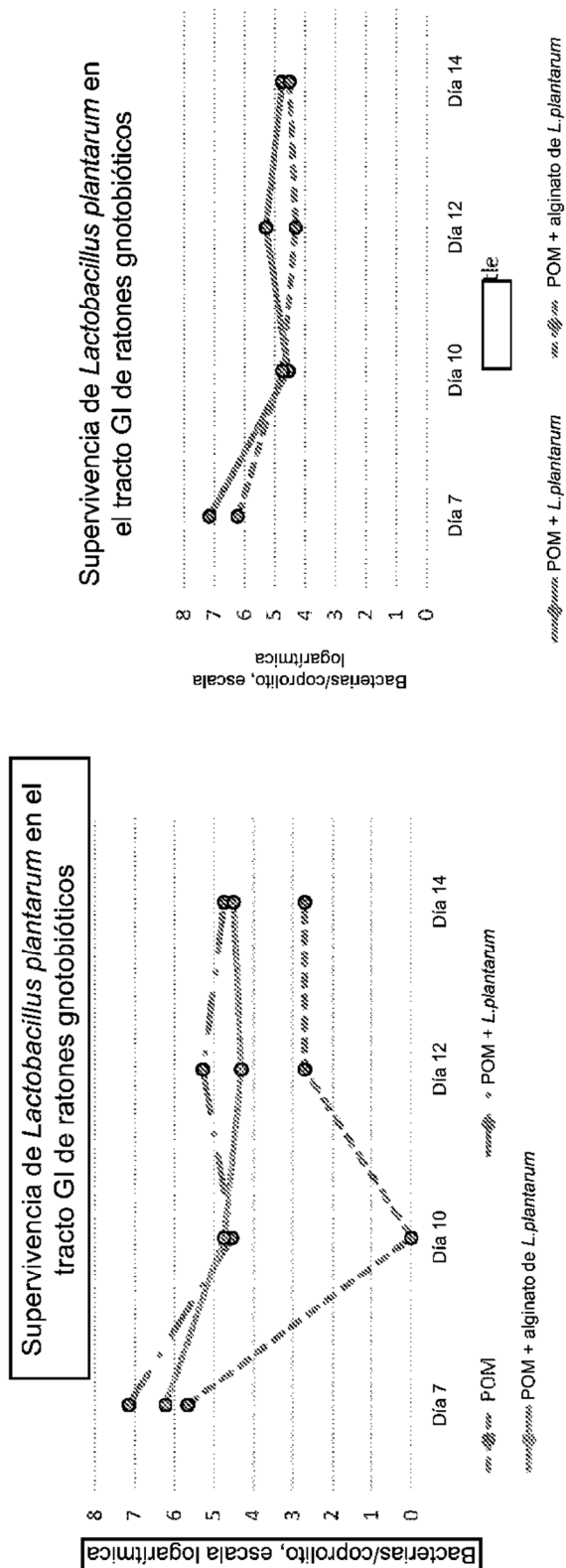


Figura 7

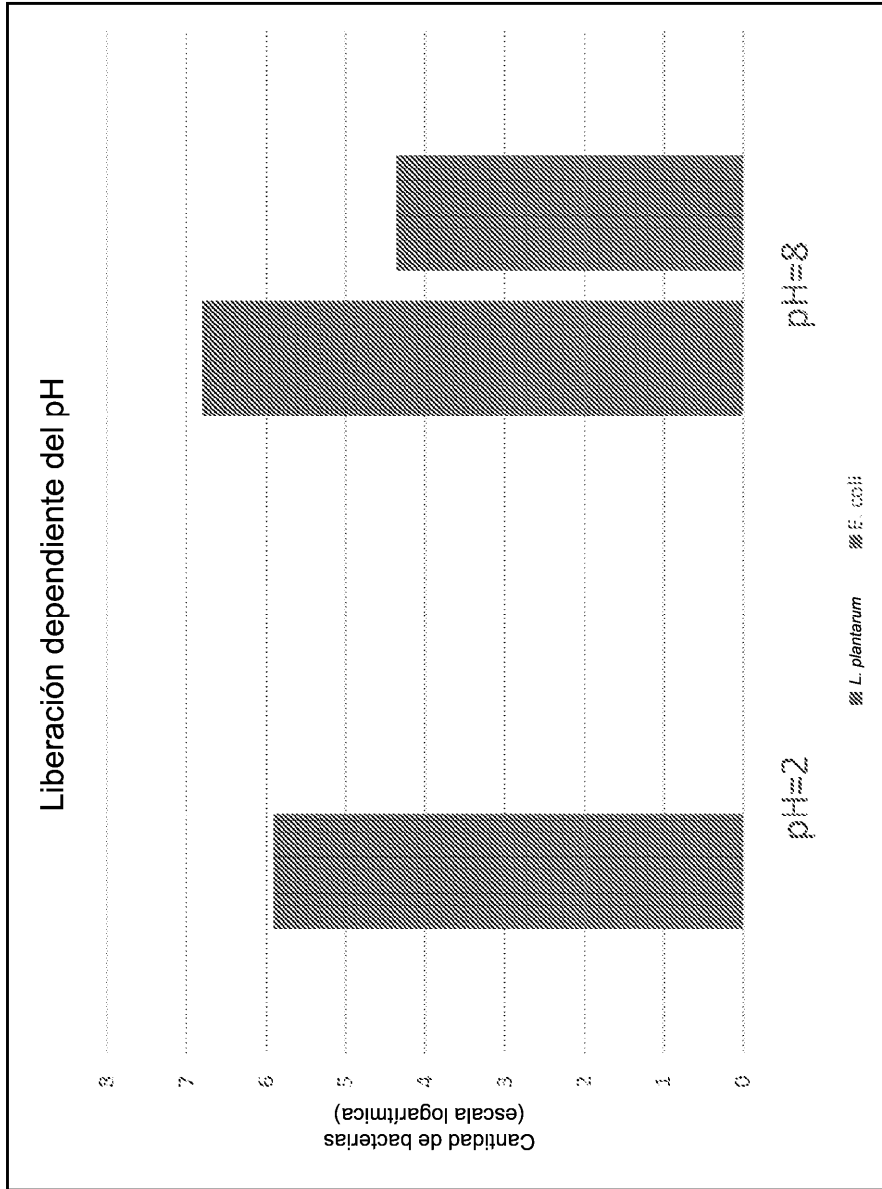


Figura 8

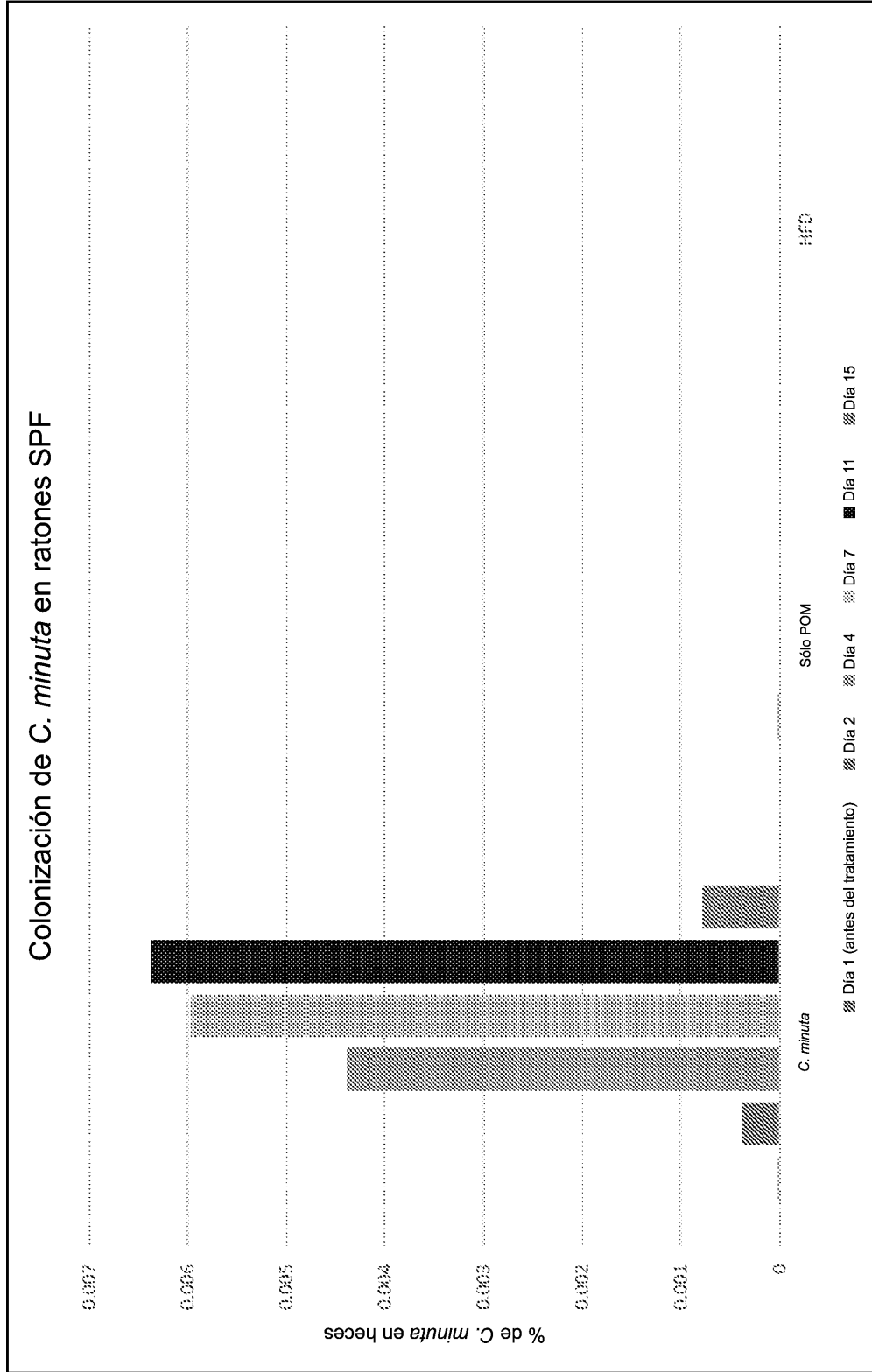


Figura 9

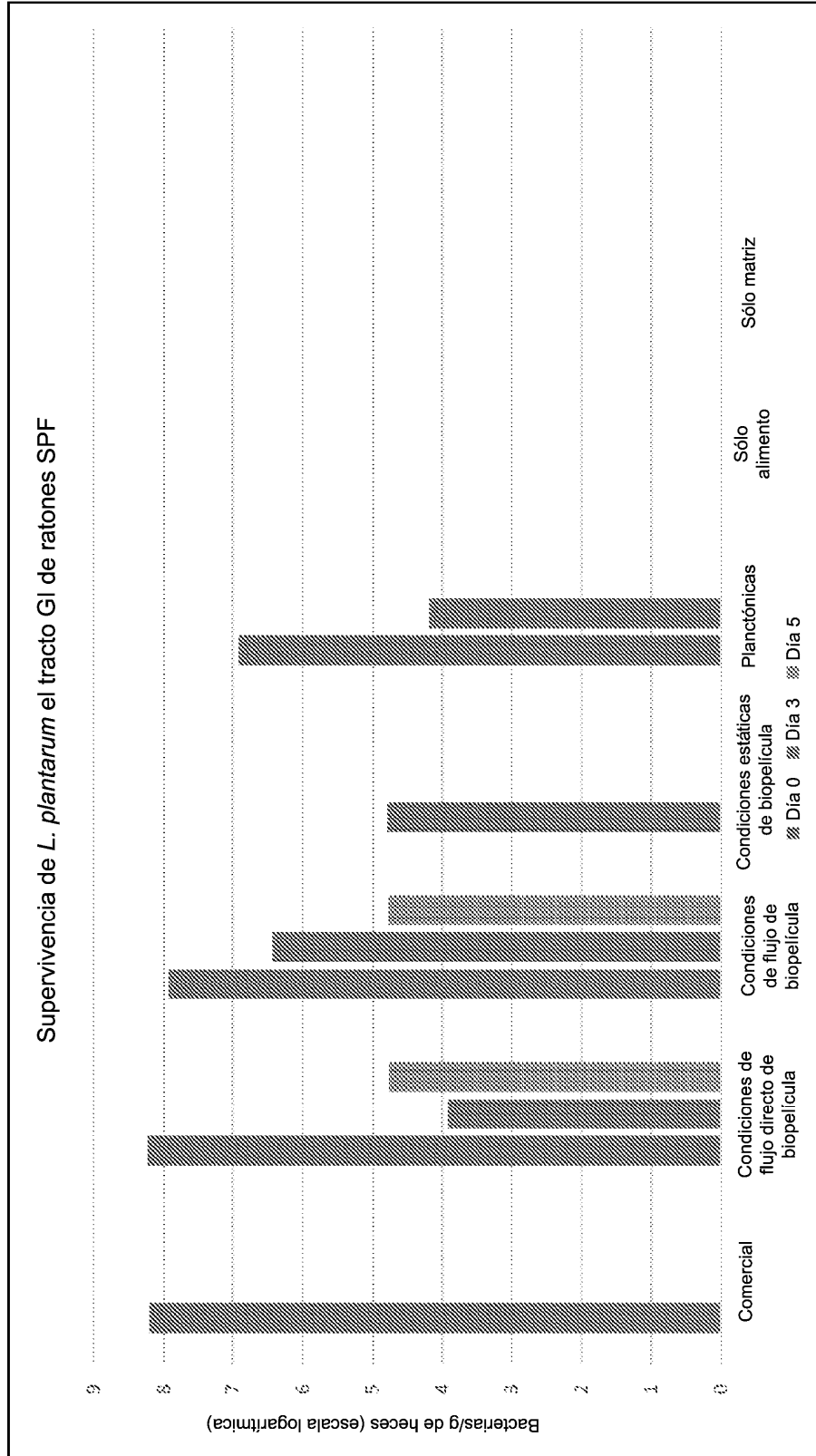


Figura 10