

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COM
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-149368- -00007-0000

Fecha: 2010-06-28 16:42:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 329 CTO:INFORMACION Folios: 60

Re: Expediente N° 09-149.368

**Solicitud de Patente de Invención titulada: "MICROORGANISMOS DE LA
LECHE DE MAMIFEROS, COMPOSICIONES QUE LOS CONTIENEN Y
SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE LA MASTITIS"**

Solicitante: PULEVA BIOTECH, S.A.

Nuestra Ref: P2009/000203

MEMORIAL DE ALCANCE A LA CONTESTACION DEL EXAMEN FORMA

(ART 39)

CARLOS. R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad en referencia, me permito aportar junto al presente memorial, dos (2) documentos de cesión originales debidamente legalizados, en que consta la cesión de dieciocho (18) inventores al solicitante, según lo previsto en el Art. 26-k de la Decisión 486.

Igualmente me permito adjuntar copia completa de la traducción de los anexos del Reporte del Examen Preliminar Internacional.

Atentamente,

CARLOS R. OLARTE
C.C. N°. 79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295

Anexo: Traducción de los anexos del Examen Preliminar Internacional
Documentos de Cesión

PCT

INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación Internacional en Materia de Patentes)

(Artículo PCT 36 y regla PCT 70)

Referencia del Solicitante o Agente <i>P2922OPC00</i>	PROCEDER Ver formulario PCT/IPEA/416)	
Referencia Internacional <i>PCT/EP 2008/056768</i>	Fecha de Presentación Internacional (día/mes/año) <i>02.06.2008</i>	Fecha de Prioridad (día/mes/año) <i>31.05.2007</i>
Clasificación Internacional de Patente (CIP) o Clasificación Nacional y CIP <i>INV. A61K35/74</i>		
Solicitante <i>PULEVA BIOTECH, S.A.</i>		

1. Este informe se trata del Examen Preliminar Internacional, confeccionado por el organismo encargado del Examen Preliminar Internacional según el artículo 35 y enviado al solicitante según el artículo 36.

2. Este INFORME comprende, en total, 11hojas, incluida esta carátula.

3. Además, este informe posee ANEXOS; los mismos comprenden:

a. ☒ (remitidos al solicitante y a la Oficina Internacional) en total 17hojas; aquí se trata de:

☐ hojas con las descripciones, reivindicaciones, y/o ilustraciones que fueron modificadas y en las cuales se basa este informe y/u hojas con correcciones que aprobó el organismo (ver regla 70.16 y sector 607 de los reglamentos administrativos de PCT).

☒ hojas que reemplazan hojas anteriores pero que, según opinión del organismo, contienen una modificación por los motivos indicados en el campo N° 1, punto 4, superando el contenido revelado en la Solicitud Internacional en la versión presentada originalmente.

b. ☐ (remitidos solo a la Oficina Internacional) en total (rogamos indicar tipo y cantidad del (los) soporte(s) electrónico(s) que contiene(n), solo en forma legible por computadora, el (los) protocolo de secuencias y/o las tablas correspondientes tal como está indicado en el campo suplementario referido al protocolo de secuencias (ver sector 802 de las normas administrativas).

4. Este informe contiene indicaciones acerca de los siguientes puntos:

☒ Campo N° I Fundamento del informe

☐ Campo N° II Prioridad

☐ Campo N° III No realización de ningún dictamen sobre novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial

☐ Campo N° IV Falta de uniformidad de la invención

☒ Campo N° V Resolución fundada según regla PCT 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y aclaraciones destinadas a apoyar esta resolución.

☐ Campo N° VI Documentos específicos expuestos

☐ Campo N° VII Carencias específicas de la solicitud internacional

☒ Campo N° VIII Observaciones específicas sobre la solicitud internacional

Fecha de presentación de la solicitud <i>2009-03-31</i>	Fecha de confección de este informe <i>15-09-2009</i>
nombre y dirección postal del organismo encargado del examen preliminar internacional Oficina de Patentes Europea – D-80298 Munich Tel. +49-89 2399-0 Fax: +49 89 23-99-4465	Funcionario Apoderado <i>Sirim, Pinar</i> Tel: +49 89 2399-7732

305

Campo N° I	Fundamento del Informe
------------	------------------------

1. Con respecto al **idioma**, el informe está basado sobre la solicitud internacional en el idioma en que fue presentada, en tanto en este punto no se indique otra cosa.
 - ☒ la solicitud internacional en el idioma en que fue presentada
 - ☐ El informe está basado sobre una traducción del idioma original al siguiente idioma, el que se trata del idioma de la traducción suministrada a los siguientes efectos:
 - ☐ búsqueda internacional (según reglas 12.3 y 23.1 b))
 - ☐ publicación de la solicitud internacional (según regla 12.4)
 - ☐ examen preliminar internacional (según regla 55.2 y 55.3)
2. Con respecto a los **elementos*** de la Solicitud Internacional, el informe se basa en *(las hojas de reemplazo que fueron presentadas al organismo como requisito según el artículo 14 son válidas como "presentadas originalmente" en el marco de este informe y no se adjuntan)*:

Descripción, páginas

1-25 en la versión presentada originalmente

Listas de secuencias como parte de la descripción, páginas

1-9 en la versión presentada originalmente

Reivindicaciones, N°

1 – 17 en la versión presentada originalmente

Ilustraciones, hojas

1/11 11/11 en la versión presentada originalmente

- ☒ un listado de secuencias y/o eventual(es) tabla(s) relacionada(s) – con respecto al protocolo de secuencias, ver campo adicional.
3. ☐ Como consecuencia de las modificaciones caducaron los siguientes documentos:
 - ☐ Descripción: páginas
 - ☐ Reivindicaciones N°:
 - ☐ Ilustraciones: hoja/figura
 - ☐ Listado de secuencias (*especificar*):
 - ☐ Eventual(es) tabla(s) perteneciente(s) al listado de secuencias (*especificar*):
 4. ☒ Este informe fue elaborado sin tomar en consideración (algunas de) las modificaciones, dado que las mismas, según opinión del organismo y por los motivos expresados, exceden el contenido revelado en el texto presentado originalmente (regla 70.2(c)), tal como se indica en el campo suplementario.
 - ☒ Descripción: páginas 8, 16, 17, 22, 23
 - ☒ Reivindicaciones N°: 1-17
 - ☒ Ilustraciones: hojas/figuras 2/11, 3/11, 5/11-11/11
 - ☒ Listado de secuencias (*especificar*): 1-9
 - ☐ Eventual(es) tabla(s) perteneciente(s) al listado de secuencias (*especificar*):

*

4 306

**INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL
SOBRE PATENTABILIDAD**

Solicitud Internacional N°
PCT/EP 2008/056768

Campo N° V	Resolución fundada según el artículo 35(2) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y declaraciones destinadas a apoyar esta resolución		
------------	--	--	--

1. Resolución

Novedad (N)	Sí	Reivindicaciones:	1, 2, 4
	No	Reivindicaciones:	3, 5-17
Actividad inventiva (IS)	Sí	Reivindicaciones:	
	No	Reivindicaciones:	1-17
Aplicabilidad industrial (IA)	Sí	Reivindicaciones:	1-17
	No	Reivindicaciones:	

2. Documentos y aclaraciones (regla 70.7):

ver hoja adjunta

Campo N° VIII	Observaciones definidas acerca de la solicitud internacional
---------------	--

Se hacen las siguiente observaciones acerca de la claridad de las reivindicaciones, la descripción y las ilustraciones o acerca de la cuestión de si las reivindicaciones están completamente apoyadas por la descripción:

ver hoja adjunta

309

**INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL
SOBRE PATENTABILIDAD**

Referencia Internacional
PCT/EP 2008/056768

Campo Suplementario referente al Listado de Secuencias

Continuación del campo I, ítem 2

1. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos o aminoácidos revelados en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, este informe fue confeccionado sobre la base de:
 - a. tipo de material
 - ☒ un listado de secuencias
 - ☐ tabla(s) relacionada(s) con el listado de secuencias
 - b. formato del material
 - ☒ en papel
 - ☒ en forma electrónica
 - c. momento de presentación/suministro
 - ☒ contenido en la solicitud internacional tal como fue presentada
 - ☐ presentada en forma electrónica con la solicitud internacional
 - ☒ suministrada posteriormente a este Organismo a los propósitos de búsqueda y/o examinación
 - ☐ recibido por este Organismo como enmienda* el
2. ☒ Habiéndose presentado más de una versión o copia de un protocolo de secuencias y/o la tabla correspondiente se deben presentar adicionalmente las declaraciones requeridas de que la información de las copias presentadas posteriormente o adicionales coincide con la versión original de la solicitud o que no la supera.
3. Comentarios adicionales:
- * *Si corresponde el ítem 4 del campo I, el listado y/o la(s) tabla(s) relacionadas con el mismo, que constituyen parte del fundamento del informe, deben ser marcadas con "reemplazado".*

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD (HOJA ANEXA)

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2008/056768

El solicitante ha presentado reivindicaciones modificadas, páginas modificadas de la descripción detallada y un listado modificado de secuencias en donde las indicaciones internas del propio Solicitante con respecto a varias cepas bacterianas han sido reemplazadas por los correspondientes números de depósito. Puesto que esta información no estaba contenida en la solicitud tal cual fue presentada y el término según la Regla 13bis.4 (ii) del PCT venció, se considera que la introducción de los números de acceso de depósito faltantes que va más allá de la divulgación tal cual se presentó en la solicitud internacional. Por lo tanto, estas modificaciones no se han considerado al establecer el presente reporte.

Re Ítem V: Declaración razonada con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial; citas y aclaraciones soportando cada declaración

1. Documentos

D1: WO 2004/003235 A (PULEVA BIOTECH S A [ES]; XAUS PEY JORDI [ES]; MARTIN JIMENEZ ROCIO [ES] 8 enero 2004 (2004-01-08)

D2: WO 2005/117532 A (BIOGAIA AB [SE]; BJOERSTEN BENGT [SE]; MOELLSTAM BO [SE]; SJOEBERG EL) 15 de diciembre 2005 (2005-12-15)

D3: WO 2005/034970 (TEAGASC [IE]; UNIV CORK [IE]; ROSS PAUL [IE]; HALLAHAN STEPHEN [IE]) 21 de abril 2005 (2005-04-21)

D4: WO 97/46104 A (BIOGAIA BIOLOG AB [SE]; CASAS IVAN A [US]; MOLLSTAM BO [SE]) 11 de diciembre 1997 (1997-12-11)

D5: EP-A-0 577 904 (NESTLE SA [CH]) 12 de enero 1994 (1994-01-12)

D6: OLIVARES M ET AL: "Potencial antimicrobiano de cuatro cepas de *Lactobacillus* aisladas a partir de leche materna" JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 101, No. 1, julio 2006 (2006-07), páginas 72-79, XP002458357 ISSN: 1364-5072

D7: HEIKKILA M P ET AL: "Inhibición de *staphylococcus aureus* por bacteria comensales de leche materna humana" JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, OXFORD, GB, vol. 95, no. 3, 2003, páginas 471-478, XP 002312462 ISSN: 1364 - 5072

2. Materia de la solicitud

La presente solicitud se relaciona con un método de clasificar y separar microorganismos probióticos a partir de la leche los cuales, luego de su ingesta oral y/o aplicación tópica, son capaces de proteger animales de la mastitis causada por el estafilococo aureus, y también se relaciona con composiciones farmacéuticas que

comprenden dichos microorganismos útiles para el tratamiento y/o profilaxis de reacciones por hipersensibilidad a los alimentos y la intolerancia metabólica, del estreñimiento y otros trastornos gastrointestinales (por ejemplo la diarrea neonatal), de trastornos inflamatorios o auto-inmunes seleccionados a partir del grupo que consiste de IBD (enfermedad inflamatoria intestinal), colitis ulcerativa, artritis, aterosclerosis, esclerosis múltiple, soriasis o sarcoidosis, y de crecimientos tumorales, metástasis, y cáncer en sujetos o animales que necesiten del mismo.

3. Antecedentes

D1, citado en la solicitud, divulga un método para la selección de cepas microbianas probióticas, el cual comprende los siguientes pasos: (i) selección de cepas no patogénicas capaces de sobrevivir en leche materna fresca y/o fluido amniótico, y (ii) selección de cepas no patogénicas capaces de ser transferidas a la leche materna y/o fluido amniótico después de una ingesta oral en individuos sanos sin colonizar otros órganos internos excepto las mucosas. Además, D1 divulga las cepas de ácido láctico CEST 5711 (*Lactobacillus coryniformis*), CEST 5713 (*Lactobacillus salivarius* subespecie *salivarius*), CEST 5714 (*Lactobacillus gasseri*, antes *L. acidophilus*), CEST 5715 (*Lactobacillus gasseri*), CEST 5716 (*Lactobacillus fermentum*) aisladas mediante este método. Las mismas cepas con la misma actividad antimicrobiana contra el *S. aureus* también han sido divulgadas por D6.

D2 divulga un método de seleccionar una cepa bacteriana de ácido láctico para su administración oral en una mujer para el mejoramiento de la leche materna en la misma, el cual comprende una cepa de *Lactobacillus* el cual aumenta los niveles de IL-10 anti-inflamatoria y disminuye el nivel de TGF-beta-2 en leche materna al administrarse en una mujer, por tanto reduciendo el riesgo de desarrollar mastitis en la mujer lactante (ver por ejemplo la página 7, 14, reivindicaciones 1-10).

D3 divulga el aislamiento de una bacteria probiótica de calidad alimenticia no patogénica a partir de granos de kéfir para el tratamiento de enfermedades infecciosas, como por ejemplo una infección localizada en la piel, como una infección tipo mastitis por *S. aureus*. En este caso, se supone que el cultivo es administrado mediante inyección intramamaria directa.

D4 divulga el tratamiento de la diarrea inducida por rotavirus mediante la administración oral de *Lactobacillus reuteri*.

D5 divulga una cepa de *Bifidobacterium* para la producción de alimentos o farmacéuticos, como por ejemplo leche en polvo, para el tratamiento de trastornos gastrointestinales.

D7 divulga bacteria del ácido láctico (LAB) aislada de la leche fresca. Según se pronunció en el resumen, el enfoque del estudio de D7 es la detección de bacteria con actividad antimicrobiana contra el *S. aureus* "conocido como el agente causante de infecciones de seno". Se encontró que varias muestras de enterococos o LAB, tales como el ent. *faecalis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lact. crispatus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconoctoc mesenteroides*. inhibían el crecimiento del *S. aureus* (ver la tabla 3).

4. Novedad

Con respecto a la reivindicación 3 de producto con relación a las cepas probióticas que se obtienen a partir del método de la reivindicación 1, con relación al sobrenadante de un cultivo de tal cepa, con relación a composiciones (farmacéuticas) o con relación a productos alimenticios o nutricionales que comprenden dichas cepas o con relación a los usos terapéuticos de los mismos, se hicieron las siguientes objeciones:

Los antecedentes ya divulgaba varias bacterias lácticas del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* aisladas a partir de la leche las cuales, luego de su administración oral o tópica, son útiles para el tratamiento de enfermedades infecciosas como la mastitis causada por infecciones por *S. aureus* (ver por ejemplo el D2 ó D7) o trastornos gastrointestinales (ver por ejemplo tanto D1 como D4-D6).

Las características técnicas las cuales permitirían distinguir de manera no ambigua aquellas bacterias reivindicadas de las que aparecen en los antecedentes citados no están presentes. Sin embargo, un producto no es considerado novedoso por el solo hecho que sea producido por medio de un nuevo/diferente proceso en comparación con aquellos usados en los antecedentes que divulgan el mismo producto. Por lo tanto, aunque el proceso de selección es novedoso, las cepas probióticas que pueden obtenerse por ende no son novedosas a la luz de los antecedentes citados.

De manera que las reivindicaciones 3, 5 – 17 carecen de novedad según el Artículo 33(2) del PCT.

5. Nivel inventivo

La materia de las reivindicaciones 1 – 17 carece de nivel inventivo por los siguientes motivos:

La reivindicación 1 está dirigida a un proceso para la selección de probióticos que comprenden los pasos (i) al (iv) descrito en la misma.

D1 divulga un método para la selección de cepas microbianas probióticas, el cual comprende los siguientes pasos: (i) selección de cepas no patogénicas capaces de sobrevivir en leche materna fresca y/o fluido amniótico, y (ii) selección de cepas no patogénicas capaces de ser transferidas a la leche materna y/o fluido amniótico después de una ingesta oral en individuos sanos sin colonizar otros órganos internos excepto las mucosas. Las mismas cepas y la actividad antimicrobiana de las mismas también han sido divulgadas por D6 (ver, por ejemplo, la tabla 1 en la página 75 de D6). Por lo tanto, por lo menos D6 divulga de manera explícita el paso de seleccionar cepas capaces de reducir las tasas de supervivencia del *S. aureus* (correspondiente al paso (iii) de la presente reivindicación 1).

A partir de los antecedentes, como por ejemplo D3 al D7, se conocía que la mastitis es causada por infecciones por *S. aureus* y que la bacteria probiótica puede aislarse a partir de la leche y puede usarse para tratar esta enfermedad.

Tanto D1 como D6 puede considerarse que representa el estado de la técnica más cercano que divulguen los pasos (i) al (iii). El estado de la técnica más cercano no divulga el paso (iv) de la presente reivindicación 1, a saber, el paso de selección de aquellas cepas del paso (iii) que son capaces de proteger a los animales de la mastitis.

9 311

Por lo tanto, a la luz del estado de la técnica más cercano D1/D6, el problema que enfrenta la solicitud podría formularse como el de “proporcionar un método de aislar bacterias probiótica a partir de leche fresca de origen mamífera útil en el tratamiento de una enfermedad adicional causada por *S. aureus*”.

La presente solicitud soluciona este problema mediante la provisión de un método de selección según se describe en la presente reivindicación 1 el cual abarca la selección de cepas capaces de proteger a los animales de la mastitis.

Sin embargo, se considera que esta solución es obvia a la luz de D1 ó D6 en combinación con las enseñanzas de tanto D3 ó D7. El antecedente más cercano divulga todos los pasos del procedimiento de selección de la reivindicación 1 para la selección de cepas probióticas con la excepción del paso (iv), a saber, la selección de cepas del paso (iii) capaces de proteger a los animales de la mastitis. Por lo tanto, al compararse con el estado de la técnicas más cercano, la presente solicitud apenas menciona una enfermedad más asociada con el *S. aureus*. Sin embargo, la conexión del *S. aureus* con la mastitis ya está divulgado bien sea por D3 como por D7. Por lo tanto, la provisión de cepas probióticas capaces de proteger de la mastitis es obvia a la luz de D1/D6 al combinarse con D3 ó D7.

De manera que la materia de las reivindicaciones 1 a la 17 carece de nivel inventivo según el Artículo 33(3) del PCT.

Aún si se considerara que tanto D3 ó D7 representaran el estado de la técnica más cercano, las presentes reivindicaciones carecen de nivel inventivo por las siguientes razones:

A la luz de cualquiera de estos documentos, el problema técnico por resolverse puede verse como “el de proporcionar un método alternativo para el aislamiento de bacterias probióticas adecuadas para el tratamiento de la mastitis.”

Se conocía a partir de los antecedentes citados (D1/D6 ó D7) que las bacterias probióticas útiles en la inhibición del *S. aureus* colonizan de manera natural el seno de mamíferos femeninos, que estas bacterias son secretadas desde la glándula mamaria hacia la leche materna, y que pueden ser aisladas a partir de la leche. A la luz de estas divulgaciones, es obvio que estas bacterias probióticas tienen que transportarse mediante rutas naturales para entrar en la glándula mamaria. Estas rutas pueden incluir una ingesta oral y luego el transporte desde el tracto materno vía corriente linfática o sanguínea o un ingreso tópico por medio de la piel hacia las glándulas mamíferas. Por lo tanto, no es sorprendente que las bacterias probióticas las cuales han sido aisladas a partir de la leche materna sean capaces de colonizar la glándula mamífera luego de una aplicación oral o tópica.

Por lo tanto, se considera que una persona experta en la materia pueda adaptar los métodos de D3 ó D7 y pueda desarrollar un paso adicional para la selección de bacterias probióticas capaces de colonizar la glándula mamaria luego de una administración oral o aplicación tópica.

De manera que se considera que la materia de la presente solicitud también carece de nivel inventivo a la luz de D3 ó D7 al combinarse con D1 ó D6.

312
10

6. Observaciones adicionales

Debe notarse que como consecuencia de las objeciones realizadas anteriormente bajo los ítems 4 y 5, en principio la presente solicitud también carece de unidad de invento según lo establece la Regla 13 del PCT.

Sin embargo, debido a los importantes defectos mencionadas anteriormente, parece ser en este momento no conveniente interponer una objeción con respecto a la falta de unidad.

Re Ítem VIII.

Claridad y divulgación

1. La materia de las reivindicaciones 10, 13, 14 y 15 no es clara y la materia no está suficientemente divulgada por la presente solicitud por las siguientes razones (Artículo 6 y 5 del PCT):

El proceso de la reivindicación 1 está relacionado con la identificación de bacterias las cuales inhiben el crecimiento del *S. aureus*, el agente causante de la mastitis. Por lo tanto, no es claro cómo las enfermedades no relacionadas con la mastitis o que no estén causadas por el *S. aureus* u otras infecciones bacterianas puedan ser tratadas con las bacterias identificadas por el proceso de la reivindicación 1.

2. En la reivindicación 4, se hace referencia al material biológico que ha sido depositado. Varias de estas cepas están únicamente caracterizadas mediante as designaciones internas del propio Solicitante.

Sin embargo, el Solicitante no ha proporcionado la información requerida por la Regla 13bis del PCT con respecto a dichos depósitos, principalmente los números de acceso de dichos depósitos, dentro del término establecido por la Regla 13bis.4(ii) del PCT. Debe avisarse que al vencerse el término, no es posible la introducción de números faltantes de acceso de depósito.

De manera que la reivindicación 4 viola los requisitos del Artículo 5 del PCT.

En la etapa (iii), puede utilizarse cualquier ensayo conocido en la técnica para medir las tasas de supervivencia de *Staphylococcus* y para medir las tasas de adhesión de *S. aureus* a las células epiteliales. En una realización preferida, se mide el efecto de los probióticos en las tasas de adhesión usando un cultivo confluyente de una línea de células intestinales a la que se añaden las células de *S. aureus* y los probióticos de la invención y se mide el número de células de *S. aureus* unidas mediante cualquier técnica adecuada. Normalmente, la línea de células intestinales es Caco-2 y el número de células unidas se mide mediante inspección directa de las monocapas celulares con microscopía óptica. Además, la etapa (iii) de selección puede implicar también o alternativamente medir la viabilidad de la viabilidad de *S. aureus* en presencia de las cepas probióticas. Puede usarse cualquier ensayo adecuado para medir la inhibición del crecimiento de cepas bacterianas.

Normalmente, la evaluación de la viabilidad de *S. aureus* se lleva a cabo mediante un ensayo de difusión en pocillos de agar.

En la etapa (iv), puede usarse cualquier ensayo para medir la protección frente a la mastitis. Preferiblemente, el ensayo implica usar un modelo animal de mastitis en el que se inyecta al menos uno de los patógenos conocidos por ser el agente causante de la mastitis en la glándula mamaria. Más preferiblemente, el modelo animal es un ratón y el patógeno que es necesario administrar para producir la mastitis es *S. aureus*.

En otro aspecto, la invención proporciona una cepa probiótica que puede obtenerse mediante el procedimiento de la invención. Preferiblemente, la cepa probiótica se selecciona del grupo de *Bifidobacterium breve* depositado en el CECT con el número de registro 7263, *Bifidobacterium breve* depositado en la CECT con el número de registro 7264, *Lactobacillus reuteri* depositado en la CECT con el número de registro 7260, *Lactobacillus plantarum* depositado en el CECT con el número de registro 7262, *Lactobacillus fermentum* en la CECT con el número de registro 7265, *Lactobacillus reuteri* depositado en la CECT con el número de registro 7266, *Lactobacillus salivarius*

registro 7262, *Lactobacillus fermentum* en la CECT con el número de registro 7265, *Lactobacillus reuteri* depositado en la CECT con el número de registro 7266, *Lactobacillus salivarius* depositado en la CECT con el número de registro 7409, 5 *Enterococcus hirae* depositado en la CECT con el número de registro 7410, *Enterococcus faecalis* depositado en la CECT con el número de registro 7411, *Lactobacillus plantarum* depositado en la CECT con el número de registro 7412, *Lactobacillus reuteri* depositado en la CECT con el número de registro 7413. En un 10 aspecto adicional, la invención proporciona un sobrenadante de un cultivo de una o más de las cepas según la invención. El sobrenadante puede obtenerse a partir del cultivo mediante cualquier medio disponible para el experto, incluyendo centrifugación, filtración, flotación y similares.

15 En un aspecto adicional, la invención proporciona una cepa probiótica o una mezcla de cepas probióticas según la invención, o un sobrenadante de un cultivo de una o más de las cepas según la invención para su uso como medicamento.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición 20 que comprende al menos una de las cepas bacterianas de la invención. Preferiblemente, la composición comprende al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 6 de las cepas de la invención, y en la que cada una de las cepas está representada en la composición en una proporción de desde el 25 0,1% hasta el 99,9%, preferiblemente desde el 1% hasta el 99%, más preferiblemente desde el 10% hasta el 90%. En otra realización, la composición comprende cualquiera de las cepas bacterianas de la invención junto con otra cepa o mezcla de cepas y en la que cada una de las cepas está representada en la 30 composición en una proporción de desde el 0,1% hasta el 99%, preferiblemente desde el 1% hasta el 99%, más preferiblemente desde el 10% hasta el 90%. En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un sobrenadante de un cultivo de una o más de las cepas según la invención. 35 Preferiblemente, el sobrenadante está representado en la composición en una proporción de desde el 0,1% hasta el 99,9%,

más preferiblemente desde el 1% hasta el 99% e incluso más preferiblemente desde el 10% hasta el 90%.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una cepa o una composición de la invención o de un sobrenadante de un cultivo de una o más de las cepas según la invención. La preparación farmacéutica puede adoptar la forma de comprimidos, cápsulas, suspensiones bacterianas líquidas, aportes complementarios orales en seco, aportes complementarios en húmedo, alimentación por sonda seca o una alimentación por sonda húmeda. Preferiblemente el probiótico, la composición y el producto farmacéutico que contienen probióticos o que contienen sobrenadantes se dirige a la superficie de la mucosa oral, gástrica y/o intestinal; sin embargo, podría dirigirse también a la mucosa nasofaríngea, respiratoria, reproductora o glandular, y/o a la glándula mamaria y podría administrarse a mujeres y animales por vía oral, nasal, ocular, rectal, tópica y/o vaginal.

En otro aspecto, la invención proporciona una alimentación o un producto nutricional que comprende al menos una cepa probiótica según la invención o de un sobrenadante de un cultivo de una o más de las cepas según la invención. Ejemplos no limitativos de productos alimenticios adecuados que pueden usarse en la presente invención son leche, yogur, queso, cuajada, leches fermentadas, productos fermentados a base de leche, productos a base de cereales fermentados, productos cárnicos fermentados, otros polvos a base de cereales o a base de leche, fórmula de nutrición clínica, helados, zumos, pan, tartas o golosinas, formulaciones de pienso para animales, formulaciones dietéticas semisintéticas o sintéticas, fórmulas para lactantes, fórmulas de nutrición clínica, helados, zumos, harinas, pan, tartas, golosinas o chicles.

La cantidad de dosificación requerida de las cepas probióticas en la composición, alimento o composición farmacéutica descritos anteriormente variará según la naturaleza del trastorno o del uso propuesto de la composición, ya se use

profiláctica o terapéuticamente y el tipo de organismo implicado.

Puede usarse cualquier dosificación adecuada de los probióticos o combinaciones de los mismos en la presente invención siempre que los efectos tóxicos no superen los efectos terapéuticos. Pueden determinarse la toxicidad y eficacia terapéutica mediante procedimientos farmacéuticos convencionales con animales de experimentación, tal como calculando la estadística de DE, (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) o DL (la dosis letal para el 50% de la población). La razón de dosis de los efectos tóxicos con respecto a los terapéuticos es el índice terapéutico, que puede expresarse como la razón DL/DE. No obstante, la actividad de los nuevos microorganismos en el individuo depende naturalmente de la dosis. Es decir, cuanto más se incorporan los microorganismos novedosos por medio de la ingestión o administración del material alimenticio o de la composición farmacéutica anteriores, mayor será la actividad protectora y/o terapéutica de los microorganismos. Puesto que los microorganismos de esta invención no son perjudiciales para los seres humanos y animales y se han aislado finalmente a partir de leche materna de seres humanos sanos, puede incorporarse una alta cantidad de los mismos de manera que se colonizará esencialmente una alta proporción de la mucosa del individuo por los microorganismos novedosos. Se prefieren las composiciones que muestran grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos a partir de estudios en animales se usan para formular un intervalo de dosificación para el uso en animales o seres humanos. La dosificación contenida en tales composiciones está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE, con poca o ninguna toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración. La dosificación exacta se determinará por el médico, a la luz de los factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. Por ejemplo, para preparar una composición

alimenticia según la presente invención, se incorpora al menos una de las cepas probióticas de la presente invención en un soporte adecuado, en una cantidad de desde 10^5 ufc/g hasta aproximadamente 10^{12} ufc/g de material de soporte, 5 preferiblemente desde aproximadamente 10^6 ufc/g hasta aproximadamente 10^{11} ufc/g de material de soporte, más preferiblemente desde aproximadamente 10^6 ufc/g hasta aproximadamente 10^{10} ufc/g de material de soporte.

En el caso de una composición farmacéutica, la dosificación 10 de la cepa probiótica debe ser de desde 10^5 ufc/g hasta aproximadamente 10^{14} ufc/g de material de soporte, preferiblemente desde aproximadamente 10^6 ufc/g hasta aproximadamente 10^{13} ufc/g de material de soporte, más preferiblemente desde aproximadamente 10^7 ufc/g hasta 15 aproximadamente 10^{12} ufc/g de material de soporte. Para el fin de la presente invención, la abreviatura ufc designará una "unidad formadora de colonias" que se define como el número de células bacterianas tal como se revelan mediante recuentos microbiológicos sobre placas de agar.

20 Se ajustan la dosificación y administración para proporcionar niveles suficientes del resto activo o para mantener el efecto deseado. Los factores que pueden tenerse en cuenta incluyen la gravedad del estado patológico, la salud general del sujeto, la edad, peso y sexo del sujeto, tiempo y 25 frecuencia de administración, combinación/combinaciones de fármacos, sensibilidades de reacción y respuesta al tratamiento. Las composiciones de acción prolongada pueden administrarse cada 3 a 4 días, cada semana, o dos veces a la semana dependiendo de la semivida y la tasa de aclaramiento de la formulación en 30 particular.

En una realización preferida, la invención se refiere también a composiciones de las cepas de esta invención en forma liofilizada, deshidratada por congelación o deshidratada, que pueden obtenerse mediante cualquier método convencional conocido 35 en la técnica.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición, producto farmacéutico, alimentación o producto nutricional en los que la cepa probiótica o mezcla de la misma está en forma parcial o totalmente inactivada.

5 Muchas personas tienen una microflora intestinal alterada, es decir, el equilibrio entre las bacterias nocivas y útiles está alterado. Varios factores, entre otros el estrés, la presencia de las sales biliares, y especialmente la dieta, influyen en la flora bacteriana. En estas situaciones, el
10 proceso de fermentación podría alterarse y reducirse el número de bacterias útiles, con la consecuencia de que la mucosa del colon se atrofia y deja de funcionar al mismo tiempo que crece rápidamente el número de bacterias potencialmente malignas. Las cepas probióticas de la invención pueden evitar la adhesión de
15 *S. aureus* a las células epiteliales, así como reducir las tasas de supervivencia de las células de *S. aureus* y de otros muchos patógenos. Por tanto, las cepas probióticas de la invención son particularmente útiles para el tratamiento de dichas enfermedades ya que contribuyen eficazmente a destruir los
20 patógenos mientras que, al mismo tiempo, contribuyen a la repoblación de la superficie de la mucosa con la microflora fisiológica.

Por este motivo, un aspecto de esta invención es el uso de probióticos de la invención y de los sobrenadantes de un cultivo
25 de una o más cepas de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento terapéutico o profiláctico de infestación, o infección crónica o aguda o de la colonización microbiana no deseada, de una superficie mucosa o cualquier otra ubicación en seres humanos, en la que la
30 infestación, infección o colonización está producida por parásitos, bacterias, levaduras, hongos o virus, que afectan a cualquier mucosa o superficie corporal, comprendiendo dicho tratamiento terapéutico la administración de una cantidad eficaz de un probiótico o composición que contiene probióticos, a un
35 sujeto que lo necesita. En una realización preferida, la infección o colonización está producida por parásitos,

bacterias, levaduras, hongos o virus, de cualquier mucosa o superficie corporal en un sujeto o animal que lo necesite.

Los probióticos de la invención se han seleccionado basándose en su capacidad para colonizar la glándula mamaria tras la ingestión oral y para evitar la adhesión a células epiteliales y para disminuir la supervivencia de *S. aureus*. Por tanto, las cepas son adecuadas para el tratamiento de la mastitis. En consecuencia, en un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de cepas probióticas de la invención y de los sobrenadantes de un cultivo de una o más cepas de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la profilaxis de la mastitis infecciosa en seres humanos y animales. Este procedimiento consiste en el uso de cepas probióticas seleccionadas de leche fresca homóloga y en la capacidad de estas cepas para transferirse a la glándula mamaria y ejercer allí sus beneficios, tales como la inhibición de la infección estafilocócica.

Además, las cepas probióticas de la invención han mostrado también tener algunas de las características atribuidas a una posible cepa probiótica, concretamente seguridad y buena resistencia al proceso de digestión y la capacidad de colonización del intestino. Por tanto, las cepas pueden alcanzar el tracto intestinal tras la ingestión oral y ejercer allí sus propiedades terapéuticas. En consecuencia, en una realización preferida, la invención proporciona el uso de las cepas probióticas de la invención y del sobrenadante de un cultivo de una o más de las cepas de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de diarrea neonatal.

Se sabe que las cepas probióticas reducen la producción de citocinas proinflamatorias por macrófagos activados durante trastornos inflamatorios crónicos. En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona el uso de cepas bacterianas, composiciones de la invención y sobrenadantes de un cultivo de una o más cepas de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para la fabricación de un medicamento

para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios. Ejemplos no limitativos de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias de este tipo incluyen EII, colitis ulcerosa, artritis, arteriosclerosis, esclerosis múltiple, psoriasis o sarcoidosis.

Las cepas probióticas según la invención pueden repoblar la barrera intestinal inmunitaria tras la ingestión oral y así, son también particularmente adecuadas para la mejora de la barrera intestinal inmunitaria en un sujeto o animal que lo necesite. En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona el uso de una o más cepas probióticas de la invención y de los sobrenadantes de un cultivo de una o más cepas de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de reacciones de hipersensibilidad frente a alimentos e intolerancia metabólica tal como intolerancia a la lactosa; de estreñimiento y otros trastornos intestinales.

Se sabe que los probióticos son útiles para contrarrestar el cáncer debido a sus efectos en la inhibición de toxinas carcinogénicas en los intestinos tales como nitrosaminas pero también para el efecto de estos probióticos en la modulación de la respuesta inmunitaria natural. En consecuencia, en un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de las cepas expuestas en esta invención y de los sobrenadantes de un cultivo de una o más cepas de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento terapéutico o profiláctico de algunos tipos de cáncer y para inhibir el crecimiento tumoral, la metástasis y el cáncer en un sujeto o animal que lo necesite.

Las cepas de la invención pueden modular la respuesta inmunitaria y el equilibrio entre las citocinas Th1 y Th2. En consecuencia, en un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de la cepa, composiciones y sobrenadantes de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de trastornos alérgicos, asma y trastornos

relacionados con el desarrollo de tolerancia frente a proteínas ingeridas.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de las cepas, composiciones y sobrenadante de la invención en la
5 fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de niveles inmunitarios temporalmente deprimidos en individuos tales como los producidos durante el envejecimiento o en individuos sanos que se someten a un esfuerzo intenso o en general a un gran estrés o tensión fisiológica.

10 En otro aspecto, la invención proporciona el uso terapéutico de la cepa probiótica, de las combinaciones de las cepas y de los sobrenadantes, en el que la cepa o cepas se administran por vía oral, tópica, nasal, enteral, ocular, genitourinaria, rectal o vaginal.

15 Además, debido a la presencia de las cepas seleccionadas en la leche materna, los sujetos que necesitan tratamiento podrían ser no sólo los que ingieren directamente las cepas seleccionadas sino también el feto o recién nacidos en periodo de lactancia. En consecuencia, todavía en un aspecto adicional,
20 la invención proporciona el uso de las cepas, composiciones y sobrenadante de la invención en la fabricación de un medicamento diseñado para administrarse a mujeres en periodo de lactancia para el tratamiento terapéutico o profiláctico de su feto y/o recién nacidos lactantes.

25 Los siguientes métodos y ejemplos ilustran la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: aislamiento de probióticos a partir de leche de mamífero

30 Se obtuvieron muestras de leche fresca (2 ml excepto en el caso de las perras en el que solamente se recogieron 0,5 ml) a partir de 23 mujeres sanas en el día 6-14 después del parto: 8 cerdas en el día 5 después del parto, 9 perras el día 2-10 después del parto y 4 vacas el día 2 después del parto. Ni las
35 mujeres ni los animales tuvieron complicaciones durante el parto y no se administró ningún tratamiento con antibióticos en las

322
26-322

dos últimas semanas previas a la recogida de la muestra de leche. Todas las muestras de leche se congelaron inmediatamente a -80°C .

Con el fin de aislar cepas bacterianas a partir de estas 5 muestras, se sembraron disoluciones seriadas de 0,1 ml en agua de peptona sobre placas de agar MRS, APT, RCM, LM17, GM17 y Elliker a 37°C en condiciones tanto aerobias como anaerobias durante 24-48 horas. Entre las aproximadamente 1200 colonias obtenidas inicialmente, se seleccionaron 120 (10%; incluyen 10 representantes de las diferentes morfologías observadas en las placas) y se subcultivaron en agar MRS a 37°C en condiciones anaerobias. Entre ellos, se seleccionan además 68 aislados con las siguientes características: bacilos que no forman esporas, Gram-positivos, catalasa y oxidasa negativos.

15 Estos 68 aislados seleccionados se caracterizaron adicionalmente tanto fenotípica (API CH50, API ZYM y evaluación de resistencia a antibióticos) como genéticamente (secuenciación del 16S ARNr y perfil de PCR-RADP). Esta caracterización dio como resultado 59 cepas diferentes que se evaluaron 20 adicionalmente a través del procedimiento de selección descrito en esta invención con el fin de obtener posibles candidatos probióticos que puedan proteger frente a la mastitis.

Tras este procedimiento de selección, solamente 6 cepas (2 de mujeres, 2 de perras y dos de cerdas) cumplieron todos los 25 criterios definidos. Se obtuvieron otras cepas de bacterias del ácido láctico a partir de otras especies de mamíferos, tales como cabra, oveja, gato, rata y ratones, pero no cumplieron satisfactoriamente los criterios de selección y por esta razón no se incluyen en esta invención.

30

- *Bifidobacterium breve* obteniéndose dicha bacteria de leche humana
- *Bifidobacterium breve* obteniéndose dicha bacteria de leche humana
- 35 • *Lactobacillus reuteri* obteniéndose dicha bacteria de leche porcina

- *Lactobacillus plantarum* obteniéndose dicha bacteria de leche porcina
- *Lactobacillus reuteri* obteniéndose dicha bacteria de leche canina
- 5 • *Lactobacillus fermentum* obteniéndose dicha bacteria de leche canina
- *Lactobacillus salivarius* obteniéndose dicha bacteria de leche porcina
- 10 • *Enterococcus hirae* obteniéndose dicha bacteria de leche felina
- *Enterococcus faecalis* obteniéndose dicha bacteria de leche felina
- *Lactobacillus plantarum* obteniéndose dicha bacteria de leche felina
- 15 • *Lactobacillus reuteri* obteniéndose dicha bacteria de leche canina

Ejemplo 2: caracterización fisiológica y genética

Todos estos aislados se caracterizaron fisiológica y genéticamente. Para la identificación de cada cepa probiótica, se realizó un análisis de fermentación API 50CH (BioMérieux) de las cepas a 37°C en condiciones anaerobias durante 24 y 48 horas, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados de 24 horas se resumieron en la tabla I. Un sustrato fermentable positivo es aquel con un valor superior a 3.

Debido a la baja especificidad de la caracterización API, se realizó también el análisis de las secuencias del ARNr 16S de las cepas bacterianas seleccionadas. La secuencia del ARN 16S de las bacterias seleccionadas y su perfil de PCR-RADP se muestran en la figura 1. Los resultados obtenidos condujeron a la clasificación de las cepas bacterianas tal como se indicó anteriormente. Con esta clasificación, se depositaron las cepas bacterianas de la invención según el Tratado de Budapest en la CECT -Colección Española de Cultivos Tipo-, Valencia (España) el 17 de abril de 2007 y se les concedieron los siguientes números de acceso:

- *Bifidobacterium breve* CECT7263
- *Bifidobacterium breve* CECT7264
- *Lactobacillus reuteri* CECT7260
- 5 • *Lactobacillus plantarum* CECT7262
- *Lactobacillus reuteri* CECT7265
- *Lactobacillus fermentum* CECT7266

Las siguientes cepas bacterianas de la invención se depositaron de acuerdo al Acuerdo de Budapest en la Colección Española de
10 Cultivos Tipo- CECT, Valencia (España) el 30 de mayo de 2008

- *Lactobacillus salivarius* CECT7409
- *Enterococcus hirae* CECT7410
- *Enterococcus faecalis* CECT7411
- 15 • *Lactobacillus plantarum* CECT7412
- *Lactobacillus reuteri* CECT7413

3

10

Ejemplo 3a: Transferencia a la mama tras la ingestión oral.

Una vez que se obtuvieron las diferentes cepas candidatas a partir de leche de mamífero tal como se indicó en el primer criterio de selección, la siguiente etapa en el procedimiento de selección tal como se describe en la presente invención es que las bacterias deben poder transferirse a la leche tras la ingestión oral o la aplicación tópica. Con el fin de someter a prueba esta capacidad, las supuestas cepas se marcaron

	7263	7264	7260	7262	7265	7266	7413	7412	7402	7401	7411
Penicilina	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S
Ampicilina	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S
Ciprofloxacino	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Ertromicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	E	E
Clindamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	E
Tetraciclina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	E
Vancomicina	S	S	R	R	R	R	R	R	E	S	S
Gentamicina	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Cloranfenicol	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Rifampicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	E

Ejemplo 4d: Producción de metabolitos antimicrobianos

5 Se ha sugerido que el mecanismo principal usado por las sustancias probióticas está controlando el equilibrio entre las bacterias útiles y perjudiciales es el intestino. Cuando se reduce el número de bacterias útiles, las bacterias oportunistas
10 podrían crecer excesivamente y alterar el bienestar del huésped o incluso inducir una infección. La mayoría de los organismos bacterianos han adquirido características o mecanismos que reducen las capacidades de crecimiento de otros microorganismos que cohabitan con ellos y así, permitir su crecimiento
15 selectivo. La reducción de pH a través de la producción de ácido por bacterias del ácido láctico es uno de tales mecanismos. Además, algunas bacterias del ácido láctico producen también componentes de péptidos bioactivos y otros metabolitos que inhiben de manera selectiva el crecimiento de otras bacterias,
20 levaduras u hongos. Este es el caso de reuterina (un aldehído) o bacteriocinas (péptidos, tales como nisina o pediocina PA-1).

 Se evaluaron las cepas probióticas de esta invención para determinar su capacidad para producir metabolitos bactericidas usando un ensayo de difusión en pocillos de agar. Se prepararon
25 placas de agar TSA que contenían 10⁶ ufc/ml de diferente cepa de bacterias patógenas y se sometieron a ensayo tal como se indicó previamente en el ejemplo 3b para *S. aureus*. Los resultados obtenidos se describieron en la tabla III.

30 Tabla III: potencial inhibidor patógeno de las diferentes cepas probióticas de la invención

28 328

	7413	7412	7409	7411	7410	7263	7264	7260	7262	7265	7266
<i>E. faecium</i> F21	+	+	+	-	-	+++	+++	+	+	+++	+++
<i>E. faecalis</i> TAB28	+++	+++	+++	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	++	+/-	+	+/-	+/-	+++	++	++	+/-	+	+++
<i>L. innocua</i> RdC	+	+/-	+	+/-	+/-	++	++	+/-	+	+/-	+/-
<i>E. coli</i> CECT 4076	+++	+++	+++	+	+	+++	+	+++	+++	+++	+++
<i>E. coli</i> RdM	+++	+++	+++	+	+	+	+++	++	+++	+++	+++
<i>S. enteritidis</i> 4396	+++	+++	+++	++	++	+/-	++	++	+++	+++	+++
<i>K. pneumoniae</i> CECT142	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+	+++	++
<i>K. oxytoca</i> CECT60T	+/-	+	+++	++	++	+++	+++	+/-	+/-	+/-	++
<i>P. vulgaris</i> CECT484	++	++	++	+	+	+/-	+	+++	+++	+++	+/-
<i>S. aureus</i> CECT5191	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++
<i>S. epidermidis</i> CECT231	++	++	+++	++	++	++	+++	+++	++	++	++

Ejemplo 5: Efecto de las cepas probióticas de esta invención sobre la traslocación de *Salmonella typhimurium* en ratones tras la inmunización con vacunas de *Salmonella* inactivadas

La traslocación de bacterias Gram-negativas a través del epitelio intestinal puede producirse especialmente en sujetos tras cirugía, enfermedad o infección gastrointestinal. Si no se trata puede conducir a endotoxemia. En este ejemplo, se examinó el efecto de alimentar las cepas probióticas de esta invención sobre la traslocación del patógeno intestinal *Salmonella typhimurium*.

Se sometieron a ayuno ratones Balb/c macho (de 6-8 semanas de edad) con 1×10^8 ufc en 0,2 ml de leche o leche sola durante dos semanas. Después de esto, se inmunizaron los ratones o bien por vía oral o bien no con una vacuna de *Salmonella* inactivada (10^8 ufc inactivadas con paraformaldehído en 0,2 ml de leche). Tras la inmunización, se sometieron a ayuno los ratones durante dos semanas más con las preparaciones probióticas en días alternos durante dos semanas más. Dos semanas después de la inmunización oral, se expusieron todos los ratones por vía oral

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la selección de probióticos que comprende las etapas de:
 - (i) aislar las cepas de bifidobacterias o bacterias del ácido láctico presentes en la leche fresca de una especie de mamíferos mediante la selección en medios de cultivo de ácido láctico,
 - (ii) seleccionar aquellas cepas de la etapa (i) que pueden transferirse a la glándula mamaria tras la ingestión oral y/o colonizar la glándula mamaria tras su aplicación tópica,
 - (iii) seleccionar aquellas cepas de la etapa (ii) que pueden reducir las tasas de supervivencia y/o las tasas de adhesión a las células epiteliales de *Staphylococcus aureus* y
 - (iv) seleccionar aquellas cepas de la etapa (iii) que pueden proteger a los animales frente a la mastitis.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la leche usada en la etapa (i) se selecciona de leche humana, porcina, bovina, de gato, ovina y canina.
3. Cepa probiótica que puede obtenerse mediante el procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2.
4. Cepa probiótica según la reivindicación 3, caracterizada porque la cepa se selecciona del grupo de *Bifidobacterium breve* depositado en la CECT con el número de registro 7263, *Bifidobacterium breve* depositado en la CECT con el número de registro 7264, *Lactobacillus reuteri* depositado en la CECT con el número de registro 7260, *Lactobacillus plantarum* depositado en la CECT con el número de registro 7262, *Lactobacillus fermentum* en la CECT con el número de registro 7265 y *Lactobacillus reuteri* depositado en la CECT con el número de registro 7266, *Enterococcus hirae* depositado en la CECT con el número de registro 7410, *Lactobacillus plantarum* depositado en la CECT con el número de registro 7412, *Enterococcus faecalis* depositado en la CECT con el número de registro 7411, *Lactobacillus salivarius* depositado en la

CECT con el número de registro 7409, *Lactobacillus reuteri* depositado en la CECT con el número de registro 7413.

5. Sobrenadante de un cultivo de una cepa o de una mezcla de cepas según las reivindicaciones 3 ó 4.
6. Cepa probiótica según las reivindicaciones 3 ó 4 o una mezcla de cepas según las reivindicaciones 3 ó 4 o un sobrenadante según la reivindicación 5, para su uso como un medicamento.
7. Composición, producto farmacéutico, alimentación o producto nutricional que comprende al menos una cepa probiótica según las reivindicaciones 3 ó 4 o un sobrenadante según la reivindicación 5.
8. Composición, producto farmacéutico, alimentación o producto nutricional según la reivindicación 7, que está en forma congelada, liofilizada o deshidratada.
9. Composición, producto farmacéutico, alimentación o producto nutricional según las reivindicaciones 7 u 8, en los que la cepa probiótica o la mezcla de la misma está en forma parcial o totalmente inactivada.
10. Uso de una cepa probiótica según las reivindicaciones 3 ó 4 o una mezcla de la misma o un sobrenadante según la reivindicación 5, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de una infestación o infección aguda o crónica, o de una colonización microbiana no deseada, en el que la infección, infestación o colonización está producida por parásitos, bacterias, levaduras, hongos o virus, que afectan a cualquier mucosa o superficie corporal en un sujeto o animal que lo necesite.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que la infección es mastitis y la cepa probiótica se ha seleccionado en la etapa (i) usando leche de la misma especie que se pretende tratar.
12. Uso según la reivindicación 10, en el que la infección es diarrea neonatal.
13. Uso de una cepa probiótica según las reivindicaciones 3 ó 4 o una mezcla de la misma o un sobrenadante según la reivindicación 5, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de reacciones de

hipersensibilidad frente a alimentos e intolerancia metabólica; de estreñimiento y otros trastornos gastrointestinales; de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios seleccionados del grupo de EII, colitis ulcerosa, artritis, aterosclerosis, esclerosis múltiple, psoriasis, sarcoidosis; y de crecimiento tumoral, metástasis y cáncer en un sujeto o animal que lo necesite.

14. Uso de una cepa probiótica según las reivindicaciones 3 ó 4 o una mezcla de la misma o un sobrenadante según la reivindicación 5, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de trastornos alérgicos y asma en un sujeto o animal que lo necesita.
15. Uso de una cepa probiótica según las reivindicaciones 3 ó 4 o una mezcla de la misma o un sobrenadante según la reivindicación 5, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de niveles inmunitarios temporalmente deprimidos en individuos o animales sometidos a estrés fisiológico y derivado de un tratamiento médico.
16. Uso según las reivindicaciones 10 a 15, en el que la cepa o composición se administra por vía oral, tópica, nasal, enteral, ocular, genitourinaria, rectal o vaginal.
17. Uso según las reivindicaciones 10 a 15, en el que la cepa, composición, producto farmacéutico, alimentación o producto nutricional está diseñado para administrarse a mujeres o animales en periodo de lactancia para el tratamiento terapéutico o profiláctico de los fetos y/o sus bebés o crías lactantes.

Lactobacillus fermentum (CECT under Accession N° 7265)

TACACGATATGAACAGNTTACCTCTCATACGGTGNITTCTTCTTTAACAACAGAGCTTTA
CGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGC'TTGCGCCCATTTGTG
GAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCGGTGTCTCAGTCCCATTGTGG
CCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAGGCCGTTACCCCAACCA
CAAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAGCGT
TGTTCATGCGAACAACGNTGT'TATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTGTCCCC
GCTTCTGGGCAGGT'TACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCGTTGGCGACCAAAA
TCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAATTGGGCCAACGCGTTCGACTTGCATGTATTA
GGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAAANTCTAA

Lactobacillus reuteri (CECT under Accession N° 7266)

ACCGNGGGNNAACGACACTGCGNGNACAGNTTACTCTCACGCACGN'TTCTTCTCCAACA
ACAGAGCTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGC'TTG
CGCCCATTTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAG
TTCCATTTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGT
TACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATC
TTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAAT
GTTATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCACTG
GTGATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACT
TGCATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAAANTCTAA

Enterococcus hirae (CECT under Accession N° 7410)

GACAGTTACTCTCATCCTTGTCTTCTCTAACAACAGAGTTTACGATCCGAAAACCTT
CTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTACAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTG
CTGCCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCCCTCTCA
GGTCCGGCTATGCATCGTCGCC'TTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCG
CGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGCGGT'TTGG
ATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTTCTGATGGGCAGGTTA
CCCACGTGTTACTCACCCGTTCGCCACTCCTCTTTTCCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGG
AAAAAGAAGCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTTGAGCCAG
GT

Lactobacillus plantarum (CECT under Accession N° 7412)

TTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCA
CTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTTTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCCTCTCAGGTGG
GCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCCYACCATCTAGCTAATACGCCCGCCGA
CCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATGCGGTCCAAAGTGT
TATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCAC
GTGTTACTCACCAAGTTCGCCACTCAATGTAATCATGATGCAAGCACCAATCAA
TACCAGAGTTTGGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTTGAG

Figura 1B

Figuras modificadas

Enterococcus faecalis (CECT under Accession N° 7411)

CTATCATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACCTCAATTGGAAAGACG
 AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTG
 GAAACAGGTGCTAATAACGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGC
 TTTCCGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAAGGTAAACGAC
 TCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
 ACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGT
 CTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTA
 GAGAAGAACAAAGGACGTTAGTAACCTGAACGTCCCTTGACGGTATCTAACCAAGAACCA
 CGGCTAACTACGTGCCCAGCA

Lactobacillus salivarius (CECT under Accession N° 7409)

GGGTGGGGNGANCAGAACATGAAATGAACAGTTTACATCTCACCTCGCTGNTTCTTTCTT
 CTAACAACAGAGCTTTTACGACTCCGAAGGACCTTCTTCACATCACGCGGCGTNTGCTC
 CATCAGACTTGCCTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGG
 CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGATTGGGCTACGTATCTCACC
 TTGGTAGGCCGTTACCCACCAACTAGTTAATACGCCCGGGTCCATCTAAAAGCGATA
 GNAGAACCATCTTTCATCTAAGGATCATGCGATCCTTAGAGATATACGGNATTAGCACC
 TGTTTCCNAGTGTTATCCCTTCTTTTAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCTCC
 GCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTCGGTGTAAGAAAGTTTCGTTGACTT
 GCATGTATTTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTNATGAGCCAGGATCAAACTCTA

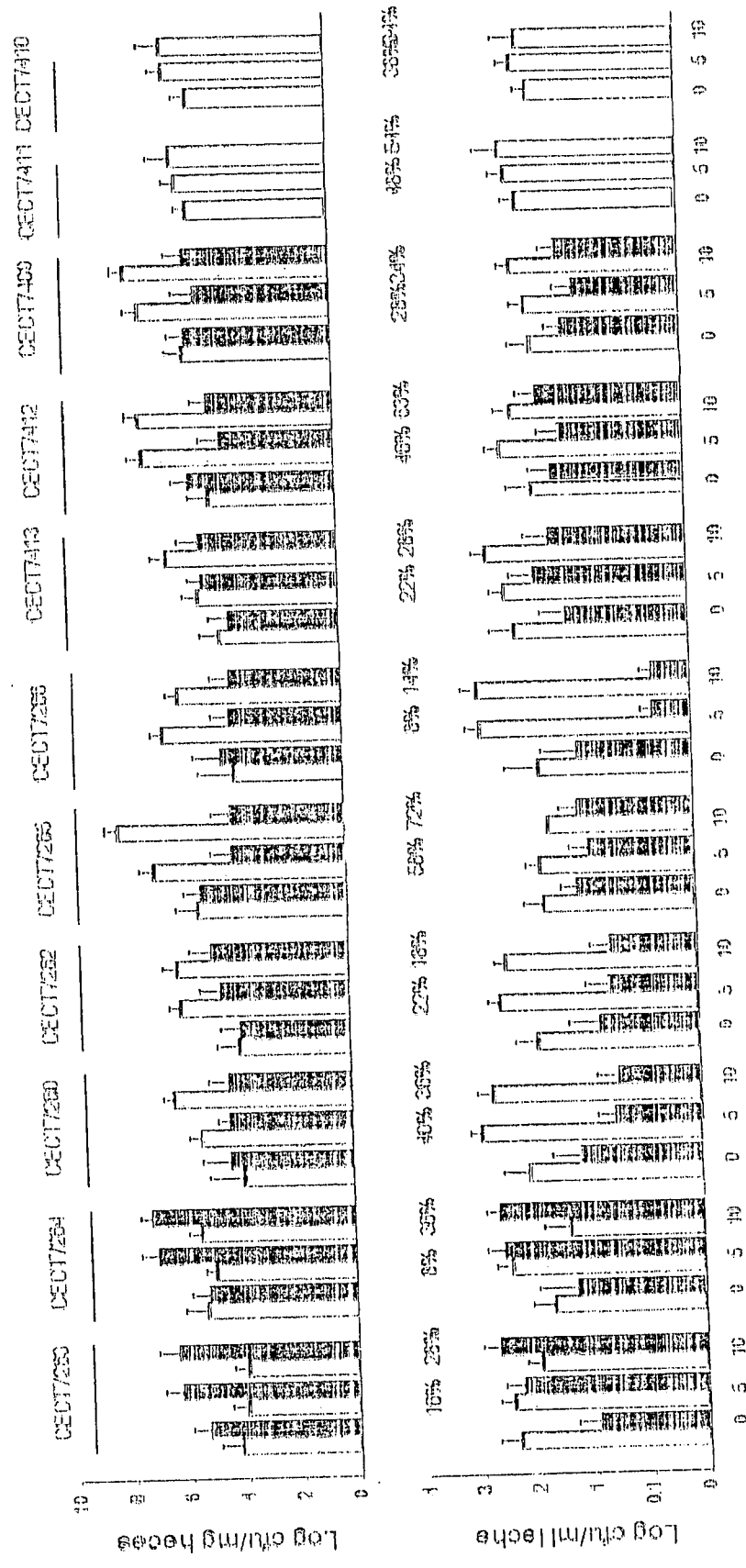
Lactobacillus reuteri (CECT under Accession N° 7413)

GCNTGGGNGAACGGTCACTGCGGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCCTTCTCCAACAA
 GAGCTTTACGAGCCGAAACCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTCCGC
 CCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTT
 CATTTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTTAC
 CTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTT
 CAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTT
 ATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCTCCGCCACTCACTGCTG
 ATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACTTGC
 ATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTTCATCCTGAGNCAGGATCNAACTCTAA

Figura 1C

Figuras modificadas

34 333



Days tras la administración

Figura 2

Figuras modificadas

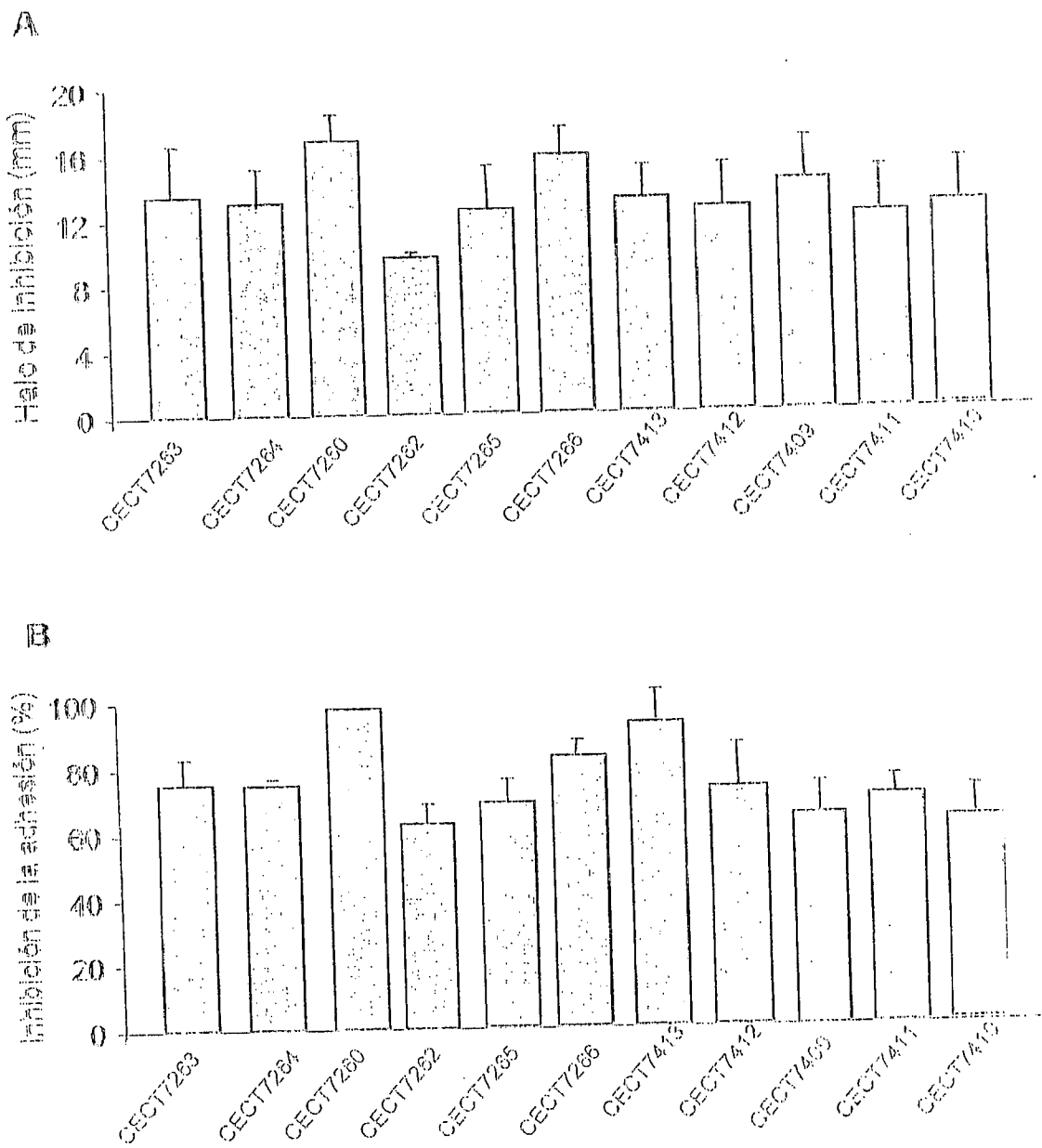
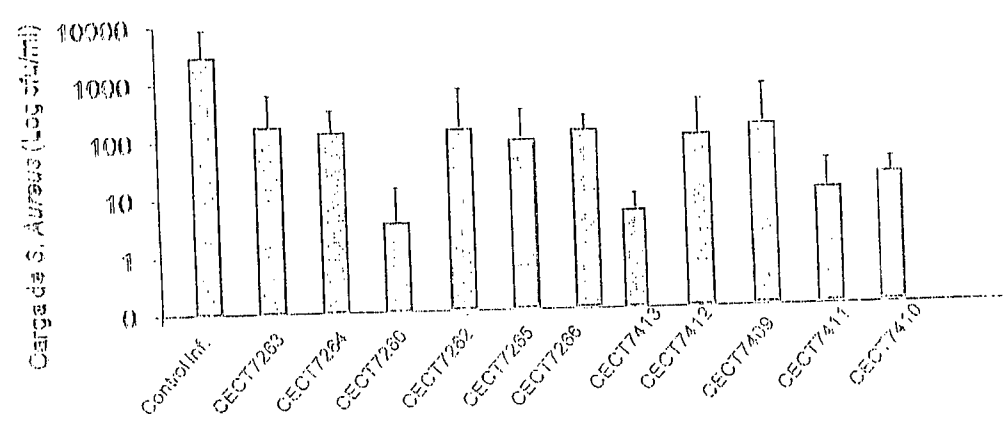


Figura 3

Figuras modificadas

A



B

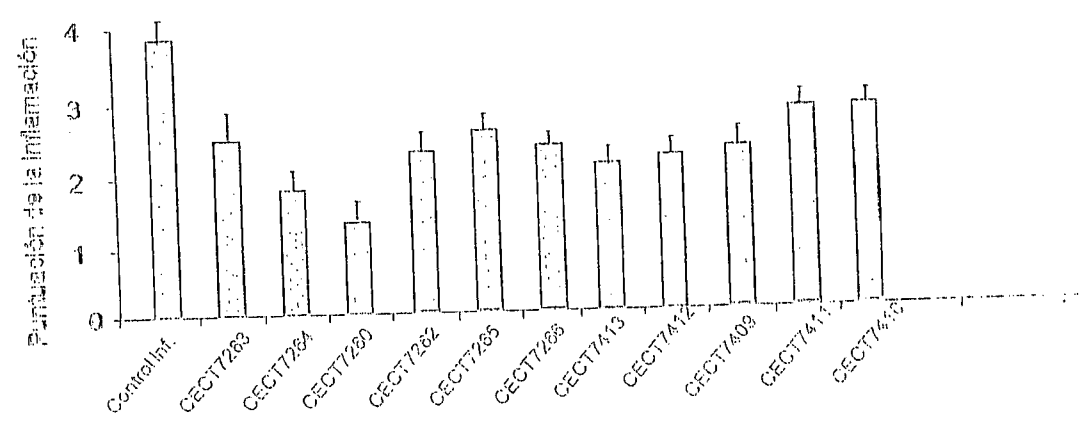


Figura 4

Figuras modificadas

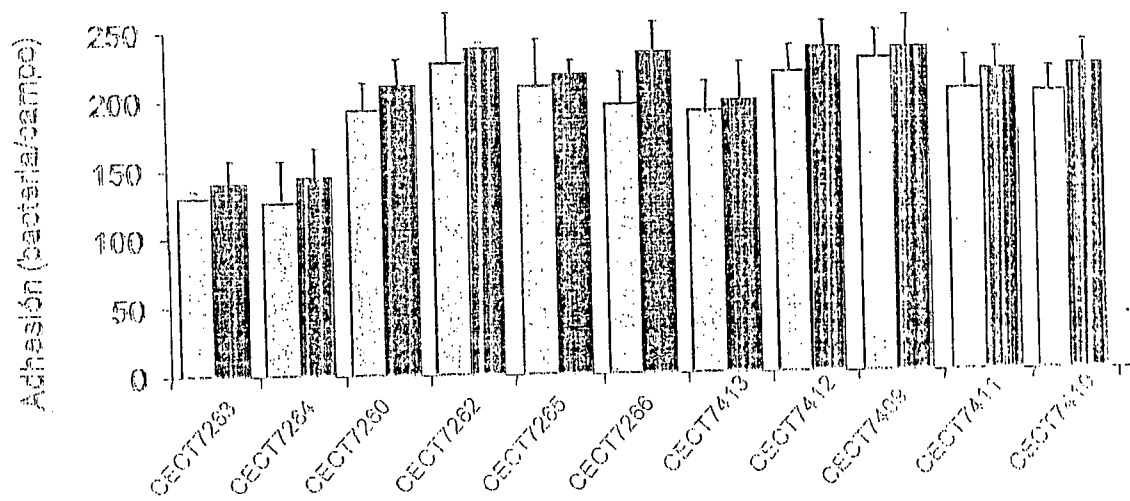


Figura 5

Figuras modificadas

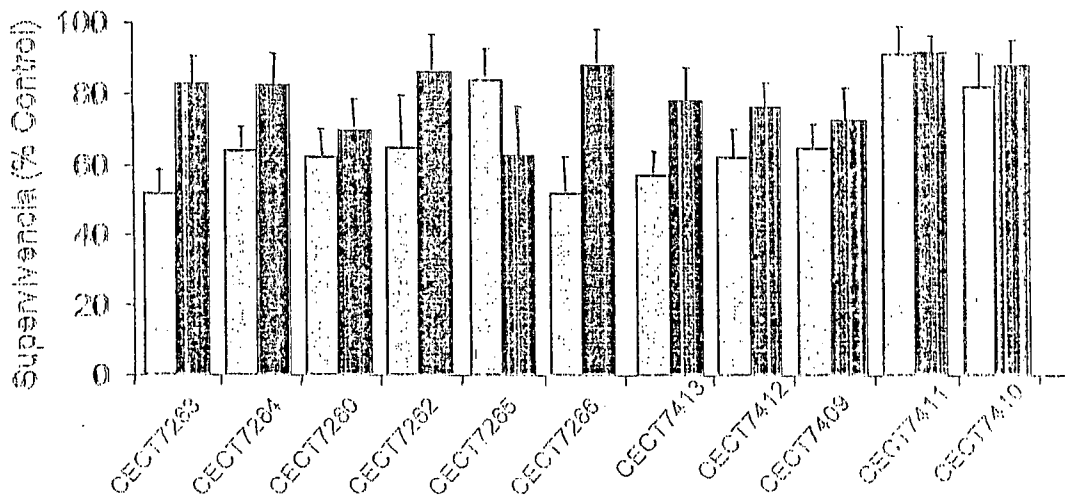
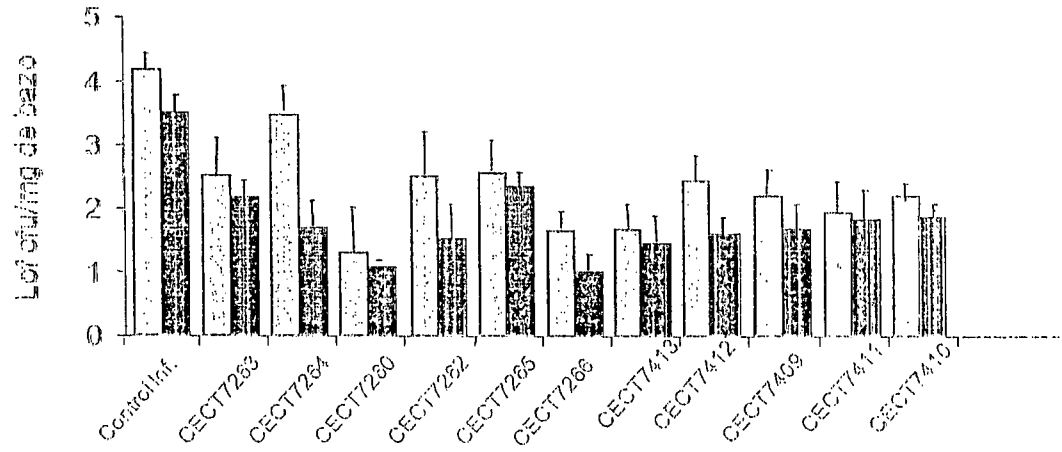


Figura 6

Figuras modificadas

A



B

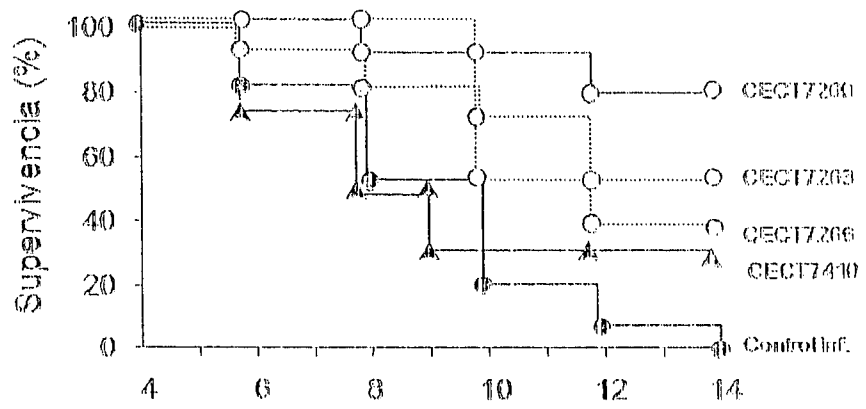
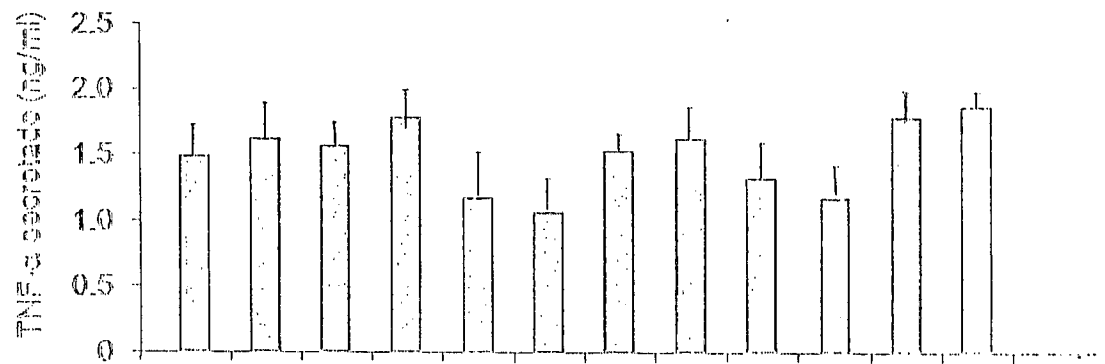


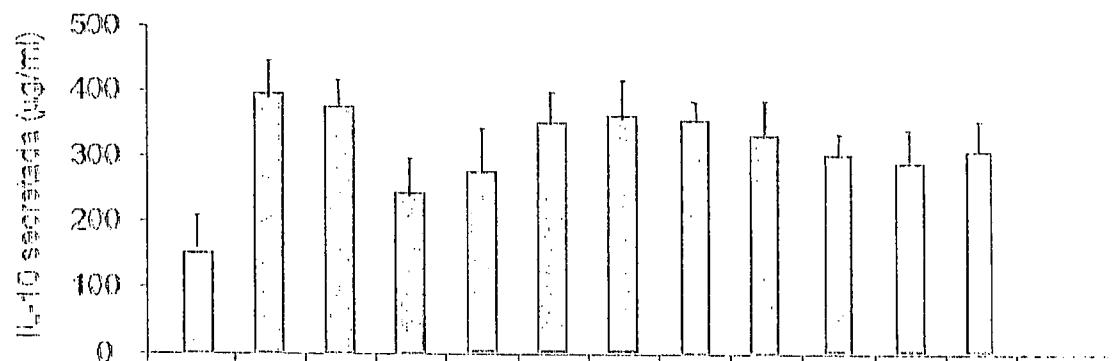
Figura 7

Figuras modificadas

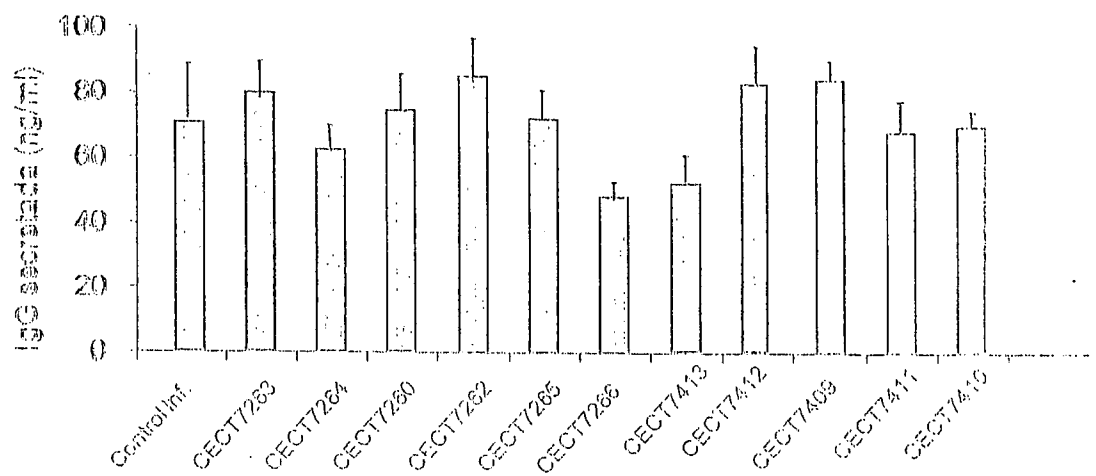
A



B



C



5

Figura 8

Figuras modificadas

38 340

LISTA DE SECUENCIAS

<110> PULEVA BIOTECH S.A.

<120> MICROORGANISMOS DE LA LECHE DE MAMÍFEROS, COMPOSICIONES QUE LOS
CONTIENEN Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE LA MASTITIS

<130> E2922PC00

<150> EP07380158.1

<151> 2007-05-31

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 481

<212> ADN

<213> B. breve CECT 7263

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> n es a, c, g, o t

Lista de secuencias modificada

39

<220>

<221> misc_feature

<222> (131)..(131)

<223> n e s a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (147)..(147)

<223> n e s a, c, g, o t

<400> 1

tcgngtunga agnacaataa acaentaagt gccttgcctc ctaacaaaag aggtttacaa 60

ccgcgaaggc ctccatccct cgcgcggcgt cgtgcacaa ggcttgcgc ccttgatgaa 120

atattcccca ntgcgcctc ccgatagag tctgggcgt atctcagtc caatgtggc 180

ggtgcgcctc tcaggccggc taccgcgca agccatggtg ggcgcgtacc ccgcaccaa 240

gctgatagga cgcgaccca tcccatgcg caaaggcttt cccaacacac catgcgggtg 300

gctggagcat ccgcattac caccgccttc caggagctat tccggtgcac ggggcaggtc 360

ggtaacgcac tactcaccgc ttgcgcactc tcaccaccag gcaaagccgc atggatccgc 420

ttgcacttgc atgtgttaag cgcgcgcga gcgttcacac tgagccagga tcaaacctca 480

a 481

<210> 2

<211> 476

<212> ADW

<213> B. breve CECT 7264

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n e s a, c, g, o t

Lista de secuencias modificada

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (63)..(63)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (72)..(72)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (80)..(80)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (83)..(83)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (87)..(87)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (114)..(114)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (141)..(141)
<223> n es a, c, g, o t

Lista de secuencias modificada

41 343

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (159)..(159)
 <223> n e s a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (161)..(161)
 <223> n e s a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (355)..(355)
 <223> n e s a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (358)..(358)
 <223> n e s a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (369)..(369)
 <223> n e s a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (444)..(444)
 <223> n e s a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (455)..(456)
 <223> n e s a, c, g, o t

<400> 2
 tncgcganga agaaataaaa caaagtgcct tgcctccctaa caaaagaggt tLacaacccg 60
 aangectcca tncctcacgn gnggtencat gcatcaggt tgcgccatt gtgnaatatt 120
 ccccaactgt gctcccgta ngagtctggg ccgtatctna ntcccaatgt ggcgggtcgc 180

Lista de secuencias modificada

42 344

cctctcaggg ccggtacccg tcgaagccat ggtggggcgt taccocgca tcaagctgat 240
 aggacycgac cccatcccat gcgcgaaag ctttcccaac acaccatgcy gtgltgatgga 300
 gcatcgggca ttaccacccg tttccaggag ctattccggt gcatggggca ggtcngtnac 360
 gcattactna cccgttcgcc actctcacca ccaggcaaag ccgatggat cccgttcgac 420
 ttgcattgtt taagcacgcc gcngcgttc atccnnaaac aggatcaaac totaaa 476

<210> 3
 <211> 515
 <212> ADN
 <213> *L. fermentum* CECT 7265

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n e s a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> n e s a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (313)..(313)
 <223> n e s a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (510)..(510)
 <223> n e s a, c, g, o t

<400> 3
 tacacgatat gaacagntta cctctcatac ggtgnttctt ctttaacaac agagcttlac 60

Lista de secuencias modificada

43 345

gagccgaaac ccttcttcac tcacgcggtg ttgctccatc aggtctgcgc ccattgttga 120
 agattcccta ctgctgcctc ccgtaggagt atgggcggtg tctcagtcac attgttgccg 180
 atcagtcctc caactcggct atgcacatc gcccttggtag gccgttacc caccacacag 240
 ctaatgcacc gcaggctccat ccagaagtga tagcgagaag ccattcttta agcgttgctc 300
 atgcgaacaa cgtgttatg cgtattagc atctgttcc aaatgttgct ccccgcttct 360
 gggcaggcta cctacgtgtt actcaccgt ccgcactcg ttggcgacca aaatcaatca 420
 ggtgcaagca ccacaaatca attgggcaaa cgcgttcgac ttgcattgat taggcacacc 480
 gccggcgttc atctgagcc aggatcaaan tctaa 515

<210> 4
 <211> 526
 <212> ADN
 <213> *L. reuteri* CECT 7266

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5) .. (5)
 <223> n e s a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (10)
 <223> n e s a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23) .. (23)
 <223> n e s a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25) .. (25)

Lista de secuencias modificada

44 346

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (46)..(46)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (521)..(521)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 4

accynggggnn aacgacactg cgnnacagn ttactctcac gcaagttctt tctccaacaa 60

cagagcttta cgagccgaaa cctttcttca ctcaacgggt gttgctccat caggcttgcg 120

cccattgttg aagattccct actgctgctt ccgtaggag tatggacctt gtctcagttc 180

cattgtggcc galcagtctc tcaactcggc tatgcacat cgccttggtt agccgttacc 240

ttaccaacta gctaatgcac cgcaggtcca tcccagagtg atagccaaag ccattcttca 300

aacaaaagcc atgtggcttt tgttggttat cggtattagc atctgttctc aaatgttata 360

ccccgtcccg gggcaggtta cctacgtgtt actcaccctt ccgccactca ctggtgatcc 420

atcgtaatac aggtgcaagc accatcaata agttggggca gtgcgtacga ctgcatgta 480

ttaggcacac cgcggcggtt catctgagc caggatcaaa ntctaa 526

<210> 5

<211> 524

<212> ADN

<213> L. reuteri CECT 7260

Lista de secuencias modificada

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n e s a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> n e s a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (507)..(507)

<223> n e s a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (515)..(515)

<223> n e s a, c, g, o t

<400> 5

```

gentgggnga acgggtcactg cygaacagtt actctcacgc acgtttcttct ccaacaacag      60
agcttttacga gccgaaaccc ttcttcactc acgcggtggtt gctccatcag gcttgcgccc      120
attgtggaag attccctact gctgcctccc gtaggagtat gyaccgtgtc tcagttccat      180
tgtggcgat cagttcttca actcggtat gcatcatcgc cttggttaagc cgtttacctta      240
ccaactagct aatgcaccgc aggtccatcc cagagtgata gccaaagcca tcttttcaaac      300
aaaagccatg tggcttttgt tgttatgcgg tattagcabc tgtttccaaa tgttatcccc      360
cgtcccgggg caggttacct acgtgttact cacccgtcgc cactcactg gtgatccatc      420
gtcaatcagg tgcaagcacc atcaatcagt tgggccagtg cgtacgactt gcatgtatta      480
ggcacaccgc cggcgttcat cctgagncag gatcnaaact ctaa                          524

```

Lista de secuencias modificada

48

<210> 6
 <211> 519
 <212> ADN
 <213> *E. plantarum* CECT 7262

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n e s a, c, g, o t

<400> 6
 ggccctgggaa nccggtcata cctggaacag gttacctctc agatatgggtt cttctttaaac 60
 aacagagttt. taagagccga aacccttctt cactcacgcy gcgttgcctc atcagacttt 120
 cgtccattgt ggaagattcc ctactgctgc ctcccgtagg agtttgggac gtgtctcagt 180
 cccaatgttg ccgattaccc tctcaggtcg gctacgtatc attgccatgg tgagccgtta 240
 cctcaccatc tagctaatac gccgcgggac catccaaaag tcatagccga agccctcttt 300
 caaaactcgga ccattgcggtc caagttgtta tgcggtatta gcactctgtt ccaggtgtta 360
 tcccccgctt ctgggcaggt tctccacgtg ttactacca gttcgccact cactcaaatg 420
 taattcatga tcaagcacc aatcattacc agagttcgtt cyacttgcac gtattaggca 480
 cgcgcgcagc gttcgtctctg agacaggatc aaaactcta 519

<210> 7
 <211> 474
 <212> ADN
 <213> *Enterococcus hirae* CECT 7410

<400> 7
 gacagttact ctcattcttg ttctttctca acaacagagt ttacgatcc gaaaactctc 60
 ttactcacg cggcggttgc cygtcagact ttcttcatt gccgaagatt cctactgtc 120

Lista de secuencias modificada

LX

gcctcccgta ggagtttggg ccgtgtctca gtcccaatgt ggcgatcac cctctcaggt 110
 cggctatcca tegtgcctt ggtgagcgt tacctacca actagcta atgcacgcggg 240
 tccatccatc agcgacacc gaaagcgct ttcaaatcaa aaccatggg ttctgatgt 300
 tatacggat tagcacctgt ttccaagtgt tatcccttc tgatgggcag gttaccacg 360
 tgttactcac ccgttcgcca cctctctttt tcgggtggag caagctccg tggaanaa 420
 agcgttcgac ttgcattat taggcacgc gccagcgtt gtctgagcc aggt 474

<210> 8

<211> 469

<212> ADN

<213> Lactobacillus plantarum CECT 7412

<400> 8

ttactctcag atatgttctt cttaacaac agagttttac gagccgaaac ccttcttcac 60
 tcacgcggcg ttgtccatc agactttcgt ccattgtgga agattcccta ctgtgcctc 120
 ccgtaggagt ttgggcgctg tctcagtcac aatgtggccy attacctct caggtcggt 180
 acgtalcatt gccatggta gccgttaccy caccatctag ctaatacgc gccggaccat 240
 ccaaaagtga tagccgaagc catctttcaa gctcggacca tgcggtccaa gttgttatgc 300
 ggtattagca tctgtttcca ggtgttatcc ccgcttctg gccaggtttc ccacgtgtta 360
 ctccacagtt cgcactcac tcaaatgtaa atcatgatgc aagcaccat caataccaya 420
 gttcgttcga ctgtcatgta ttaggcacgc cgcagcgtt cgtctgag 469

<210> 9

<211> 493

<212> ADN

<213> Enterococcus faecalis CECT 7411

Lista de secuencias modificada

48

<400> 9
 ctatcaatgca agtcgaacgc ttctttctctc ccgagtgcctt gcactcaatt ggaaagagga 60
 gtggcgggacg ggtgagtaac acgtgggttaa cctaccctac agagggggat aacactctga 120
 aacagggtgct aalaccgcct aacagtttat gccgcctggc ataagagtga aaggcgcttt 180
 cgggtgtctgc tcatggatgg acccgcggtg cattagctag ttggtgaggt aacggctcac 240
 caaggccacg atgcatagcc gacctgagag ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg 300
 gccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcgg caatggacga aagtctgacc 360
 gagcaacgcc gcgtgagtga agaagggtttt cggatcgtaa aactctgttg ttagagaaqa 420
 acaaggacgt tagtaactga acgtccctg acggtatcta accagaaagc caccgctaac 480
 tacgtgccca gca 493

<210> 10
 <211> 524
 <212> ADH
 <213> Lactobacillus salivarius CECT 7409

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n is a, c, g, or t

Lista de secuencias modificada

351
49

<220>
<221> misc_feature
<222> (113)..(113)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (297)..(297)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (345)..(345)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (503)..(503)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 10
gggtggggng ancagaacat gaaatgaaca gtttacatct caccctcgctg nttcttctctc 60
taacaacaga gcttttlaaga ctccgaagga ccttcttctac atcacggggc gtnlgtctca 120
tcagacttgc gtccattgtg gaagattccc tactgtctgc tcccgtagga gtttggggccg 180
tgtctcagtc ccaatgtggc cgatcaacct ctccagattcg gctacgtatc atcaaccttgg 240
taggcggtta cccaccaaac tagttaatac gccgcggggtc catctaaaag cyatagnaga 300
accatctttc atctlaaggat catgcgatcc ttagagatat acggnattag caccctgttct 360
caagtgttat ccccttcttt taggcaggtt acccacgtgt tactcaccgg tccgcacactc 420
aacttctttac ggtgaatgca agcattcgggt gtaagaaagt ttcgttcgac ttgcattgtat 480
taggcacgcc gccagcgltc gtnatgagcc aggatcaaac tota 524

<210> 11

Lista de secuencias modificada

352

<211> 524
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus reuteri CECT 7413

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (507)..(507)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (515)..(515)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 11
 gcntgggngn acggtcactg cygaacagtt actctcacgc acgttcttct ccaacaacag 60
 agctttacga gccgaaaccc ttcttcactc acgcggtggt gctccalcag gcttgcyccc 120
 attgtggaag attccctact gctgcctccc gtaggagtat ggaacgtgtc tcagttccal 180
 tgtggccgat cagtctctca actcggtat gcatcatcgc cttggtaagc cgttacotta 240
 ccaactagcl aatgcaccgc agytccatcc cagagtgata gccaaagcca tctttcaaac 300
 aaaagccatg tggcttttgt tgttatgcgg tattagcacc tgtttccaaa tgttatcccc 360
 cgtccgggg caggtlacct acgtgttact cacccgtecg ccactcactg gtgatccalc 420
 gtcaatcagc tgcaagcacc atcaatcagt tgggccagtg cgtacgactt gcatgtatta 480

Lista de secuencias modificada

ggcacaacggc cggcggttcac cctgagncag gatchaaaact ctaa

524

Lista de secuencias modificada

ASSIGNMENT

CESION

MARTÍN JIMÉNEZ, Rocío
OLIVARES MARTÍN, Mónica
JIMÉNEZ QUINTANA, Esther Antonia
MARÍN MARTÍNEZ, María Luisa
SIERRA ÁVILA, Saleta
MALDONADO BARRAGÁN, Antonio
MARTÍN MERINO, Virginia
BLANCH MARTELL, Francesc
TORRE LLOVERAS, Celina
LARA VILLOSLADA, Federico
ARROYO RODRÍGUEZ, Rebeca
BOZA PUERTA, Julio
JIMÉNEZ LÓPEZ, Jesús
FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, Leónides
SOBRINO ABUJA, Odón Julián
XAUS PEI, Jordi
RODRÍGUEZ GÓMEZ, Juan Miguel
DELGADO PALACIO, Susana

by means of this document and in consideration
of the payment by the Assignee to the Assignor
of a good and valuable consideration, assign(s)
to

por medio de la presente y a cambio del pago de
una contraprestación económica, cedo (cedemos)
a **PULEVA BIOTECH, S.A.**

organized under the laws of

organizada bajo las leyes de **ESPAÑA**

Domiciled in

domiciliada en
Camino de Purchil, 66
E-18004 – GRANADA
SPAIN

(hereinafter referred to as the “ASSIGNEE”),
and be it

(de ahora en adelante el “CESIONARIO”).

355
B

OLARTE RAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

all my (our) rights, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful improvement entitled and as fully set forth and described in:

todos mis (nuestros) derechos, título e interés sobre mi (nuestra) invención tal como describe en:

MICROORGANISMOS DE LA LECHE DE MAMÍFEROS, COMPOSICIONES QUE LOS CONTIENEN Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE LA MASTITIS

So far as the Republic of Colombia is concerned.

en lo que concierne a la República de Colombia.

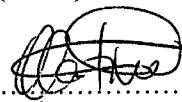
Place, date

Lugar, fecha

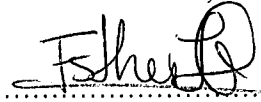
Assignor(s) (Signature)

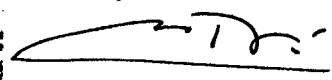
Cedente(s) (Firma)

Assignee(s) (Signature)

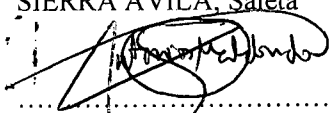

MARTÍN JIMÉNEZ, Rocío

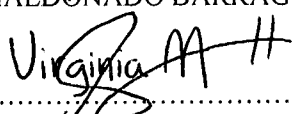
OLIVARES MARTÍN, Mónica


JIMÉNEZ QUINTANA, Esther Antonia


MARÍN MARTÍNEZ, María Luisa

SIERRA ÁVILA, Saleta


MALDONADO BARRAGÁN, Antonio


MARTÍN MERINO, Virginia

LEGITIMACION

YO, RICARDO FERRER GIMENEZ, Notario del Ilustre Colegio de esta Capital, con residencia en la misma.

DOY FE: De que las firmas y rúbricas que antecede de DOÑA MARIA DEL ROCIO MARTIN JIMENEZ con D.N.I número, 31870524-E, DOÑA ESTHER ANTONIA JIMENEZ QUINTANA con D.N.I número, 44193629-A, DOÑA MARIA MARIN MARTINEZ con D.N.I número, 05264058-W, DON ANTONIO MALDONADO BARRAGAN con D.N.I número, 34057845-C, y DOÑA VIRGINIA MARTIN MERINO con D.N.I número, 70980357-B, las considero legítimas por cotejo con otras firmas originales legitimadas.

En Madrid, a 22 de Junio de 2010.



Apostille (o legalización única)
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)
(Real Decreto 2433/1978, de 2 de octubre)

1. Pais: *España*
El presente documento público
2. Ha sido firmado por *D. Ricardo Ferrer Gimenez*
3. Actuando en calidad de *NOTARIO*
4. Se halla sellado/timbrado con el de su Notaría
5. En Madrid
6. El *22 JUN. 2010*
7. Por el Decano del Colegio Notarial de Madrid
8. Con el número *34786*
9. Sello/timbre:
10. Firma:



Don José Manuel García Collantes
Miembro de la Junta Directiva en funciones de Decano

54 356

all my (our) rights, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful improvement entitled and as fully set forth and described in:

todos mis (nuestros) derechos, título e interés sobre mi (nuestra) invención tal como describe en:

MICROORGANISMOS DE LA LECHE DE MAMÍFEROS, COMPOSICIONES QUE LOS CONTIENEN Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE LA MASTITIS

So far as the Republic of Colombia is concerned.

en lo que concierne a la República de Colombia.

Barcelona, 6/4/10
Place, date

Lugar, fecha

Assignor(s) (Signature)

Cedente(s) (Firma)

Assignee(s) (Signature)

.....
MARTÍN JIMÉNEZ, Rocío

.....
OLIVARES MARTÍN, Mónica

.....
JIMÉNEZ QUINTANA, Esther Antonia

.....
MARÍN MARTÍNEZ, María Luisa

.....
SIERRA ÁVILA, Saleta

.....
MALDONADO BARRAGÁN, Antonio

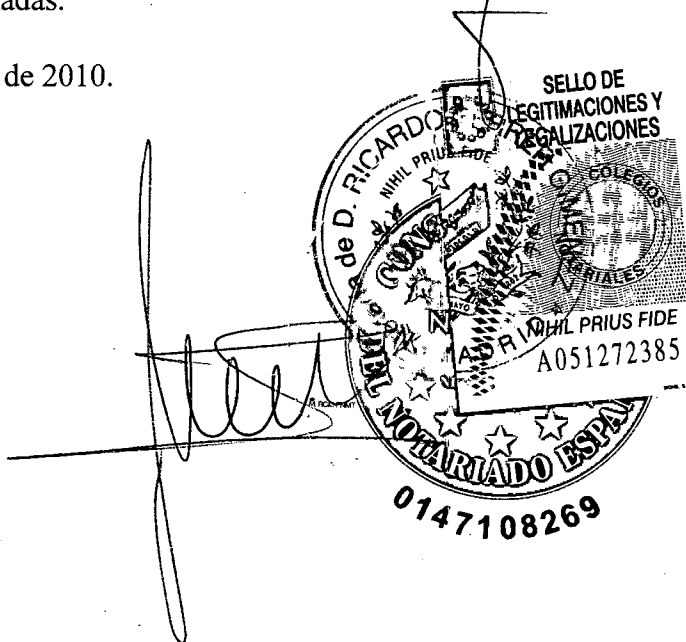
.....
MARTÍN MERINO, Virginia

LEGITIMACION

YO, RICARDO FERRER GIMENEZ, Notario del Ilustre Colegio de esta Capital, con residencia en la misma.

DOY FE: De que las firmas y rúbricas que antecede de DOÑA MONICA MARIA OLIVARES MARTIN con D.N.I número, 24248548-Q, y DOÑA MARIA SALETA SIERRA AVILA con D.N.I número, 44264101-A, las considero legítimas por cotejo con otras firmas originales legitimadas.

En Madrid, a 22 de Junio de 2010.



Apostille (o legalización única)
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)
(Real Decreto 2433/1978, de 2 de octubre)

1. Pais: *España*
El presente documento público
2. Ha sido firmado por *D. Ricardo Ferrer Gimenez*
3. Actuando en calidad de *NOTARIO*
4. Se halla sellado/timbrado con el de su Notaría
CERTIFICADO
5. En Madrid 6. El *22 JUN. 2010*
7. Por el Decano del Colegio Notarial de Madrid
8. Con el número *34785*
9. Sello/timbre: 10. Firma:

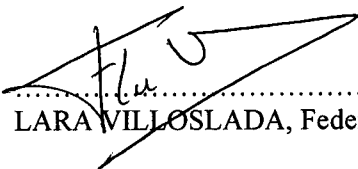
J. M. Collantes

Don José Manuel García Collantes
Miembro de la Junta Directiva en funciones de Decano



.....
BLANCH MARTELL, Francesc

.....
TORRE LLOVERAS, Celina

.....

LARA VILLOSLADA, Federico

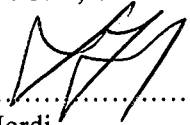
.....
ARROYO RODRÍGUEZ, Rebeca

.....
BOZA PUERTA, Julio

.....
JIMÉNEZ LÓPEZ, Jesús

.....
FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, Leónides

.....
SOBRINO ABUJA, Odón Julián

.....

XAUS PEI, Jordi

.....
RODRÍGUEZ GÓMEZ, Juan Miguel

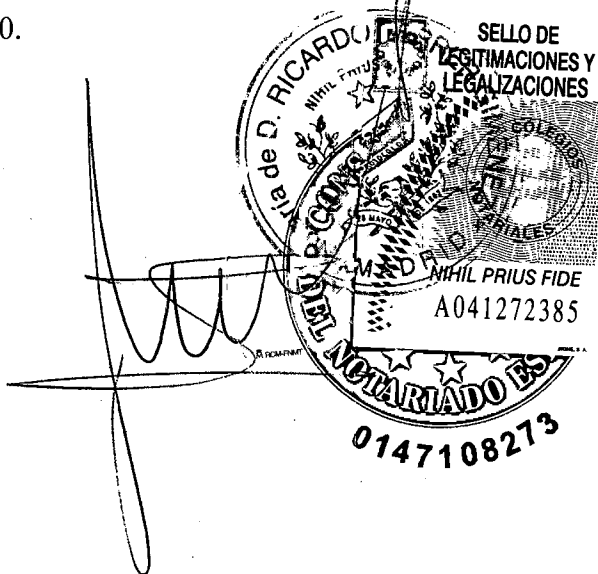
.....
DELGADO PALACIO, Susana

LEGITIMACION

YO, RICARDO FERRER GIMENEZ, Notario del Ilustre Colegio de esta Capital, con residencia en la misma.

DOY FE: De que las firmas y rúbricas que antecede de DON FEDERICO LARA VILLOSLADA con D.N.I número, 77470865-B, y DON JORDI XAUS PEY con D.N.I número, 46669408-Q, las considero legítimas por cotejo con otras firmas originales legitimadas.

En Madrid, a 22 de Junio de 2010.



Apostille (a legalización única)
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)
(Real Decreto 2433/1978, de 2 de octubre)

1. Pais: *España*
El presente documento público
2. Ha sido firmado por *D. Ricardo Ferrer Gimenez*
3. Actuando en calidad de *NOTARIO*
4. Se halla sellado/timbrado con el de su Notaría
CERTIFICADO *22 JUN. 2010*
5. En Madrid 6. El *22 JUN. 2010*

Por el Decano del Colegio Notarial de Madrid
Con el número *34784*
Sello/timbre: 10. Firma: *José Manuel García Collantes*

Don José Manuel García Collantes
Miembro de la Junta Directiva en funciones de Decano

358

.....
BLANCH MARTELL, Francesc

.....
TORRE LLOVERAS, Celina

.....
LARA VILLOSLADA, Federico

.....
ARROYO RODRÍGUEZ, Rebeca

Rebeca Arroyo

.....
BOZA PUERTA, Julio

.....
JIMÉNEZ LÓPEZ, Jesús

Jiménez López

.....
FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, Leónides

.....
SOBRINO ABUJA, Odón Julián

.....
XAUS PEI, Jordi

.....
RODRÍGUEZ GÓMEZ, Juan Miguel

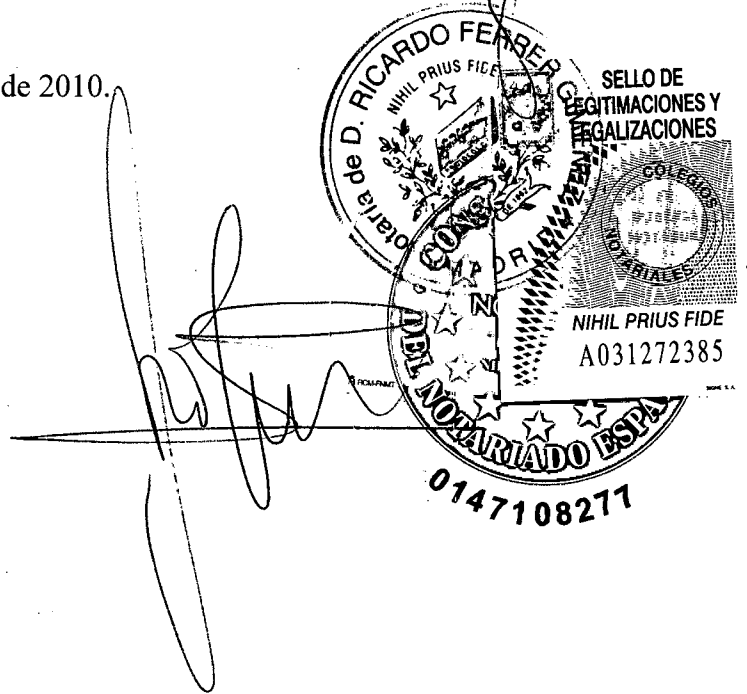
.....
DELGADO PALACIO, Susana

LEGITIMACION

YO, RICARDO FERRER GIMENEZ, Notario del Ilustre Colegio de esta Capital, con residencia en la misma.

DOY FE: De que las firmas y rúbricas que antecede de DOÑA REBECA ARROYO RODRIGUEZ con D.N.I número, 53436199-T, DOÑA MARIA LEONIDES FERNANDEZ ALVAREZ con D.N.I número, 50050109-Q, DON ODON JULIAN SOBRINO ABUJA con D.N.I número, 50812657-E, DON JUAN MIGUEL RODRIGUEZ GOMEZ con D.N.I número, 39859239-D y DOÑA SUSANA DELGADO PALACIO con D.N.I número, 09436506-C, las considero legítimas por cotejo con otras firmas originales legitimadas.

En Madrid, a 22 de Junio de 2010.



Apostille (o legalización única)
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)
(Real Decreto 2433/1978, de 2 de octubre)

1. Pais: *España*
El presente documento público
2. Ha sido firmado por *D. Ricardo Ferrer Gimenez*
3. Actuando en calidad de *NOTARIO*
4. Se halla sellado/timbrado con el de su Notaría
5. En Madrid
6. El *22 JUN. 2010*

Por el Decano del Colegio Notarial de Madrid

8. Con el número *34783*

Sello/timbre: 10. Firma:

J. M. Collantes



Don José Manuel García Collantes
Miembro de la Junta Directiva en funciones de Decano

37 319

.....
BLANCH MARTELL, Francesc

.....
TORRE LLOVERAS, Celina

.....
LARA VILLOSLADA, Federico

.....
ARROYO RODRÍGUEZ, Rebeca

.....
BOZA PUERTA, Julio

.....
JIMÉNEZ LÓPEZ, Jesús

.....
FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, Leónides

.....
SOBRINO ABUJA, Odón Julián

.....
XAUS PEI, Jordi

.....
RODRÍGUEZ GÓMEZ, Juan Miguel

.....
DELGADO PALACIO, Susana

LEGITIMACION

YO, RICARDO FERRER GIMENEZ, Notario del Ilustre Colegio de esta Capital, con residencia en la misma.

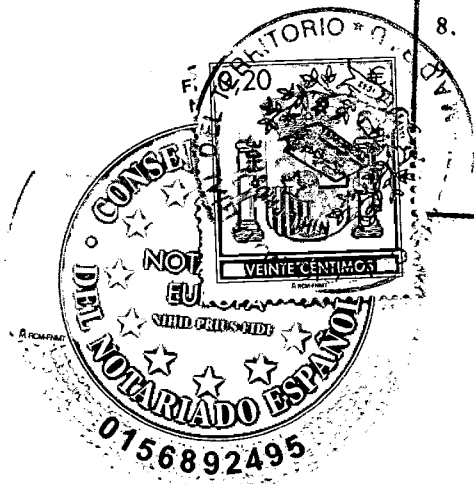
DOY FE: De que la firma y rúbrica que antecede, DON JULIO JOSE BOZA PUERTA con Pasaporte Español número, AD935725, la considero legítima por cotejo con otra firma original legitimada.

En Madrid a 22 de Junio de 2010



Apostille (o. legalización única)
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)
(Real Decreto 2433/1978, de 2 de octubre)

1. País: España
El presente documento público
2. Ha sido firmado por D. Ricardo Ferrer Gimenez
3. Actuando en calidad de NOTARIO
4. Se halla sellado/timbrado con el de su Notaría
5. En Madrid
6. El 22 JUN. 2010
7. Por el Decano del Colegio Notarial de Madrid
8. Con el número 34782
- Sello/timbre:
10. Firma: J. M. Collantes



Don José Manuel García Collantes
Miembro de la Junta Directiva en funciones de Decano

360

OLARTE RAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

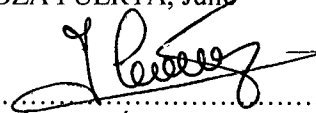
.....
BLANCH MARTELL, Francesc

.....
TORRE LLOVERAS, Celina

.....
LARA VILLOSLADA, Federico

.....
ARROYO RODRÍGUEZ, Rebeca

.....
BOZA PUERTA, Julio

.....

JIMÉNEZ LÓPEZ, Jesús

.....
FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, Leónides

.....
SOBRINO ABUJA, Odón Julián

.....
XAUS PEI, Jordi

.....
RODRÍGUEZ GÓMEZ, Juan Miguel

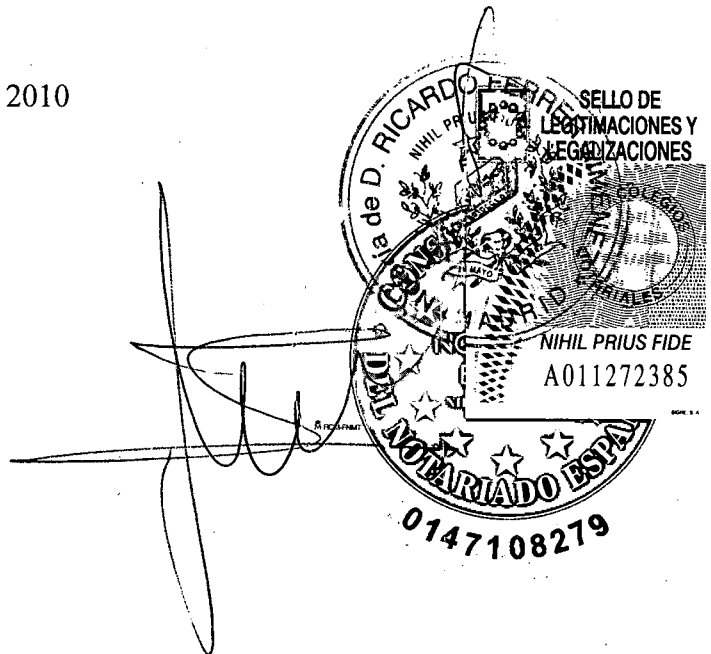
.....
DELGADO PALACIO, Susana

LEGITIMACION

YO, RICARDO FERRER GIMENEZ, Notario del Ilustre Colegio de esta Capital, con residencia en la misma.

DOY FE: De que la firma y rúbrica que antecede, DON JESUS JIMENEZ LOPEZ con D.N.I número, 74626175-F, la considero legítima por cotejo con otra firma original legitimada.

En Madrid a 22 de Junio de 2010

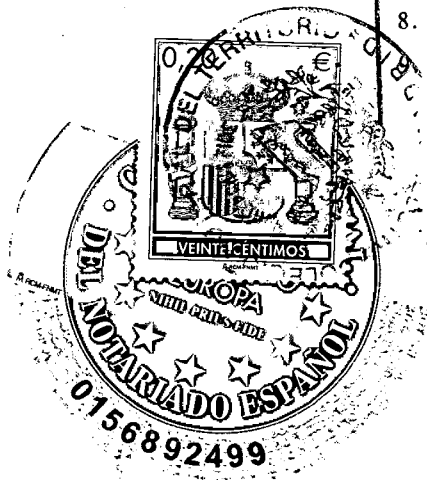


Apostille (o legalización  nica)
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)
(Real Decreto 2433/1978, de 2 de octubre)

1. Pais: *Esp  a*
El presente documento público
2. Ha sido firmado por *D. Ricardo Ferrer Gimenez*
3. Actuando en calidad de *NOTARIO*
4. Se halla sellado/timbrado con el de su Notaría
5. En Madrid
6. El *22 JUN. 2010*
7. Por el Decano del Colegio Notarial de Madrid
8. Con el número *34781*
9. Sello/timbre:
10. Firma:

J. M. Collantes

Don José Manuel García Collantes
Miembro de la Junta Directiva en funciones de Decano



AP 17967

361

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

ASSIGNMENT

CESION

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro
Alexander Agudelo
Lina Mosquera
Catalina Barbasrefano
Angela Correa
Erika Rico
Carlos A. Parra
Carolina Romero
Andrés Alvarado
Gina Arias
Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo
Jacqueline Chaparro
Cruz B. de Moncaleano

MARTÍN JIMÉNEZ, Rocío
OLIVARES MARTÍN, Mónica
JIMÉNEZ QUINTANA, Esther Antonia
MARÍN MARTÍNEZ, María Luisa
SIERRA ÁVILA, Saleta
MALDONADO BARRAGÁN, Antonio
MARTÍN MERINO, Virginia
BLANCH MARTELL, Francesc
TORRE LLOVERAS, Celina
LARA VILLOSLADA, Federico
ARROYO RODRÍGUEZ, Rebeca
BOZA PUERTA, Julio
JIMÉNEZ LÓPEZ, Jesús
FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, Leónides
SOBRINO ABUJA, Odón Julián
XAUS PEI, Jordi
RODRÍGUEZ GÓMEZ, Juan Miguel
DELGADO PALACIO, Susana

by means of this document and in consideration
of the payment of — \$1 — by the
Assignee to the Assignor and of a good and
valuable consideration, assign(s) to

por medio de la presente y a cambio del pago de
una contraprestación económica de
— \$1 —, cedo (cedemos) a
PULEVA BIOTECH, S.A.

organized under the laws of

organizada bajo las leyes de **ESPAÑA**

Domiciled in

domiciliada en
**Camino de Purchil, 66
E-18004 – GRANADA
SPAIN**

(hereinafter referred to as the “ASSIGNEE”),
and be it

(de ahora en adelante el “CESIONARIO”),

OLARTE RAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

all my (our) rights, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful improvement entitled and as fully set forth and described in:

todos mis (nuestros) derechos, título e interés sobre mi (nuestra) invención tal como describe en:

MICROORGANISMOS DE LA LECHE DE MAMÍFEROS, COMPOSICIONES QUE LOS CONTIENEN Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE LA MASTITIS

So far as the Republic of Colombia is concerned.

en lo que concierne a la República de Colombia.

Place, date

Sant Agustín del Valle, 12 -5-2010
Lugar, fecha

Assignor(s) (Signature)

Cedente(s) (Firma)

Assignee(s) (Signature)

.....
MARTÍN JIMÉNEZ, Rocío

.....
OLIVARES MARTÍN, Mónica

.....
JIMÉNEZ QUINTANA, Esther Antonia

.....
MARÍN MARTÍNEZ, María Luisa

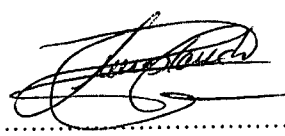
.....
SIERRA ÁVILA, Saleta

.....
MALDONADO BARRAGÁN, Antonio

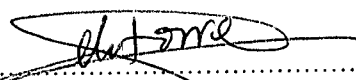
.....
MARTÍN MERINO, Virginia

60362

OLARTE RAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.



.....
BLANCH MARTELL, Francesc



.....
TORRE LLOVERAS, Celina

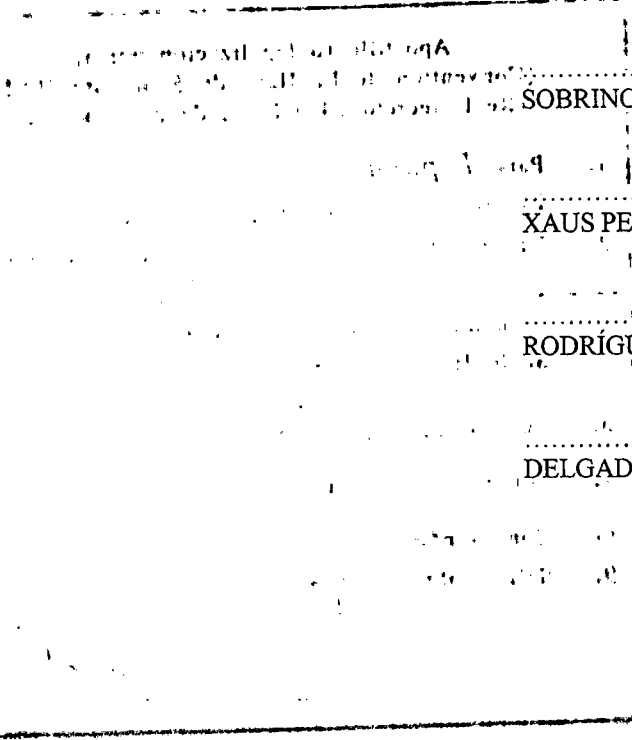
.....
LARA VILLOSLADA, Federico

.....
ARROYO RODRÍGUEZ, Rebeca

.....
BOZA PUERTA, Julio

.....
JIMÉNEZ LÓPEZ, Jesús

.....
FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, Leónides



.....
SOBRINO ABUJA, Odón Julián

.....
XAUS PEI, Jordi

.....
RODRÍGUEZ GÓMEZ, Juan Miguel

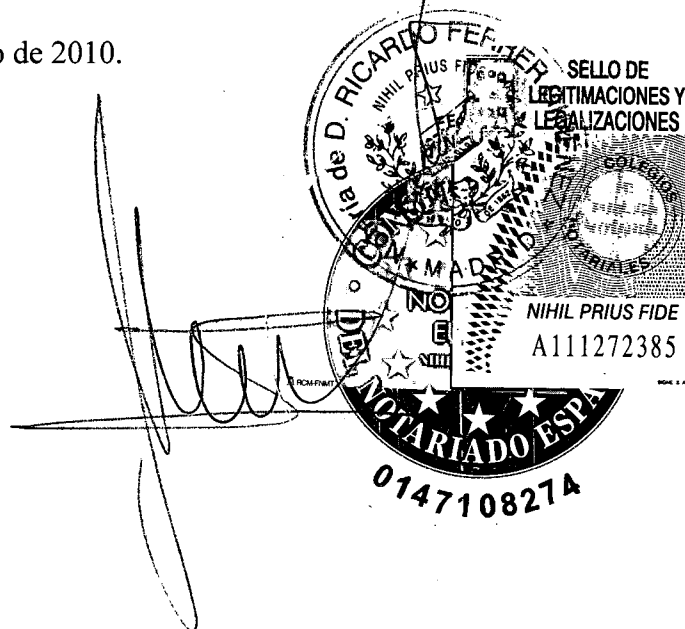
.....
DELGADO PALACIO, Susana

LEGITIMACION

YO, RICARDO FERRER GIMENEZ, Notario del Ilustre Colegio de esta Capital, con residencia en la misma.

DOY FE: De que las firmas y rúbricas que antecede de DOÑA FRANCISCA CELINA TORRE LLOVERAS con D.N.I número, 46221166-K y DON FRANCESC BLANCH MARTELL con D.N.I número, 39126763-Z, las considero legítimas por cotejo con otras firmas originales legitimadas.

En Madrid, a 22 de Junio de 2010.



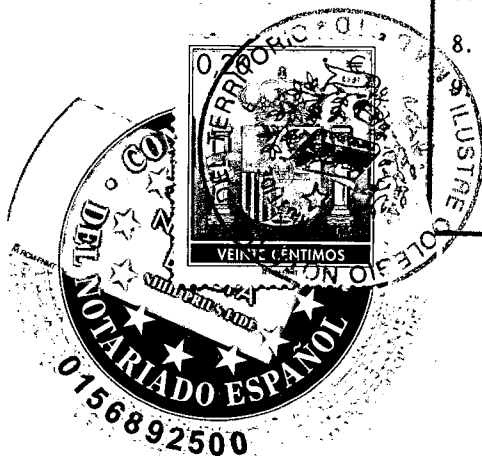
Apostille (o legalización única)
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)
(Real Decreto 2433/1978, de 2 de octubre)

1. Pais: *España*
El presente documento público
2. Ha sido firmado por *D. Ricardo Ferrer Gimenez*
3. Actuando en calidad de *NOTARIO*
4. Se halla sellado/timbrado con el de su Notaría
5. En Madrid
6. El *22 JUN. 2010*
7. Por el Decano del Colegio Notarial de Madrid
8. Con el número *34788*

Sello/timbre:

10. Firma:

J. M. Collantes



Don José Manuel García Collantes
Miembro de la Junta Directiva en funciones de Decano

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PULEVA BIOTECH S.A.

REFERENCIA	Radicación No.	09 149368
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/056768
	Fecha inicio fase nacional	31/12/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	12135
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,



JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

02 MAR. 2011

mcarri