

84

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARI



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA
PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

09-149368

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

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

SOLICITANTE: PULEVA BIOTECH, S.A.

DIRECCIÓN: Camino de Purchil, 66, E-18004 Granada

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 24 de Diciembre de 2009

P2009/000203

Edm, Rod, Cam, No Encl...
21-12-2009

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOUF

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-149368- -00000-0000

Fecha: 2009-12-30 17:41:57 Dep. 2020 DIR.NULVASCH
Ira 11 PATENTILYII Eve: 379 FASLNACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 192


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2009/000203

SOLICITUD DE:

①



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: PULEVA BIOTECH, S.A.

Dirección: Camino de PURCHIL, 66, E-18004

Nacionalidad o Domicilio: Española

Lugar de Constitución: España

Teléfono: _____ **Fax:** _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747 Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Ver Página Adjunta

Dirección: Ver Página Adjunta

Nacionalidad o Domicilio: Ver Página Adjunta

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/056768

Fecha

Junio 02, 2008

Publicación Internacional No. WO 2008/145756

Fecha

Diciembre 04, 2008

6

Título (54) MICROORGANISMOS DE LA LECHE DE MAMÍFEROS,
COMPOSICIONES QUE LOS CONTIENEN Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE LA
MASTITIS

Clasificación Internacional (51) A61K 35/74, A23C 9/12, C12Q 1/24, A23L
1/03, C12R 1/225, C12R 1/25

Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

Mayo 31, 2007

(31) Número de Solicitud

07380158.1

9

Comprobante de pago No. 09-96,089

Fecha

Diciembre 21 de 2009

10

ANEXOS

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No.



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

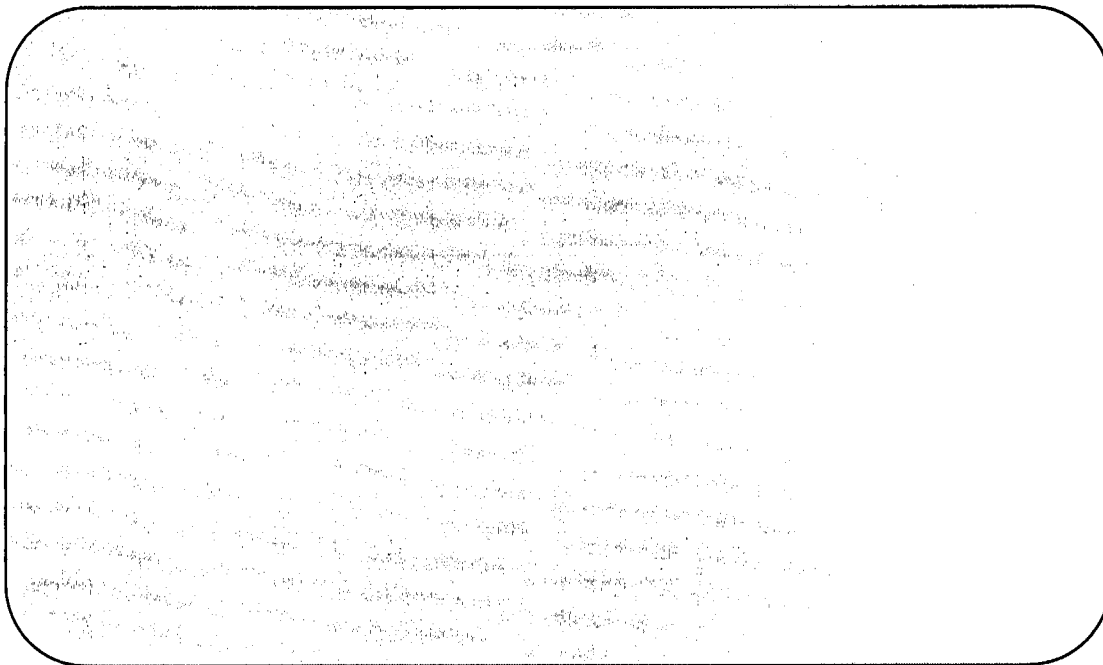


De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



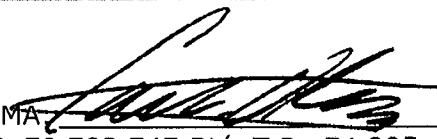
Otros. Búsqueda Internacional.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTEFIRMA: C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

3

PCT/EP2008/056768

1. Rocío **MARTÍN JIMENEZ** ,
Gregorio Marañon, 8-7°C
E-11202 Aigeciras-Cádiz
España
Nacionalidad: Española
2. Mónica **OLIVARES MARÍN**,
Avda.Almendros, 162
E-18198 Huetor Vega-Granada
España
Nacionalidad: Española
3. Esther Antonia **JIMENEZ QUINTANA**,
Travesía de la Cerca, 2, portal nº1-2°C,
Los Molinos - Madrid
España
Nacionalidad: Española
4. María Luisa **MARÍN MARTÍNEZ**,
Pasaje Hoyo de Manzanares, 6-1º izqda
E-28002 Madrid
España
Nacionalidad: Española
5. Saleta **SIERRA ÁVILA**,
Pintor Zuloaga, 14-5ºB,
E-18005
España
Nacionalidad: Española
6. Antonio **MALDONADO BARRAGÁN**,
La Laguna 45,
E-41100 Coria del río - Sevilla
España
Nacionalidad: Española
7. Virginia **MARTÍN MERINO**
Peñascales, 2-1ºE
E-28028
España
Nacionalidad: Española

8. Francesc **BLANCH MARTELL** ✓
Canet, 37 baixos, 4ª
E-08017 Barcelona
España
Nacionalidad: Española
9. Celina **TORRES LLOVERAS**, ✓
Ávila, 42,
E-08195 Sant Cugat Del Vallés-Barcelona
España
Nacionalidad: Española
10. Federico **LARA VILLOSLADA**, ✓
Ciruelos 18,
E18220 Albolote-Granada
España
Nacionalidad: Española
11. Rebeca **ARROYO RODRIGUEZ**, ✓
Canillas 4-2º 4,
E-28850 Torrejón de Ardoz Madrid
España
Nacionalidad: Española
12. Julio **BOZA PUERTA**, ✓
Sala Dos Hermanas, 81,
E-18008 Granada
España
Nacionalidad: Española
13. Jesús **JIMENEZ LÓPEZ**, ✓
Santa Isabel, 36,,
E- 18110 Granada
España
Nacionalidad: Española
14. Leónides **FERNÁNDEZ ALVAREZ**, ✓
Monasterio De Poyo, 24 – 2ºA
E-28049 Madrid
España
Nacionalidad: Española
15. Odón Julián **SOBRINO ABUJA**, ✓
Avda. Europa, 30 portal 6 izqda, bajo C,
E-28224 Pozuelo De Alarcón-Madrid
España
Nacionalidad: Española

S

16. Jordi **XAUS PEI**,
Avda. Cervantes, 16 – Edif. Ciudad Real 7ºG Izqda,
E-18008 Granada
España
Nacionalidad: Española

17. Juan Miguel **RODRÍGUEZ GÓMEZ**,
Hierbabuena, 16 – 6,
E-28770 Colmenar Viejo - Madrid
España
Nacionalidad: Española

18. Susana **DELGADO PALACIO**,
Padre Suárez, 29, sótano posterior dcha,
E- 33009 Oviedo - Asturias
España
Nacionalidad: Española

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

6

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 96.089
FECHA : DICIEMBRE 21 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-149368- -00000-0000

Fecha: 2009-12-30 17:41:57 Dep: 2020 DIR NUL VASOR
Ha: 11 PATENTILYII Lve: 379 PASLACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: 192

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	131167805	21/12/2009	5,133,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SOM: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 December 2008 (04.12.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/145756 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 35/74 (2006.01) A23L 1/03 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01) C12R 1/225 (2006.01)
C12Q 1/24 (2006.01) C12R 1/25 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2008/056768

(22) International Filing Date: 2 June 2008 (02.06.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

07380158.1 31 May 2007 (31.05.2007) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): **PULEVA BIOTECH, S.A.** [ES/ES]; Camino de Purchil, 66, E-18004 Granada (ES).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **MARTÍN JIMÉNEZ, Rocío** [ES/ES]; Gregorio Marañón, 8 - 7°C, E-11202 Algeciras - Cádiz (ES). **OLIVARES MARTÍN, Mónica** [ES/ES]; Avda. Almendros, 162, E-18198 Huétor Vega - Granada (ES). **JIMÉNEZ QUINTANA, Esther Antonia** [ES/ES]; Travesía de la Cerca, 2, portal nº1 - 2°C, E-28460 Los Molinos - Madrid (ES). **MARÍN MARTÍNEZ, María Luisa** [ES/ES]; Pasaje Hoyo de Manzanares, 6 - 1º izqda, E-28002 Madrid (ES). **SIERRA ÁVILA, Saleta** [ES/ES]; Pintor Zuloaga, 14 - 5ºB, E-18005 Granada (ES). **MALDONADO BARRAGÁN, Antonio** [ES/ES]; La Laguna, 45, E-41100 Coria Del Río - Sevilla (ES). **MARTÍN MERINO, Virginia** [ES/ES]; Peñascales, 2 - 1ºE, E-28028 Madrid (ES). **BLANCH MARTELL, Francesc** [ES/ES]; Canet, 37, baixos, 4ª, E-08017 Barcelona (ES). **TORRE LLOVERAS, Celina** [ES/ES]; Ávila, 42, E-08195 Sant Cugat Del Vallés - Barcelona (ES). **LARA VILLOSLADA, Federico** [ES/ES]; Ciruelos, 18, E-18220 Albolote - Granada (ES). **ARROYO RODRÍGUEZ, Rebeca** [ES/ES]; Canillas, 4 - 2º 4, E-28850 Torrejón De Ardoz - Madrid (ES). **BOZA PUERTA, Julio** [ES/ES]; Sala Dos Hermanas, 81, E-18008 Granada (ES). **JIMÉNEZ LÓPEZ, Jesús**

[ES/ES]; Santa Isabel, 36, E-18110 Granada (ES). **FER-NÁNDEZ ÁLVAREZ, Leónides** [ES/ES]; Monasterio de Poyo, 24 - 2ºA, E-28049 Madrid (ES). **SOBRINO ABUJA, Odón Julián** [ES/ES]; Avda. Europa, 30 - portal 6 izqda, bajo C, E-28224 Pozuelo De Alarcón - Madrid (ES). **XAUS PEI, Jordi** [ES/ES]; Avda. Cervantes, 16 - Edif. Ciudad Real 7ºG Izqda., E-18008 Granada (ES). **RODRÍGUEZ GÓMEZ, Juan Miguel** [ES/ES]; Hierbabuena, 16 - 6, E-28770 Colmenar Viejo - Madrid (ES). **DELGADO PALACIO, Susana** [ES/ES]; Padre Suárez, 29; sótano, posterior dcha., E-33009 Oviedo - Asturias (ES).

(74) Agent: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L., Avenida de Burgos, 16D, Edificio Euromor, E-28036 Madrid (ES).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(54) Title: MAMMALIAN MILK MICROORGANISMS, COMPOSITIONS CONTAINING THEM AND THEIR USE FOR THE TREATMENT OF MASTITIS

(57) Abstract: The present invention relates to a novel approach to prevent or treat mastitis both in humans and animals through the use of mammal milk-derived microorganisms obtained from healthy hosts of the homologous species; to those new probiotic microorganisms obtained from milk able to reduce infectious mastitis and the method of screening used for their obtaining; to the use of these probiotic bacteria for the prophylaxis or treatment against mastitis and other diseases; and finally, to compositions comprising these compounds.

WO 2008/145756 A1

MAMMALIAN MILK MICROORGANISMS, COMPOSITIONS CONTAINING THEM AND THEIR USE FOR THE TREATMENT OF MASTITIS

5 FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a novel approach to prevent or treat mastitis both in humans and animals through the use of mammalian milk-derived microorganisms obtained from healthy hosts of the homologous species; to those new probiotic
10 microorganisms obtained from milk able to reduce infectious mastitis; to the use of these probiotic bacteria for the prophylaxis or treatment against mastitis and other diseases; and finally, to compositions comprising these compounds.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15

Mastitis is an inflammation and infection of the mammary gland that is particularly frequent in women and other mammal females during lactation. Mastitis is mainly caused by staphylococci and/or streptococci selection and overgrowth in the mammary ducts and mammary areola glands. Human mastitis affects up to 30% of lactating
20 women and often leads to a precocious and undesired weaning because it is a really painful condition.

Moreover, mastitis is not human-specific pathology but affects to all mammalian species. In this sense, infectious mastitis in animal species and breeds reared for milk
25 production, such as cows, ewes or goats, is an important economic problem since milk produced during the infective process must be discarded due to the high bacterial and somatic cells counts. In addition, mastitis can be an important problem in those domestic species (pigs, rabbits...) and breeds (e.g., meat-producing bovine) not dedicated to milk production since a reduced milk supply of low bacteriological quality
30 may notably increase the morbidity and mortality rates among the offspring.

In these cases, antibiotic-based therapy has emerged as the unique therapeutical option. However, current wide-spectrum or Gram positive-targeted antibiotics are poorly

9

effective for the staphylococcal and streptococcal strains causing mastitis and, in fact, such treatments can be in some circumstances, detrimental because they usually eliminate the commensal flora that characterise mammal milk, which could exert some protective effects. Moreover, antibiotic therapy may result in the appearance of
5 antibiotic residues in the milk, which is also detrimental if occurring during the lactating period. Alternatively, recombinant bovine GM-CSF has also been used for the treatment of subclinical mastitis caused by *S.aureus* (Takahashi,H. et al. 2004, Cad.J.Vet.Res. 68:182-187) but did not prove efficient in the treatment of late-stage *S.aureus* infection.

10 An alternative approach for the treatment of mastitis is the use of probiotics. For instance, Sytnik,S.I. et al. (Vrach Delo., 1990, 3:98-100) attempted to use Bifidobacterium for preventing mastitis but did not observe any inhibition in the residence time of the breast microflora. Greene,W.A. et al. (J.Dairy Sci., 1991, 74:2976-2981) described the use of a commercial lactobacillus preparation for the treatment of
15 elevated somatic cell count (SSC) when administered by direct intramammary injection but conclude that the Lactobacillus product used in the assay was not effective as an intramammary treatment of subclinical mastitis based on SCC. The US patent US4591499 describes a method for treating mastitis using an intramammary injection of an oil in water emulsion containing a non-pathogenic lactobacillus strain or a mixture of
20 strains. However, the strains described in this document appear to act by means of a non-specific decrease in the pH in the mammary gland and, due to their particular formulation as emulsions, need to be administered by direct intramammary injection. The Russian patent RU2134583 describes the use of topic composition containing lactobacterin (microbe mass of lactobacteria that have been live lyophilized/dried in
25 culture medium) or bifidumbacterin (a lyophilised biopreparation immobilized on special activated charcoal) for the treatment of massive microbe dissemination of breast milk. However, this preparation is only suitable for the topic administration and forms part of a multi-step treatment that includes relaxation massage and application of a suspension of organisms derived from the normal microflora of the intestine
30 additionally containing a protective film-forming medium. The international patent application WO05/34970 describes the treatment of mastitis by direct intramammary injection of a *Lactococcus lactis* strain.

Therefore, all the prior art described above relate to the use of probiotic strains by either intramammary injection or topical application. Thus, there is a desire in the art for additional approaches to allow the prevention and treatment of mastitis and other mammary gland pathologies, in women and in other mammal females, which can be more easily applied and by less invasive means.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is based on the unexpected and surprising finding that mammalian milk contains probiotic strains that are able to be transferred to the mammary gland after their oral intake, and exert a therapeutic effect locally against the pathogens that cause mastitis, thus helping to reduce the incidence of mastitis. Moreover, these strains have a number of additional unexpected advantageous properties which make them useful for the treatment of other diseases. The present invention is advantageous with respect to the methods known in the art in view of the valuable properties that lactation may provide, and due to the economic interest of milk productivity to farmers.

In a first aspect, the invention provides a process for the selection of probiotics comprising the steps of:

- (i) isolating lactic acid bacteria or bifidobacteria strains present in the fresh milk from a mammalian species by selection in lactic acid culture media,
- (ii) selecting those strains from step (i) that are capable of being transferred to the mammary gland after oral intake and/or colonise the mammary gland after its topic application,
- (iii) selecting those strains from step (ii) which are able to reduce the rates of survival and/or the rates of adhesion to epithelial cells of *Staphylococcus aureus* and
- (iv) selecting those strains from step (iii) that are capable of protecting animals from mastitis.

In another aspect, the invention provides probiotic strains obtainable by the process of the invention.

In another aspect, the invention provides a supernatant of a culture of a strain or of a mixture of strains according to the invention.

In a further aspect, the invention provides a composition, a pharmaceutical product, a feed or a nutritional product comprising at least a probiotic strain of the invention or a supernatant of a culture of one or more strains of the invention.

In another aspect, the invention provides the use of the probiotic strains of the invention or the culture supernatant for the manufacture of a medicament for the treatment and/or prophylaxis of a chronic or acute infection or infestation, or of an undesirable microbial colonization, wherein the infection, infestation or colonization is caused by parasites, bacteria, yeast, fungi or viruses, affecting any body surface or mucosa in a subject or animal in need thereof.

In a further aspect, the invention provides the use of a probiotic strain or of a mixture of probiotic strains of the invention or the culture supernatant for the manufacture of a medicament for the treatment and/or prophylaxis of hypersensitivity reactions to food and metabolic intolerance; of constipation and other gastro-intestinal disorders; of inflammatory or auto-immune disorders selected from the group of IBD, ulcerative colitis, arthritis, atherosclerosis, multiple sclerosis, psoriasis or sarcoidosis; and of tumour growth, metastasis and cancer in subject or animal in need thereof.

In a further aspect, the invention provides the use of a probiotic strain or of a mixture of probiotic strains or the culture supernatant of the invention for the manufacture of a medicament for the treatment and/or prophylaxis of allergic disorders and asthma in a subject or animal in need thereof.

In a further aspect, the invention provides the use of a probiotic strain or of a mixture of probiotic strains or the culture supernatant of the invention for the manufacture of a medicament for the treatment and/or prophylaxis of temporally depressed immune levels in individuals or animals subjected to physiological and management-derived stress.

(2)

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 provides the sequences of the 16S rRNA sequences of the probiotic strains bacteria included in this invention and their PCR-RAPD profile.

5

Figure 2 is a graph bar showing the transfer ability to the mammary gland of and the gut colonization by the strains of the present invention in mice. The number of lactobacilli (grey bars), bifidobacteria (black bars) and enterococcus (white bars) in expressed milk and fecal samples in lactating mice supplemented daily for 14 days with 10^8 cfu of the
10 genetically-labeled strains was analyzed by bacterial colony plating. Milk and fecal samples were collected at day 0, 5 and 10 of probiotic supplementation. PCR-positive colonies in milk are indicated as %.

Figure 3 is a graph bar showing the inhibition of the staphylococcal survival and
15 adhesion produced after co-culture of the staphylococci with the strains included in this invention. A) The inhibitory effect of the probiotics included in this invention on *Staphylococcus aureus* survival was assessed *in vitro* by an agar well diffusion assay in TSA plates. The diameter of the inhibition halo (in millimetres) caused by the bacterial supernatants determines the antimicrobial effect. B) The adhesion of the pathogenic
20 *Staphylococcus aureus* strain to Caco-2 cells was assessed in the presence of the probiotic strains of this invention. Ten randomized fields were counted and the results expressed as the mean of the % of adhered gram-negative bacteria attached to the cells compared to the number of pathogenic bacteria adhered in absence of probiotics.

25 Figure 4 is a graph bar showing the protection from staphylococcal mastitis. Mastitis was induced in lactating mice 10 days post-parturition by injection of 10^6 cfu of *S. aureus* in the fourth mammary pair. Staphylococcal load in the expressed milk (A) and the inflammatory mammary score (B) was evaluated after 5 and 10 days of infection.

30 Figure 5 is a graph bar showing the adhesion of probiotic strains to intestinal cells. The adhesion of the probiotic strains of this invention was assessed using Caco-2 (grey bars) or HT-29 (black bars) intestinal cell lines. Twenty randomized fields were counted and

3

the results expressed as the mean of the number of bacteria attached to the cells per field $\pm$ SD.

Figure 6 is a graph bar showing the survival of probiotic strains to digestion-resembling
5 conditions. The resistance of the probiotic strains of this invention to acidic (grey bars) and high bile salt content (black bars) was assessed *in vitro* by culture of the bacteria in MRS pH 3.0 or 0.15% bile salts for 90 minutes. The results are represented as the mean $\pm$ SD of three independent experiments.

10 Figure 7 shows the effect of the probiotic strains on a model of orally-induced *Salmonella* infection. A) Graph bar showing the effect of probiotic treatment in the inhibition of *Salmonella* translocation to the spleen. The number of *Salmonella* colonies was measured in the spleens of mice treated with the probiotics, with (grey bars) or without vaccination (black bars) with 10^8 cfu of inactivated *Salmonella*, after 24 hour of
15 an oral challenge with 10^{10} cfu *Salmonella*. B) Survival curves of the animals after *Salmonella* infection.

Figure 8 is a graph bar showing the effect of probiotic strains on cytokine and immunoglobulin G expression. The TNF- α (A) and IL-10 (B) cytokine production was
20 analyzed in bone marrow-derived macrophages stimulated with LPS and the indicated probiotic strain for 12 hours while IgG expression (C) was analyzed in lymphocytes obtained from the spleen of Balb/c mice (6-8 weeks old) stimulated with LPS and the indicated probiotic strain for 6 days. Both cytokine and IgG production were detected by ELISA.

25

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention provides a new method for the prophylactic and therapeutic treatment of infectious mastitis both in women and other mammal females in need thereof. The
30 method is based in the use of specific probiotic strains specially selected for that particular application.

14

In a first aspect, the invention provides a process for the selection of probiotics comprising the steps of:

- (i) isolating lactic acid bacteria or bifidobacteria strains present in the fresh milk from a mammalian species by selection in lactic acid culture media,
- 5 (ii) selecting those strains from step (i) that are capable of being transferred to the mammary gland after oral intake and/or colonise the mammary gland after its topic application,
- (iii) selecting those strains from step (ii) which are able to reduce the rates of survival and/or the rates of adhesion to epithelial cells of *Staphylococcus*
10 *aureus* and
- (iv) selecting those strains from step (iii) that are capable of protecting animals from mastitis.

In step (i), any milk obtained from a mammalian organism can be used as starting
15 material for the process of the invention. In a preferred embodiment, the milk used is human, bovine, porcine, sheep, cat or canine milk. Moreover, any lactic acid culture media known in the art can be used for selecting the strains. Preferably, the lactic acid culture media is selected from MRS medium, APT medium, RCM medium, LM17 medium, GM17 medium and Elliker medium. Most preferably, the lactic acid culture
20 media is MRS medium.

In step (ii), the strains isolated in step (i) are selected based on their ability to being transferred to the mammary gland after oral intake and/or colonise the mammary gland after topic application. For detecting the ability to being transferred to the mammary
25 gland, an assay such as described in WO2004003235 for detecting transfer of a microorganism to the milk after oral intake can be used.

In step (iii), any assay known in the art for measuring survival rates of *Staphylococcus* and for measuring adhesion rates of *S.aureus* to epithelial cells can be used. In a
30 preferred embodiment, the effect of the probiotics in the adhesion rates is measured using a confluent culture of an intestinal cell line to which the *S.aureus* cells and the probiotics of the invention are added and the number of attached *S.aureus* cells is measured by any suitable technique. Typically, the intestinal cell line is Caco-2 and the

15

number of attached cells is measured by direct inspection of the cell monolayers under light microscopy. Moreover, the selection step (iii) may also or alternatively involve measuring the viability of *S.aureus* in the presence of the probiotic strains. Any assay suitable for measuring growth inhibition of bacterial strains may be used.

5 Typically, the assessment of *S.aureus* viability is carried out by an agar well diffusion assay.

In step (iv), any assay to measure protection of mastitis can be used. Preferably, the assay involves using an animal model of mastitis wherein at least one of the pathogens
10 known to be the causative agent of mastitis is injected into the mammary gland. More preferably, the animal model is a mouse and the pathogen that needs to be administered to cause mastitis is *S.aureus*.

In another aspect, the invention provides a probiotic strain which is obtainable by the
15 process of the invention. Preferably, the probiotic strain is selected from the group of *Bifidobacterium breve* deposited in the CECT under Accession N° 7263, *Bifidobacterium breve* deposited in the CECT under Accession N° 7264, *Lactobacillus reuteri* deposited in the CECT under Accession N° 7260, *Lactobacillus plantarum* deposited in the CECT under Accession N° 7262, *Lactobacillus fermentum* in the CECT
20 under Accession N° 7265, *Lactobacillus reuteri* deposited in the CECT under Accession N° 7266, *Lactobacillus salivarius* CELA200, *Enterococcus hirae* EHG11, *Enterococcus faecalis* EFG1, *Lactobacillus plantarum* LG14, *Lactobacillus reuteri* PDA3.

In a further aspect, the invention provides a supernatant of a culture of one or more of
25 the strains according to the invention. The supernatant can be obtained from the culture by any means available to the skilled person, including centrifugation, filtration, flotation and the like.

In a further aspect, the invention provides a probiotic strain or a mixture of probiotic
30 strains according of the invention or a supernatant of a culture of one or more of the strains according to the invention for use as a medicament.

6

In another aspect, the invention provides a composition which comprises at least one of the bacterial strains of the invention. Preferably, the composition comprises at least 2, at least 3, at least 4, at least 5 or at least 6 of the strains of the invention, and wherein each of the strains is represented in the composition in a proportion from 0.1% to 99.9%, preferably from 1% to 99%, more preferably from 10% to 90%. In another embodiment, the composition comprises any of the bacterial strains of the invention together with another strain or mixture of strains and where each of the strains is represented in the composition in a proportion from 0.1% to 99.9%, preferably from 1% to 99%, more preferably from 10% to 90%. In another aspect, the invention provides a composition which comprises a supernatant of a culture of one or more of the strains according to the invention. Preferably, the supernatant is represented in the composition in a proportion from 0.1% to 99.9%, more preferably from 1% to 99% and even more preferably from 10% to 90%.

In another aspect, the invention provides a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of at least one strain or a composition of the invention or of a supernatant of a culture of one or more of the strains according to the invention. The pharmaceutical preparation can take the form of tablets, capsules, liquid bacterial suspensions, dried oral supplements, wet oral supplements, dry tube feeding or a wet tube feeding. Preferably the probiotic, the probiotic-containing or supernatant-containing composition and pharmaceutical product is directed to the oral, gastric and/or to the intestinal mucosal surface; however, it could also be directed to nasopharyngeal, respiratory, reproductive or glandular mucosa, and/or to the mammary gland and it could be administered to women and animals by an oral, nasal, ocular, rectal, topical and/or vaginal route.

In another aspect, the invention provides a feed or a nutritional product comprising at least a probiotic strain according to the invention or of a supernatant of a culture of one or more of the strains according to the invention. Non-limiting examples of suitable foodstuffs which can be used in the present invention are milk, yoghurt, cheese, curd, fermented milks, milk based fermented products, fermented cereal based products, fermented meat products, other milk based or cereal based powders, clinical nutrition formula, ice-creams, juices, bread, cakes or candies, animal feed formulations, semi- or

synthetic diet formulations, infant formulae, clinical nutrition formulae, ice-creams, juices, flours, bread, cakes, candies or chewing-gums.

The required dosage amount of the probiotic strains in the composition, food or pharmaceutical composition described before will vary according to the nature of the disorder or the proposed use of the composition, whether used prophylactically or therapeutically and the type of organism involved.

Any suitable dosage of the probiotics or combinations thereof may be used in the present invention provided that the toxic effects do not exceed the therapeutic effects. Therapeutic efficacy and toxicity may be determined by standard pharmaceutical procedures with experimental animals, such as by calculating the ED, (the dose therapeutically effective in 50% of the population) or LD (the dose lethal to 50% of the population) statistics. The dose ratio of toxic to therapeutic effects is the therapeutic index, which can be expressed as the LD/ED ratio. Nevertheless, the activity of the new microorganisms in the individual is naturally dose dependent. That is, the more the novel microorganisms are incorporated by means of ingesting or administration of the above food material or the pharmaceutical composition, the higher protective and/or therapeutic activity of the microorganisms. Since the microorganisms of this invention are not detrimental to mankind and animals and have eventually been isolated from healthy human breast milk, a high amount thereof may be incorporated so that essentially a high proportion of the individual's mucosa will be colonized by the novel microorganisms. Compositions which exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from animal studies are used to formulate a range of dosage for human or animal use. The dosage contained in such compositions is preferably within a range of circulating concentrations that includes the ED, with little or no toxicity. The dosage varies within this range depending upon the dosage form employed, the sensitivity of the patient, and the route of administration. The exact dosage will be determined by the practitioner, in light of factors related to the subject requiring treatment. For instance, for preparing a food composition according to the present invention at least one of the probiotic strains of the present invention is incorporated in a suitable support, in an amount of from 10^5 cfu/g to about 10^{12} cfu/g support material,

16

preferably from about 10^6 cfu/g to about 10^{11} cfu/g support material, more preferably from about 10^6 cfu/g to about 10^{10} cfu/g support material.

In the case of a pharmaceutical composition, the dosage of the probiotic strain should be
5 from about 10^5 cfu/g to about 10^{14} cfu/g support material, preferably from about 10^6 cfu/g to about 10^{13} cfu/g support material, more preferably from about 10^7 cfu/g to about 10^{12} cfu/g support material. For the purpose of the present invention the abbreviation cfu shall designate a "colony forming unit" that is defined as the number of bacterial cells as revealed by microbiological counts on agar plates.

10

Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the active moiety or to maintain the desired effect. Factors which may be taken into account include the severity of the disease state, the general health of the subject, the age, weight, and gender of the subject, time and frequency of administration, drug combination(s),
15 reaction sensitivities, and response to therapy. Long-acting compositions may be administered every 3 to 4 days, every week, or biweekly depending on the half-life and clearance rate of the particular formulation.

In a preferred embodiment, the invention also refers to compositions of the strains of
20 this invention in a lyophilized, freeze dried or dried form, which can be obtained by any conventional method known in the art.

In another aspect, the invention provides a composition, pharmaceutical product, feed or nutritional product wherein the probiotic strain or the mixture thereof is in a partially or
25 totally inactivated form.

Many people have a disturbed intestinal microflora, that is, the balance between useful and harmful intestinal bacteria is disturbed. A number of factors, among others stress, the presence of bile salts, and specially diet, influence the bacterial flora. In these
30 situations the fermentation process could be disturbed and the number of useful bacteria be reduced, with the consequence that the colon mucosa withers away and ceases to function at the same time as the potentially malignant bacteria rapidly grow in number. The probiotic strains of the invention are capable of preventing adhesion of *S.aureus* to

19

epithelial cells, as well as of reducing survival rates of *S.aureus* cells and of many other pathogens. Thus, the probiotic strains of the invention are particularly useful for the treatment of said diseases since they contribute effectively to the killing of the pathogens while at the same time; they contribute to the repopulation of the mucosal surface with the physiological microflora.

For this reason, one aspect of this invention is the use of probiotics of the invention and of the supernatants of a culture of one or more strains of the invention for the preparation of a pharmaceutical composition for the prophylactic or therapeutic treatment of chronic or acute infection, or infestation or of undesirable microbial colonization, of a mucosal surface or any other human location, wherein the infection, infestation or colonization is caused by parasites, bacteria, yeast, fungi or viruses, affecting any body surface or mucosa, said therapeutic treatment comprising the administration of an effective amount of a probiotic, or a probiotic-containing composition, to a subject in need thereof. In a preferred embodiment, the infection or colonization is caused by parasites, bacteria, yeast, fungi or viruses, of any body surface or mucosa in a subject or animal in need thereof.

The probiotics of the invention have been selected based on their ability to colonise the mammary gland after oral intake and to prevent adhesion to epithelial cells and to decrease survival of *S.aureus*. Thus, the strains are suitable for treatment of mastitis. Accordingly, in a further aspect, the invention provides the use of the probiotic strains of the inventions and of the supernatants of a culture of one or more strains of the invention for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment or prophylaxis of human and animal infectious mastitis. This process consists in the use of probiotic strains selected from homologous fresh milk and in the ability of these strains to be transferred to the mammary gland and exert there their benefits, such as the inhibition of the staphylococcal infection.

Moreover, the probiotic strains of the invention have also been shown to possess some of the characteristics attributed to a potential probiotic strain, namely safety and good resistance to digestion process and the ability of gut colonization. Therefore, the strains are capable of reaching the intestinal tract after oral intake and exert their therapeutic



properties there. Accordingly, in a preferred embodiment, the invention provides the use of the probiotic strains of the invention and of the supernatant of a culture of one or more of the strains of the invention for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of neonatal diarrhoea.

5

The probiotic strains are known to reduce the production of pro-inflammatory cytokines by activated macrophages during chronic inflammatory disorders. Accordingly, in another aspect, the invention provides the use of the bacterial strains, compositions of the invention and supernatants of a culture of one or more strains of the invention for the preparation of a pharmaceutical composition for the manufacture of a medicament for the treatment of inflammatory or auto-immune disorders. Non-limiting examples of such inflammatory and autoimmune diseases include IBD, ulcerative colitis, arthritis, atherosclerosis, multiple sclerosis, psoriasis or sarcoidosis.

10

15 The probiotic strains according to the invention are capable of repopulating the immune gut barrier after oral intake and thus, they are also particularly suitable for the improvement of the immune gut barrier in a subject or animal in need thereof. Accordingly, in another aspect, the invention provides the use of one or more probiotic strains of the invention and of the supernatants of a culture of one or more strains of the invention for the preparation of a pharmaceutical composition for the preparation of a medicament for the treatment and/or prophylaxis of hypersensitivity reactions to food and metabolic intolerance such as lactose intolerance; of constipation and other gastrointestinal disorders.

20

25 Probiotics are known to be useful for counteracting cancer due to their effects in the inhibition of carcinogenic toxins in the intestines such as nitrosamines but also for the effect of this probiotics in the modulation of the natural immune response. Accordingly, in a further aspect, the invention provides the use of the strains stated in this invention and of the supernatants of a culture of one or more strains of the invention for the preparation of a pharmaceutical composition for the prophylactic or therapeutic treatment of some cancer types and for inhibiting tumor growth, metastasis and cancer in subject or animal in need thereof.

30

91

The strains of the invention are capable of modulating the immune response and the balance between Th1 and Th2 cytokines. Accordingly, in a further aspect, the invention provides the use of the strain, compositions and supernatants of the invention in the manufacture of a medicament for the treatment and/or prophylaxis of allergic disorders, asthma and disorders related with the development of tolerance against ingested proteins.

In a further aspect, the invention provides the use of the strains, compositions and supernatant of the invention in the manufacture of a medicament for the treatment and/or prophylaxis of temporally depressed immune levels in individuals such as produced during aging or in healthy individuals who are subject to intense exertion or in general to a great physiological strain or stress.

In another aspect, the invention provides for the therapeutic use of the probiotic strain, of the combinations of strains and of the supernatants wherein the strain or strains are administered via oral, topic, nasal, enteral, ocular, urogenital, rectal or vaginal.

Moreover, due to the presence of the selected strains in breast milk, the subjects in need of treatment could be not only those who intake directly the selected strains but also the fetus or breast feeding babies. Accordingly, in still a further aspect, the invention provides the use of the strains, compositions and supernatant of the invention in the manufacture of a medicament designed to be administered to lactating woman for the therapeutic or prophylactic treatment of their fetus and/or their breastfed babies.

The following methods and examples illustrate the invention.

EXAMPLES

Example 1: Isolation of probiotics from mammal milk

30

Fresh milk samples (2 ml except in the case of the bitches where only 0.5 ml were collected) were obtained from 23 healthy women at day 6-14 after labour; 8 sows at day 5 after labour, 9 bitches at day 2-10 after labour and 4 cows at day 2 after labour.

92

Neither the women nor the animals had complications during labour and no antibiotic therapy was administered in the last two weeks prior milk sample collection. All milk samples were immediately frozen at -80°C.

- 5 In order to isolate bacterial strains from these samples, serial dilutions of 0.1 ml in peptone water were plated on MRS, APT, RCM, LM17, GM17 and Elliker agar plates at 37°C in both aerobic and anaerobic conditions for 24-48 hours. Among the approx. 1200 colonies initially obtained, 120 (10%; include representatives of the different morphologies observed on the plates) were selected and subcultured in MRS agar at
10 37°C in anaerobic conditions. Among them, we further selected 68 isolates with the following characteristics: non-spore-forming, catalase- and oxidase-negative Gram positive rods.

- These 68 selected isolates were further characterized both phenotypically (API CH50,
15 APIZYM and antibiotic resistance evaluation) and genetically (16S rRNA sequencing and RAPD-PCR profile). This characterization resulted in 59 different bacterial strains which were further evaluated through the screening process described in this invention in order to obtain potential probiotic candidates to be able to protect against mastitis.

- 20 After this screening process, only 6 strains (2 from women, 2 from bitches and 2 from sows) fulfilled all the defined criteria. Other lactic acid bacteria strains were obtained from other mammal species, such as goat, ewe, cat, rat and mice, but they were not successful to fulfil all the screening criteria and for this reason they are not included in this invention.

25

- *Bifidobacterium breve* said bacteria being obtained from human milk
- *Bifidobacterium breve* said bacteria being obtained from human milk
- *Lactobacillus reuteri* said bacteria being obtained from porcine milk
- *Lactobacillus plantarum* said bacteria being obtained from porcine milk
- 30 • *Lactobacillus reuteri* said bacteria being obtained from canine milk
- *Lactobacillus fermentum* said bacteria being obtained from canine milk
- *Lactobacillus salivarius* said bacteria being obtained from porcine milk
- *Enterococcus hirae* said bacteria being obtained from feline milk



- *Enterococcus faecalis* said bacteria being obtained from feline milk
- *Lactobacillus plantarum* said bacteria being obtained from feline milk
- *Lactobacillus reuteri* said bacteria being obtained from canine milk

5

Example 2: Physiologic and genetic characterization

All these isolates were physiological and genetically characterized. For the identification of each probiotic strain, we performed a fermentation API 50CH
10 (BioMerieux) analysis of the strains at 37°C in anaerobic conditions for 24 and 48 hours, following the manufacturer instructions. The 24 hours results were summarized in Table I. A positive fermentable substrate is that with a value higher than 3.

Due to the low specificity of the API characterization, we also performed the analysis of
15 the 16S rRNA sequences of the selected bacterial strains. The 16S RNA sequence of the selected bacteria and their RAPD-PCR profile are shown in Figure 1. The results obtained led to the classification of the bacterial strains as indicated above. With this classification the bacterial strains of the invention were deposited according to the Budapest Agreement at the CECT -Colección Española de Cultivos Tipo-, Valencia
20 (Spain) on April 17th 2007 and accorded the following accession numbers:

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

The following bacterial strains of the invention were deposited according to the
30 Budapest Agreement at the CECT -Colección Española de Cultivos Tipo-, Valencia (Spain) on May 30th, 2008

- *Lactobacillus salivarius* CELA200

- *Enterococcus hirae* EH11
- *Enterococcus faecalis* EFG1
- *Lactobacillus plantarum* LG14
- *Lactobacillus reuteri* PDA3

5

Table 1: Fermentation pattern of the different probiotic strains of the invention Positive fermentable substrates are indicated in grey.

TEST	7263	7264	7260	7262	7265	7268	PDA3	LG14	CELA200	EFG1	EHG11
Glycerol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Erythritol	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
D-Arabinose	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	5
L-Arabinose	0	0	0	5	0	5	5	5	0	1	0
Ribose	5	0	0	5	5	5	5	5	5	0	0
D-Xylose	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
L-Xylose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5
Adonitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5
□ Methyl-xyloside	0	0	0	0	0	5	5	0	0	5	5
Galactose	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
D-Glucose	5	5	5	5	5	0	0	5	5	0	0
D-Fructose	5	5	0	5	0	0	5	5	5	0	0
D-Mannose	1	0	0	5	5	0	0	5	5	0	0
L-Sorbose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Rhamnose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Dulcitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inositol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mannitol	5	0	0	5	5	0	5	5	5	5	5
Sorbitol	5	0	0	5	0	0	0	5	5	5	5
□ Methyl-D-mannoside	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
□ Methyl-D-glucoside	2	0	0	0	0	0	5	0	0	5	5
N Acetyl glucosamine	2	1	0	5	5	0	5	5	5	5	5
Amygdaline	0	1	0	5	0	0	5	5	0	5	5
Arbutine	0	0	0	5	0	0	5	5	5	5	5
Esculine	5	5	0	5	0	0	0	5	5	5	5
Salicine	1	0	0	5	0	0	5	5	0	0	5
Cellobiose	5	0	0	5	0	0	5	5	5	5	5
Maltose	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Lactose	5	0	5	5	5	5	5	5	5	0	0
Melibiose	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0
Saccharose	5	0	5	0	5	5	5	0	5	0	0
Trehalose	0	0	0	5	0	0	0	5	5	1	5
Inuline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Melezitose	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
D-Raffinose	5	0	5	5	5	5	0	5	5	0	0
Amidon	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glycogene	5	5	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Xylitol	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
□ Gentiobiose	0	2	0	5	0	0	0	5	0	0	0
D-Turanose	5	5	0	5	0	0	0	5	0	0	0
D-Lyxose	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
D-Tagetose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
D-Fucose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
L-Fucose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Arabitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Arabitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gluconate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 ceto-gluconate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 ceto-gluconate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Example 3: Selective screening of the strains

15 Example 3a: Transfer to the mammary gland after oral intake

25

Once the different candidate strains were obtained from mammal milk as indicated in the first selection criteria, the following step in the selection process described in the present invention is that bacteria should be able to be transferred to milk after oral intake or topic application. In order to test this capability, the putative strains were

5 genetically labelled as described previously (WO 2004/003235) and orally administered to pregnant rats as animal model. Total lactobacilli, bifidobacteria and enterococcus were measured in milk and neonatal fecal samples. Moreover, specific transfer of bacteria was analyzed by PCR screening of the colonies obtained from the milk of lactating rats and from the neonatal faeces.

10

Four pregnant Wistar rats were orally inoculated with 10^8 cfu of genetically-labelled strains vehiculated in 0.5 ml of milk every two days from two weeks before labor. After labor, the transfer of genetically labelled bacteria to breast milk was analyzed by comparison of the bacteria isolated from the neonatal faeces at day 0, 5 and 10 after

15 labor. All the plates were incubated for 24 hours at 37°C under anaerobic conditions. For each sample obtained, total bifidobacteria, lactobacilli and enterococcus counts were measured. Among the colonies that grew on MRS plates, 50 were randomly selected from each sample and subcultured on Cm-MRS plates. Finally, the Cm-resistant colonies were used as templates to detect the specific genetic label colonies

20 (Figure 2). Transfer was considered positive when at least 1% of the colonies obtained were PCR-positive.

Example 3b: Inhibition of *Staphylococcus aureus* survival

25 The probiotic strains of this invention were assessed for their capability to produce bactericidal metabolites able to reduce the survival of *Staphylococcus aureus* using an agar well diffusion assay. TSA agar plates containing 10^6 cfu/ml of *S. aureus* were prepared. Wells with a diameter of 5 mm where cut in the agar using a sterile cork-borer. Then, 50 µl of a 2-fold concentrated supernatant of each probiotic strain solution

30 were added to the wells and allowed to diffuse into the agar during a 2 hours preincubation period at 4°C, followed by aerobic incubation of the plates at 37°C for 16-18 hours. After the incubation period, an inhibitory halo was observed and measured (in millimetres) to evaluate the bactericide effect of the probiotic candidates (Figure 3A).

Example 3c: Inhibition of *Staphylococcus aureus* adhesion to epithelial cells

Caco-2 intestinal cell lines were cultured to confluence in 35 mm plastic dishes containing 2 ml medium without antibiotics. On day 10-14 post-confluence, 1 ml of media was replaced with 1 ml of a suspension of 10^8 probiotic bacteria in DMEM. The cultures were incubated 1 hour at 37°C. After that, 1 ml of a suspension of 10^8 pathogenic bacteria (*S. aureus*) in DMEM was added to the cultures and incubated 1 hour more at 37°C. The cells were washed twice with PBS and fixed with ice-cold 70% methanol for 30 minutes. Plates were air dried and Gram stained. The attached bacteria were visualized using an optical Axiovert 200 (Zeiss) microscope at 1000x magnification in oil-immersion. The number of gram-negative bacteria in 10 randomized fields was counted and the results expressed as the mean of % of pathogenic bacteria attached to the cells compared to control cultures without probiotic strains (Figure 3B).

Example 3d: Protection of mastitis

To evaluate the efficacy of the probiotic candidates to protect against mastitis, we used a mice model of this pathology. In brief, 10 Wistar pregnant rats per group were daily supplemented by oral gavage with 10^8 cfu/day of each probiotic strain vehiculated in 200 µl of milk during two weeks after labour. One week after labour, mastitis infection was induced in the animals by injection of 10^6 cfu of *S. aureus* in the fourth mammary gland pair. Expressed milk was collected at days 0, 5 and 10 post-infection to measure bacterial load (Figure 4A); and 5 animals of each group were sacrificed at days 5 and 10 post infection in order to obtain mammary gland biopsies to evaluate the inflammatory process by histological examination.

Whole glands were fixed in 5% formalin and dehydrated with alcohol, and finally embedded in paraffin. Tissue sections were stained with haematoxylin-eosin and examined in a blinded fashion (Figure 4B). To qualitatively evaluate alterations of mammary gland histology, an inflammatory index value (IIV) was determined as follow:

– Score 0: No infiltration



- Score 1: Mild PMN cell interstitial infiltration in isolated areas of tissue sections, undamaged tubular epithelium
- Score 2: Interstitial infiltration covering most fields, dispersed areas of tissue damage with loss of tissue structure, and scant images of abscess formation
- Score 3: Severe infiltration covering most fields, frequent areas of tissue damage with loss of tissue architecture, and frequent images of abscess formation.

10 Example 4: Probiotic potential of the strains

The selected strains were further analyzed for different characteristics that could enhance their capabilities to act as a probiotic strains. The results obtained are described in the indicated examples.

15

Example 4a: Adhesion to Caco-2 and HT-29 cells

For the adhesion assays the cell lines Caco-2 (ATCC HTB-37) and HT-29 (ATCC HTB-38) were utilized as a model of the intestine cells. Both cell lines presented features characteristic for intestinal cells such as polarization, expression of intestinal enzymes, production of particular structural polypeptides and mucins.

The cells were grown in plastic flasks (75 cm², Nunc) in DMEM as culture medium supplemented with 10% inactivated FCS, non essential amino acids, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 1 µg/ml amphotericine. Culturing was performed at 37°C in an atmosphere comprising 95% air and 5% CO₂. Media was changed on a two daily basis and the cells were split every week.

Caco-2 and HT-29 intestinal cell lines were split in 35 mm plastic dishes in 2 ml medium without antibiotics to confluence. 10-14 days post-confluence, 1 ml of media was replaced with 1 ml of a suspension of 10⁸ bacteria in DMEM (PAA). The cultures were incubated 1 hour at 37°C. After that, cells were washed twice with PBS and fixed with ice-cold 70% methanol for 30 minutes. Plates were air dried and Gram stained.

The attached bacteria were visualized using an optical Axiovert 200 (Zeiss) microscope at 1000x magnification in oil-immersion. Twenty randomized fields were counted and the results expressed as the mean of the number of bacteria attached to the cells per field $\pm$ SD (Figure 5)

5

Example 4b: Resistance to acid and bile salts

To analyze the resistance of the probiotic strains of this invention to acidic and high bile salt content, conditions that these bacteria will encounter during the digestive transit, bacteria were cultured in MRS broth medium pH 3.0 or with 2 % bile salts (Sigma) for 10 90 minutes. The survival was calculated by MRS agar plating of serial dilutions and compared to the number of colonies obtained in control conditions (MRS broth pH 5.8). Plates were cultured 24 hours at 36°C in extreme anaerobic conditions. The experiment was repeated three times (Figure 6).

15

Example 4c: Resistance to antibiotics

The use of modern antibiotics leads to a reduction of the comensal gut microflora which sometimes relates to diarrhoea and other gut disorders. Moreover, this reduction in the amount of gut bacteria could be the consequence of opportunistic pathogenic bacteria and viruses to infect the host. The use of antibiotics to block the infection does not resolve this disorder but complicates it. In other situations like intestinal inflammation where probiotics could exert a beneficial role, this potential effect is sometimes limited for the simultaneous therapy with antibiotics. For all these reasons, the selection of 25 potential probiotic strains which were able to resist common antibiotics should be clearly interesting.

To analyze the resistance of the probiotic strains of this invention we used a agar well diffusion assay. Mueller-Hinton agar plates containing 10^6 cfu/ml of each probiotic strain were prepared. Then, antibiotic commercial discs were added to the wells and 30 allowed to diffuse into the agar during 10 minutes preincubation period at room temperature, followed by extreme anaerobic incubation of the plates at 36°C for 16-18 hours.

29

The antibiotic resistance of the probiotic strains of this invention is summarized in Table II.

5 **Table II: Antibiotic resistance of the different probiotic strains of the invention**

	7263	7264	7260	7262	7265	7266	PDA3	LG14	CELA200	EFG1	EHG11
Penicillin	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S
Ampicilin	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S
Ciprofloxacin	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Erythromycin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Clindamicin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Tetracycline	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Vancomycin	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S
Gentamicin	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Cloramphenicol	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Rifampicine	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R

Example 4d: Production of antimicrobial metabolites

10 It has been suggested that the main mechanism used by probiotics is controlling the balance between useful and harmful intestinal bacteria is the gut. When the number of useful bacteria is reduced, opportunistic bacteria could over-grow and disturb the well-being of the host or even induce an infection. Most bacterial organisms have acquired
15 characteristics or mechanisms that reduce the growth capabilities of other microorganisms that cohabitate with them and thus, enabling their selective growth. The reduction of pH through acid production by lactic acid bacteria is one of such mechanisms. Moreover, some lactic acid bacteria also produce bioactive peptides components and other metabolites that selective inhibit the growth of other bacteria,
20 yeast or fungi. This is the case of reuterin (an aldehyde) or bacteriocins (peptides, such as nisin or pediocin PA-1).

 The probiotic strains of this invention were assessed for their capability to produce bactericidal metabolites using an agar well diffusion assay. TSA agar plates containing
25 10⁶ cfu/ml of different pathogenic bacteria strain were prepared and assayed as previously indicated in Example 3b for *S. aureus*. Results obtained were described in Table III.

30

Table III: pathogen inhibitory potential of the different probiotic strains of the invention

	PDA3	LG14	CELA200	EFG1	EHG11	7263	7264	7260	7262	7265	7266
<i>E. faecium</i> P21	+	+	+	-	-	+++	+++	+	+	+++	+++
<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> RJM1	+++	+++	+++	+	+	+	+++	++	+++	+++	+/-
<i>S. enteritidis</i> 4396	+++	+++	+++	++	++	+/-	++	++	+++	+++	++
<i>K. pneumoniae</i> CECT142	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+	+++	++
<i>K. oxytoca</i> CECT860T	+/-	+	+++	++	++	+++	+++	+/-	+/-	+/-	++
<i>P. vulgaris</i> CECT484	++	++	++	+	+	+/-	+	+++	+++	+++	+/-
<i>S. aureus</i> CECT5191	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++
<i>S. epidermidis</i> CECT231	++	++	+++	++	++	++	+++	+++	++	++	++

5

Example 5: Effect of the probiotic strains of this invention on translocation of *Salmonella typhimurium* in mice following immunization with inactivated *Salmonella* vaccine

10

Translocation of gram-negative bacteria across the gut epithelium can occur especially in subjects following gastrointestinal infection, disease or surgery. Left untreated it can lead to endotoxemia. In this example, the effect of feeding the probiotic strains of this invention on the translocation of the gut pathogen *Salmonella typhimurium* was examined.

15

Male Balb/c mice (6-8 weeks old) were daily fasted with 1×10^8 cfu in 0.2 ml of milk or milk alone for two weeks. After that, mice were either orally immunized or not with an inactivated *Salmonella* vaccine (10^8 cfu inactivated with paraphormaldehyde in 0.2 ml milk). After immunization, mice were fasted two weeks more with the probiotic preparations in alternate days for two weeks more. Two weeks after oral immunization, all mice were orally challenged with live *S. typhimurium* (10^{10} cfu in 0.2 ml milk).

20

31

Then, after 24-48 hours, the level of colonization of *S. typhimurium* in the spleen was determined in half of the animals. The rest of the animals were followed during two additional weeks in order to evaluate the survival of the animals after *Salmonella* infection.

5

The results obtained demonstrate that most of the probiotics tested potentiates the beneficial effect of the vaccination of mice with the inactivated *Salmonella* vaccine as shown in Figure 7.

10 **Example 6: Effect of *L. plantarum* CECT7262 or *L. reuteri* CECT7260 on the prevention of neonatal diarrhoea in neonatal piglets.**

The weaning of piglets at 3-4 weeks of age correlates with a high mortality rate in those animals mainly due to an increase in the incidence of diarrhoeal infections. Probably,
15 this high mortality relates to a down-regulation of their defences due to the stressing modification of their nutritional and management status and to important changes in the composition of their gut microbiota.

For this reason, farmers have tried to solve this problem with the use of several
20 approaches such as the use of antibiotics, immune-stimulant or mucosal protector components, such as colistine or ZnO. However, the EU ban of the use of antibiotics for animal production in 2006 has aggravated the situation. For this reason, the use of probiotics able to modulate the gut microbiota and the immune response appears as a potential alternative.

25

We compared the protective effect of the administration of 3×10^9 cfu/day of *L. reuteri* CECT7260 and *L. plantarum* CECT7262 versus the administration of an animal feed formulation containing 3000 ppm of ZnO and 40 ppm colistine in two groups of 48 and 45, respectively, weaned pigs for a period of 34 days.

30

In both groups, none of the animals suffered from diarrhoea nor died during the study, and the evolution of the body weight was also similar between both treatments,

32

suggesting that an animal feed formulation supplemented with these probiotics is, at least, as good as those containing conventional antibiotics and immune modulators.

Example 7: Effect of probiotic bacteria on inflammatory cytokines and IgG production

Besides the reduction of the risk of infection, many clinical effects associated to probiotic treatments are due to immunomodulatory capabilities of selected probiotic strains. The regulation of the immune response is usually mediated through a change in the balance between pro-inflammatory cytokines (Th1) such as TNF- α , humoral cytokines (Th2) such as IL-4 or IL-13, and regulatory cytokines (Th3) such as IL-10 and TGF- β . Moreover, the bias in the immune response will also modulate the secretion of immunoglobulins during the subsequent humoral response. For this reason, we have also tested the effect of some of the probiotic strains of this invention in regulating the expression of some of these clue cytokines and IgG.

We have used bone marrow-derived macrophages stimulated with 100 ng/ml of LPS (Sigma) as a cellular model. 10^5 macrophages/well were cultured in 24-well plastic plates (Nunc) with 1 ml of DMEM. Once attached, macrophages were stimulated or not with 100 ng/ml LPS and with 10^7 cfu/ml of the indicated probiotic strains for 12 hours at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Supernatants were collected and the production of cytokines was analyzed using a mouse TNF- α or mouse IL-10 ELISA (Biosource). The results obtained are summarized in Figure 8A and B.

The analysis of the effect of the probiotic strains of this invention on immunoglobulin production was performed using lymphocyte cultures obtained from the spleen of male Balb/c mice (6-8 weeks old). 2×10^6 lymphocytes were cultured in 1 ml DMEM in 24 well plastic plates and stimulated with inactivated probiotic cultures (10^8 cfu/ml) in presence or absence of 25 μ g/ml LPS for 6 days. The production of IgG by lymphocytes was assessed using a mouse IgG ELISA from Bethyl (Figure 8C).

CLAIMS

- 1- A process for the selection of probiotics comprising the steps of :
- 5 (i) isolating lactic acid bacteria or bifidobacteria strains present in the fresh milk from a mammalian species by selection in lactic acid culture media,
- (ii) selecting those strains from step (i) that are capable of being transferred to the mammary gland after oral intake and/or colonise the mammary gland after its topic application,
- 10 (iii) selecting those strains from step (ii) which are able to reduce the rates of survival and/or the rates of adhesion to epithelial cells of *Staphylococcus aureus* and
- (iv) selecting those strains from step (iii) that are capable of protecting animals from mastitis.
- 15 2- A process according to claim 1 wherein the milk used in step (i) is selected from human, porcine, bovine, cat, ovine and canine milk.
- 3- A probiotic strain obtainable by the process according to claims 1 or 2.
- 20 4- A probiotic strain according to claim 3 characterised in that the strain is selected from the group of *Bifidobacterium breve* deposited in the CECT under Accession N° 7263, *Bifidobacterium breve* deposited in the CECT under Accession N° 7264, *Lactobacillus reuteri* deposited in the CECT under Accession N° 7260, *Lactobacillus plantarum* deposited in the CECT under
- 25 Accession N° 7262, *Lactobacillus fermentum* in the CECT under Accession N° 7265 and *Lactobacillus reuteri* deposited in the CECT under Accession N° 7266, *Enterococcus hirae* EHG11, *Lactobacillus plantarum* LG14, *Enterococcus faecalis* EFG1, *Lactobacillus salivarius* CELA200, *Lactobacillus reuteri* PDA3.
- 30 5- A supernatant of a culture of a strain or of a mixture of strains as defined in claims 3 or 4.

34

- 6- A probiotic strain according to claims 3 or 4 or a mixture of strains according to claims 3 or 4 or a supernatant according to claim 5 for use as a medicament.
- 5 7- A composition, a pharmaceutical product, a feed or a nutritional product comprising at least a probiotic strain according to claims 3 or 4 or a supernatant as defined in claim 5.
- 10 8- A composition, pharmaceutical product, feed or nutritional product as defined in claim 7 which is in a frozen, lyophilized or dried form.
- 9- A composition, pharmaceutical product, feed or nutritional product as defined in claims 7 or 8 wherein the probiotic strain or the mixture thereof is in a partially or totally inactivated form.
- 15 10- Use of a probiotic strain according to claims 3 or 4 or a mixture thereof or a supernatant as defined in claim 5 for the manufacture of a medicament for the treatment and/or prophylaxis of a chronic or acute infection or infestation, or of an undesirable microbial colonization, wherein the infection, infestation or colonization is caused by parasites, bacteria, yeast, fungi or viruses, affecting
- 20 any body surface or mucosa in a subject or animal in need thereof.
- 11- Use according to claim 10 wherein the infection is mastitis and the probiotic strain has been selected in step (i) using milk from the same species that is intended to be treated.
- 25 12- Use according to claim 10 wherein the infection is neonatal diarrhoea.
- 13- Use of a probiotic strain according to claims 3 or 4 or a mixture thereof or a supernatant as defined in claim 5 for the manufacture of a medicament for the
- 30 treatment and/or prophylaxis of hypersensitivity reactions to food and metabolic intolerance; of constipation and other gastro-intestinal disorders; of inflammatory or auto-immune disorders selected from the group of IBD, ulcerative colitis, arthritis, atherosclerosis, multiple sclerosis, psoriasis or



sarcoidosis; and of tumour growth, metastasis and cancer in subject or animal in need thereof.

5 14- Use of a probiotic strain according to claims 3 or 4 or a mixture thereof or a supernatant as defined in claim 5 for the manufacture of a medicament for the treatment and/or prophylaxis of allergic disorders and asthma in a subject or animal in need thereof.

10 15- Use of a probiotic strain according to claims 3 or 4 or a mixture thereof or a supernatant as defined in claim 5 for the manufacture of a medicament for treatment and/or prophylaxis of temporally depressed immune levels in individuals or animals subjected to physiological and management-derived stress.

15 16- Use according to claims 10 to 15 wherein the strain or composition is administered via oral, topic, nasal, enteral, ocular, urogenital, rectal or vaginal.

20 17- Use according to claims 10 to 15 wherein the strain, composition, pharmaceutical product, feed or nutritional product is designed to be administered to lactating woman or animal for the therapeutic or prophylactic treatment of the foetus and/or their breastfed babies or pups.

36

Bifidobacterium breve (CECT under Accession N° 7263)

TCGNGTNNGAAGNACAATAAACACNTAAGTGCCTTGCTCCCTAACAAAAGA
GGTTTACAACCCGCAAGGCCTCCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAG
GCTTGCGCCCATTTGATGCAATATTCCCCANTGCTGCCTCCCGATANGAGT
CTGGGCGGTATCTCAGTCCCAATGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGC
TACCCGTCGAAGCCATGGTGGGCGGTACCCCGCCATCAAGCTGATAGGA
CGCGACCCCATCCCATGCCGCAAAGGCTTTCCCAACACACCATGCGGTGT
GATGGAGCATCCGGCATTACCACCCGTTTCCAGGAGCTATTCCGGTGCAT
GGGGCAGGTCCGTCACGCATTACTACCCGTTTCGCCACTCTCACCACCAG
GCAAAGCCCGATGGATCCCGTTGCACTTGCATGTGTAAAGCACGCCGCCA
GCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTAA

Bifidobacterium breve (CECT under Accession N° 7264)

TNCGCGANGAAGAAATAAAACAAAGTGCCTTGCTCCTAACAAAAGAGGTT
TACAACCCGAANGCCTCCATNCCTCACGNGGNGTCNCATGCATCAGGCTT
GCGCCCATTTGTGNAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTANGAGTCTGGGC
CGTATCTNANTCCCAATGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGT
CGAAGCCATGGTGGGCGGTACCCCGCCATCAAGCTGATAGGACGCGAC
CCCATCCCATGCCGCAAAGGCTTTCCCAACACACCATGCGGTGTGATGGA
GCATCCGGCATTACCACCCGTTTGCAGGAGCTATTCCGGTGCATGGGGCA
GGTCNGTNACGCATTACTNACCCGTTTCGCCACTCTCACCACCAGGCAAAG
CCCGATGGATCCCGTTGCACTTGCATGTGTAAAGCACGCCGCCNGCGTTC
ATCCNNAACAGGATCAAACCTCTAA

Lactobacillus reuteri (CECT under Accession N° 7260)

GCNTGGGNGAACGGTCACTGCGGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACA
GAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGC
CCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTTC
CATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTTAC
CTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTT
CAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCAAATGTT
ATCCCCCGTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTACCCGTCCGCCACTCACTGGTG
ATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACTTGC
ATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGNCAGGATCNAACTCTAA

Lactobacillus plantarum (CECT under Accession N° 7262)

GGCCTGGGAANCCGGTCATACCTGGAACAGGTTACCTCTCAGATATGGTTCTTCTTTAA
CAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACT
TTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTC
AGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCCGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCC
GTTACCTCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCA
TCTTTCAAACCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAG
GTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCACGTGTTACTCACCAGTTCGCCACTCAC
TCAAATGTAATTCATGATGCAAGCACCAATCATTACCAGAGTTCGTTGCACTTGCATGT
ATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCTGAGACAGGATCAAACTCTA

Figure 1A

37

Lactobacillus fermentum (CECT under Accession N° 7265)

TACACGATATGAACAGNTTACCTCTCATACGGTGNTTCTTCTTTAACAACAGAGCTTTA
CGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTG
GAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTGTGG
CCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAGGCCGTTACCCACCAA
CAAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAGCGT
TGTTTCATGCGAACAACGNTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTGTCCCC
GCTTCTGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCGTTGGCGACCAAAA
TCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAATTGGGCCAACGCGTTCGACTTGCATGTATTA
GGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAANTCTAA

Lactobacillus reuteri (CECT under Accession N° 7266)

ACCGNNGGNNAACGACACTGCGNGNACAGNTTACTCTCACGCACGNTTCTTCTCCAACA
ACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTG
CGCCCATTTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAG
TTCCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGT
TACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATC
TTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAAT
GTTATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCACTG
GTGATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACT
TGCATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAANTCTAA

Enterococcus hirae EHG11:

GACAGTTACTCTCATCCTTGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTT
CTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTGAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTG
CTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCTCTCA
GGTCGGCTATGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCG
CGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGCGGTTTTCG
ATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTTCTGATGGGCAGGTTA
CCCACGTGTTACTCACCCGTTTCGCCACTCCTCTTTTTTCCGGTGAGCAAGCTCCGGTGG
AAAAAGAAGCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAG
GT

Lactobacillus plantarum LG14:

TTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCA
CTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCTCTCAGGTCG
GCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCYCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGA
CCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGT
TATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCAC
GTGTTACTCACCAGTTTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCATCAA
TACCAGAGTTCGTTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAG

Figure 1B

38

Enterococcus faecalis EFG1:

CTATCATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGG
AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTG
GAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGC
TTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
TCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGT
CTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTA
GAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCCAGCA

Lactobacillus salivarius CELA200:

GGGTGGGGNGANCAGAACATGAAATGAACAGTTTACATCTCACCTCGCTGNTTCTTCCT
CTAACAACAGAGCTTTTACGACTCCGAAGGACCTTCTTCACATCACGCGGCGTNTGCTC
CATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGG
CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGATTTCGGCTACGTATCATCACC
TTGGTAGGCCGTTACCCACCAACTAGTTAATACGCCGCGGGTCCATCTAAAAGCGATA
GNAGAACCATCTTTCATCTAAGGATCATGCGATCCTTAGAGATATACGGNATTAGCACC
TGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTTTTAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCC
GCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTCGGTGTAAGAAAGTTTCGTTGACTT
GCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTNATGAGCCAGGATCAAACCTCTA

Lactobacillus reuteri PDA3:

GCNTGGGNGAACGGTCACTGCGGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACA
GAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGC
CCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTTC
CATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTTAC
CTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTT
CAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTT
ATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCACTGGTG
ATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACTTGC
ATGTATTAGGCACACCGCCGCGTTCATCCTGAGNCAGGATCNAAACTCTAA

Figure 1C

39

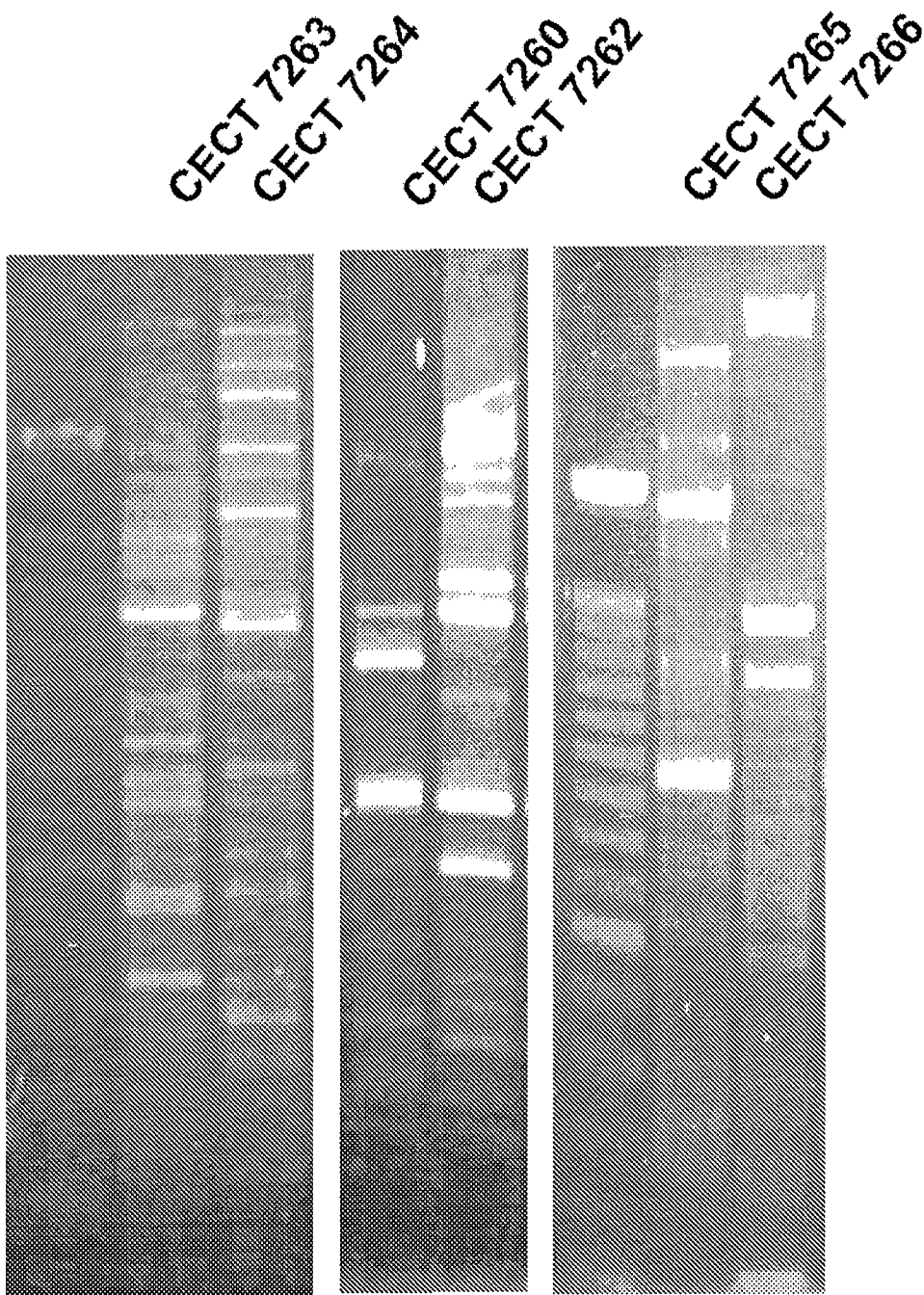
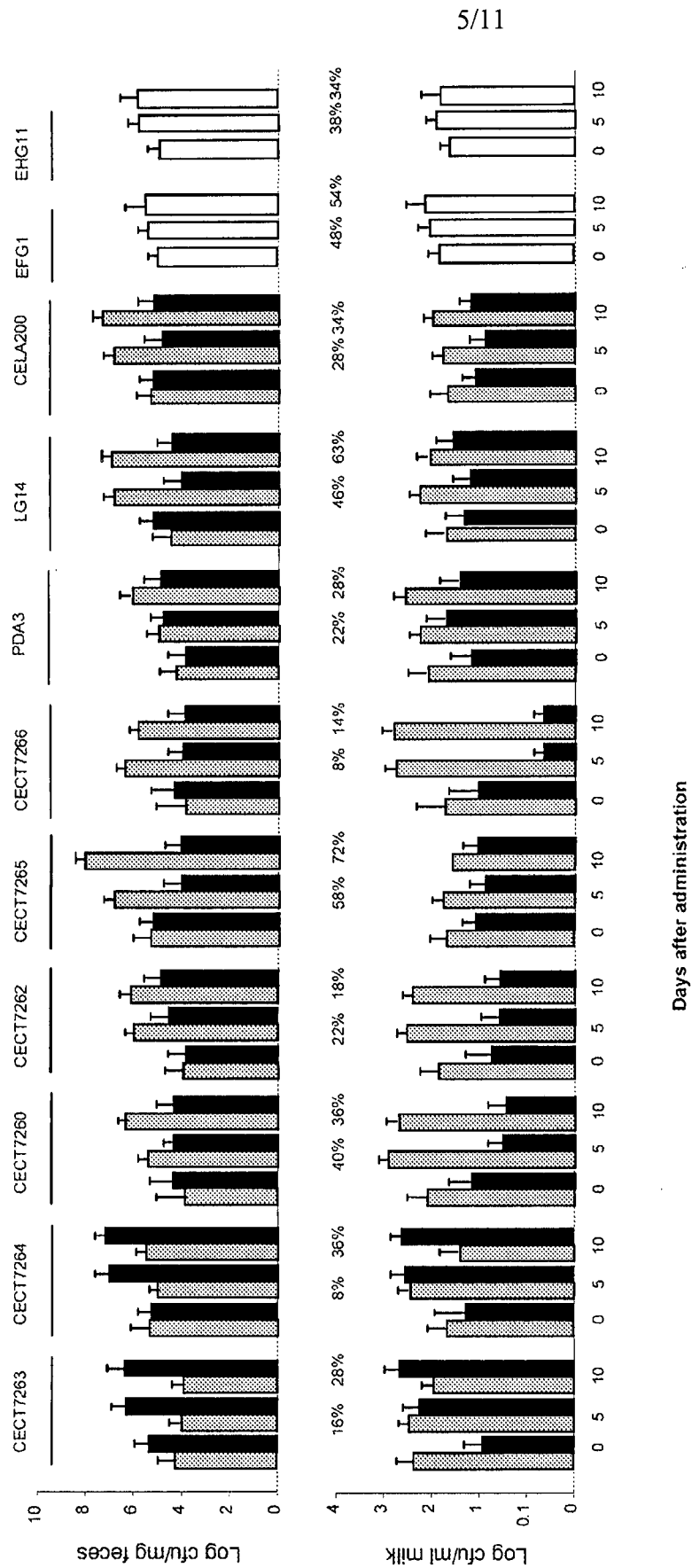


Figure 1D

40



Handwritten signature or initials.

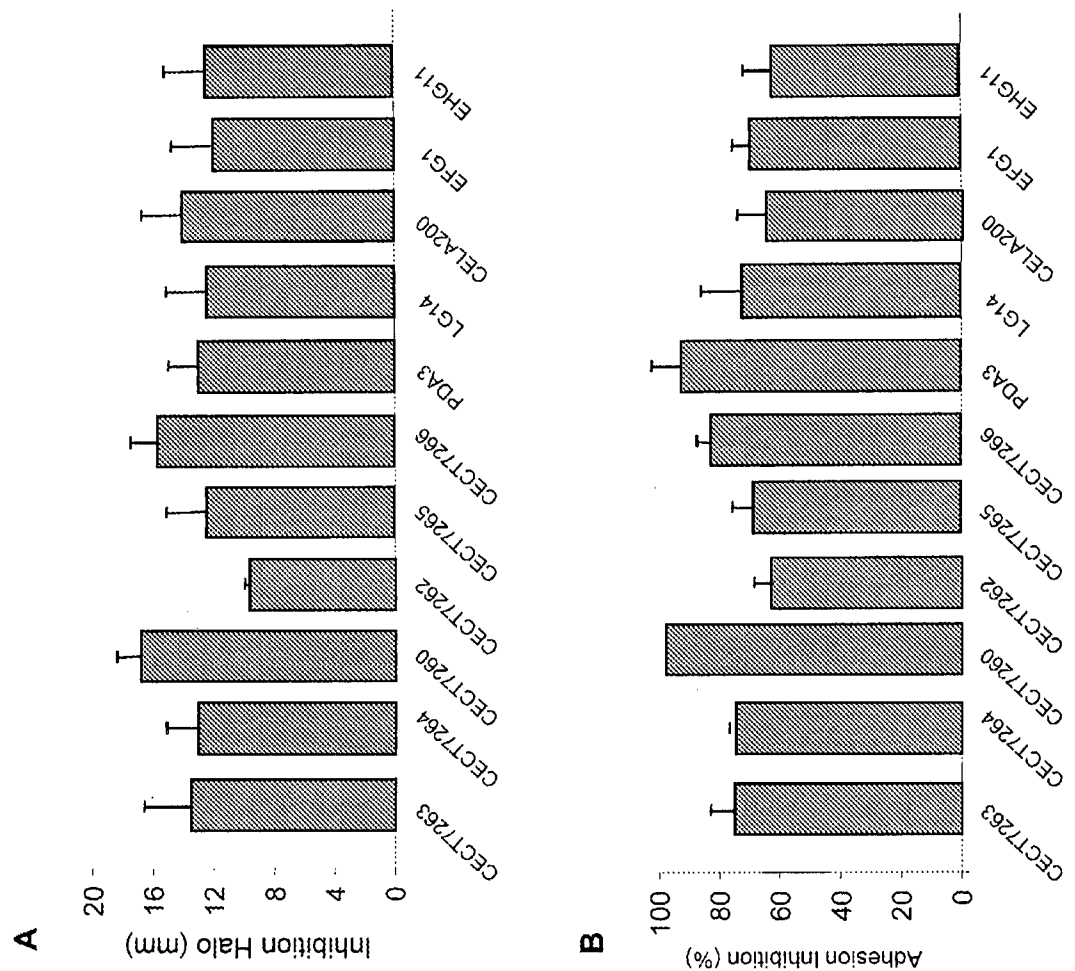


Figure 3

Handwritten signature or initials.

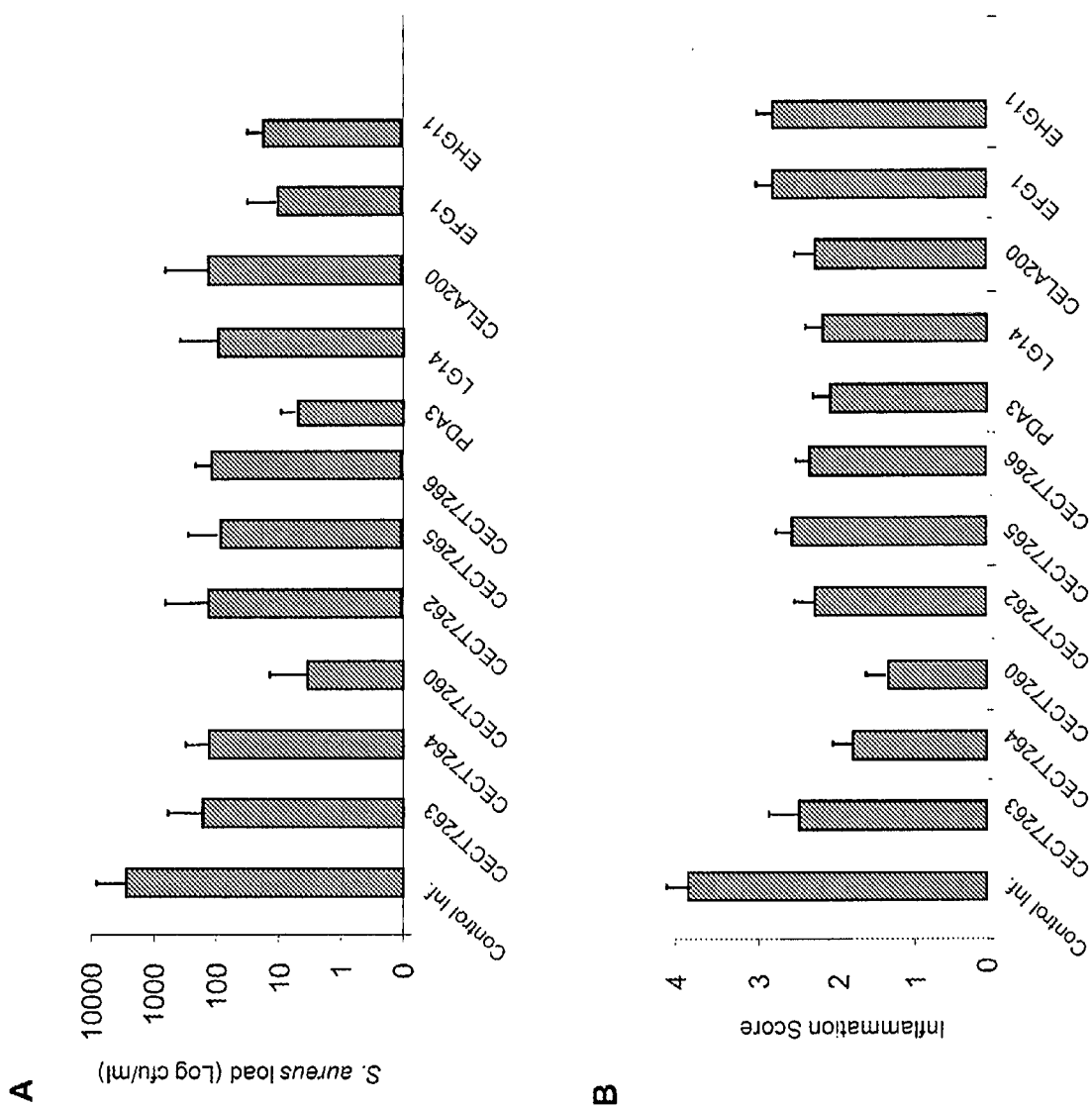


Figure 4

43

8/11

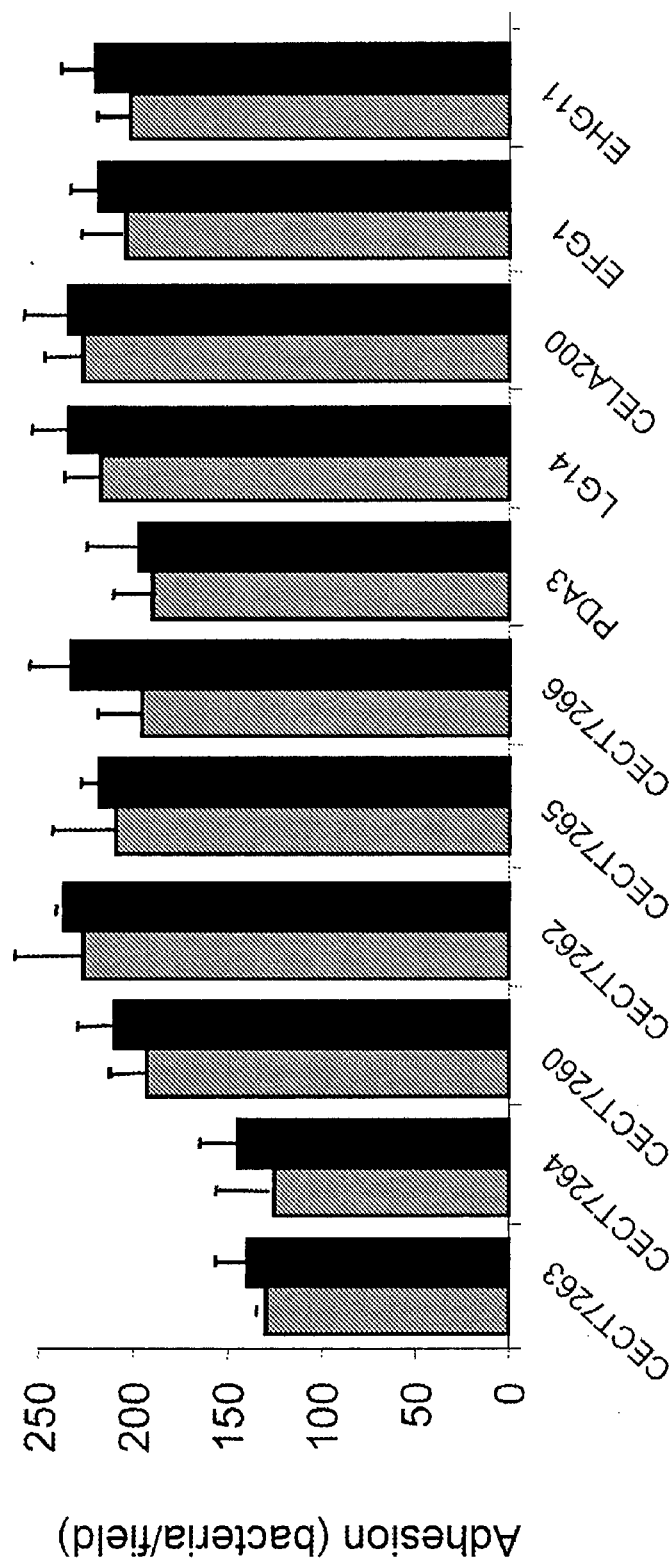


Figure 5

VPd

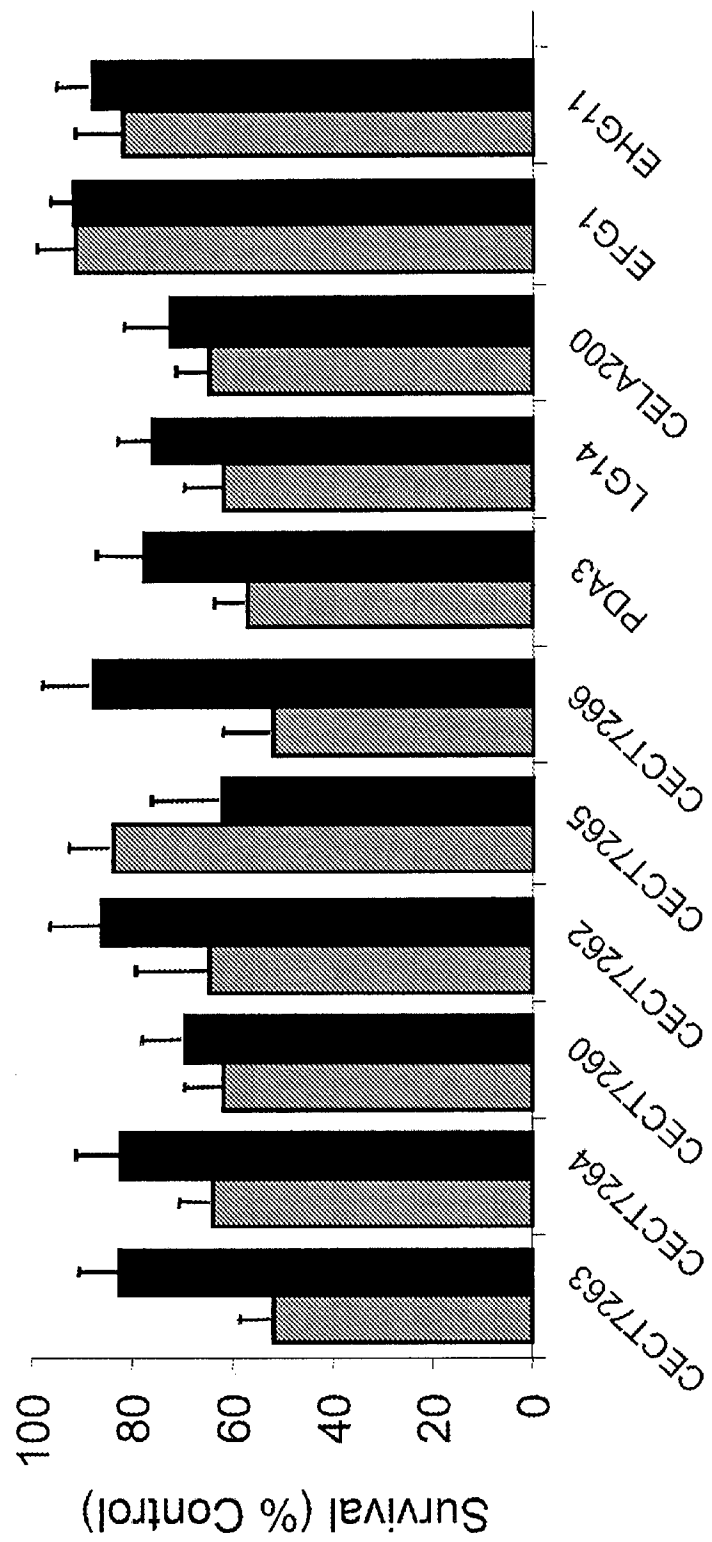


Figure 6

YPS

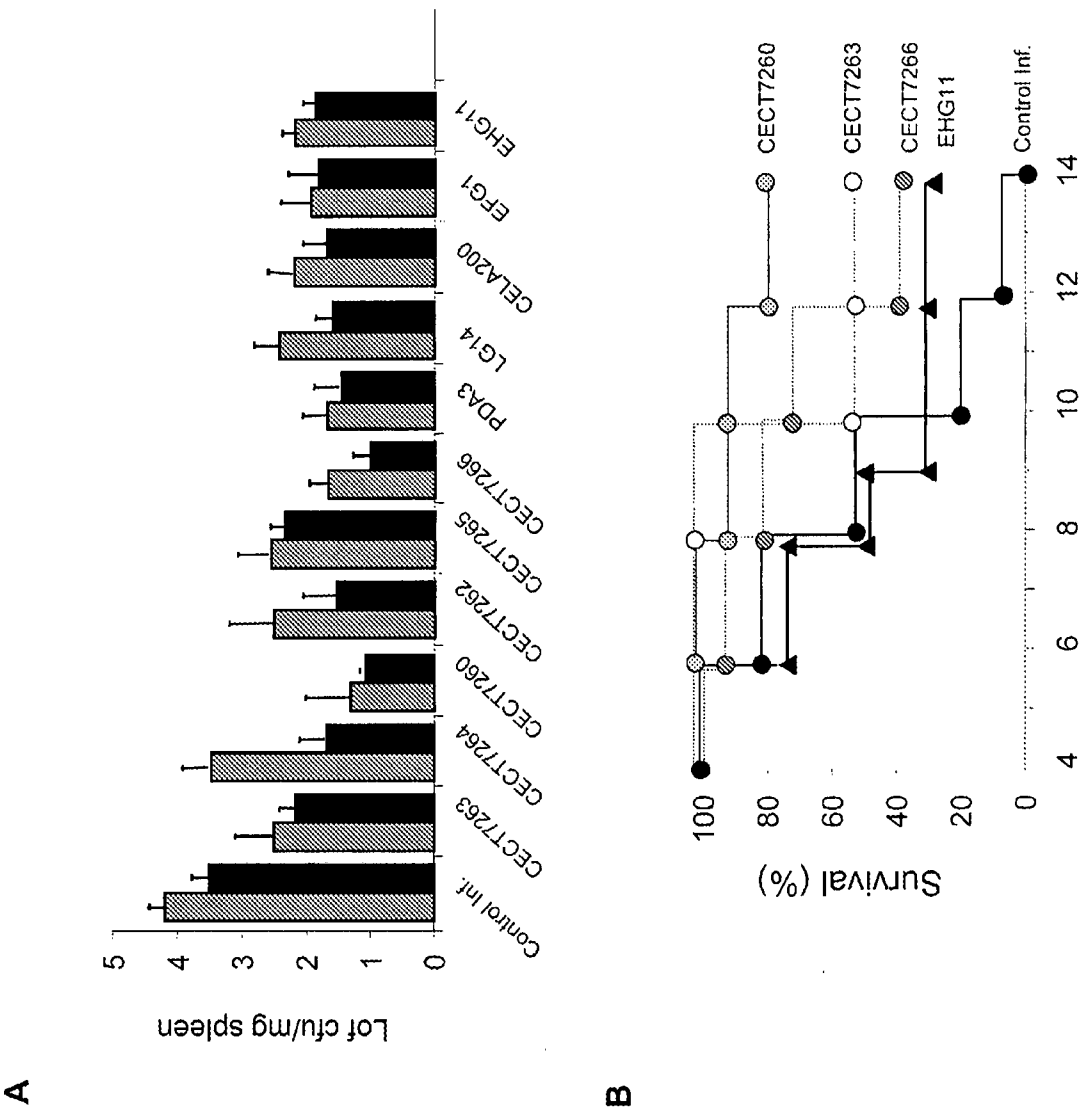


Figure 7

Yfb

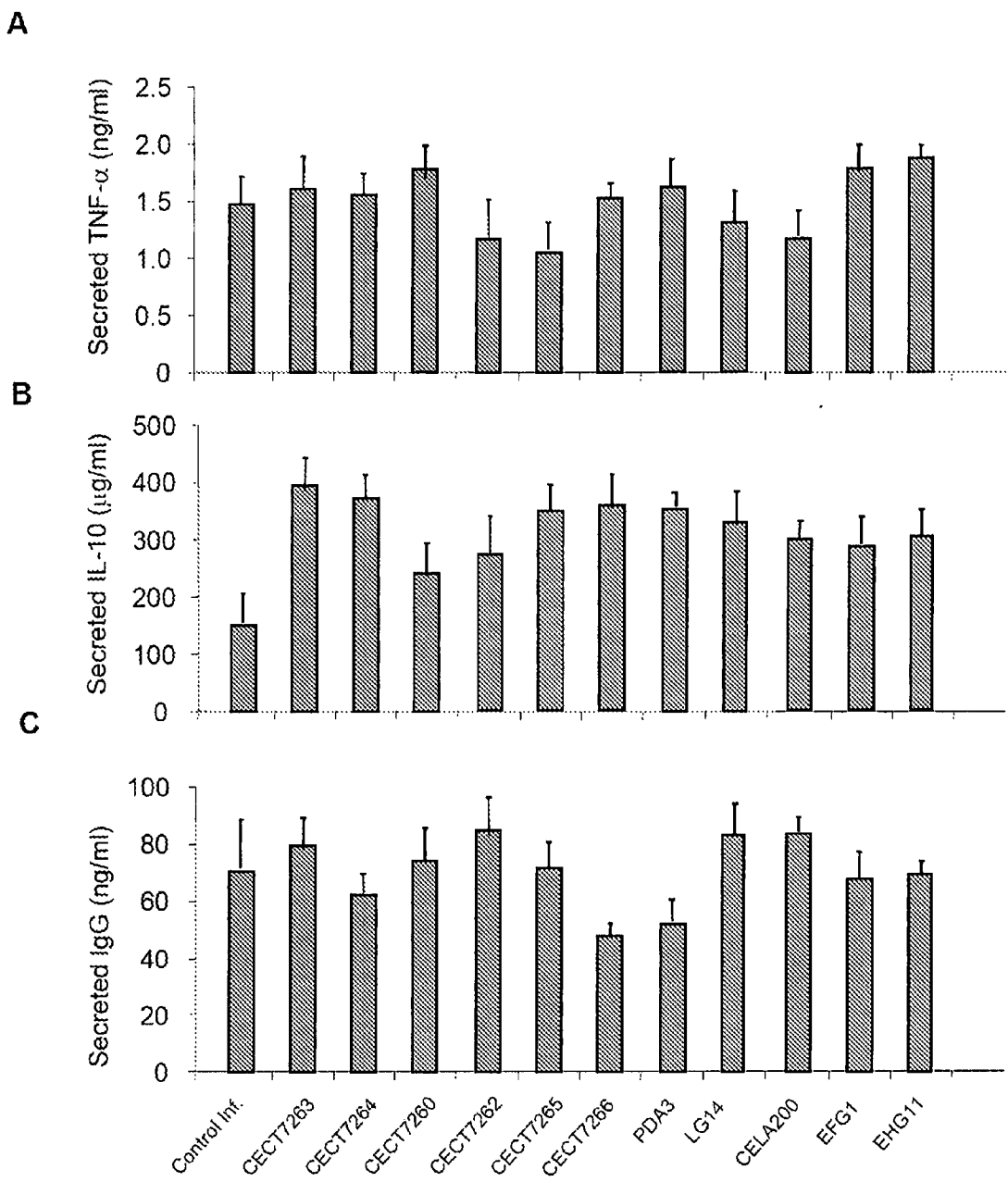


Figure 8

UP

1

SEQUENCE LISTING

<110> PULEVA BIOTECH S.A.

<120> MAMMALIAN MILK MICROORGANISMS, COMPOSITIONS CONTAINING THEM AND
THEIR USE FOR THE TREATMENT OF MASTITIS

<130> P2922ES00

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 481

<212> DNA

<213> B.breve CECT 7263

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

48

2

<221> misc_feature

<222> (131)..(131)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (147)..(147)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 1

tcgngtnnga agnacaataa acacntaagt gccttgctcc ctaacaaaag aggtttacaa 60

cccgaaggc ctccatccct cagcgggcgt cgctgcatca ggcttgcgcc cattgatgca 120

atattcccca ntgctgcctc ccgatangag tctgggcccgt atctcagtcc caatgtggcc 180

ggtcgcccctc tcaggccggc taccgctcga agccatgggtg ggccgttacc ccgccatcaa 240

gctgatagga cgcgacccca tcccatgccg caaaggcttt cccaacacac catgcggtgt 300

gatggagcat ccggcattac caccggtttc caggagctat tccggtgcat ggggcaggtc 360

ggtcacgcat tactcaccg ttcgccactc tcaccaccag gcaaagcccg atggatcccg 420

ttcgacttgc atgtgttaag cagcgcgcca gcgttcatcc tgagccagga tcaaactcta 480

a 481

<210> 2

<211> 476

<212> DNA

<213> B.breve CECT 7264

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n is a, c, g, or t

49

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

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

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

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

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

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

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

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

50

4

<220>
<221> misc_feature
<222> (159)..(159)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (161)..(161)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (355)..(355)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (358)..(358)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (369)..(369)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (444)..(444)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (455)..(456)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 2
tncgcganga agaaataaaa caaagtcct tgctccctaa caaaagaggt ttacaaccg 60

aangcctcca tncctcacgn ggngtcncat gcatcaggct tgcgcccatt gtgnaatatt 120

51

ccccactgct gcctcccgtg ngagtctggg ccgtatctna ntcccaatgt ggccggtcgc 180
cctctcaggc cggctaccgc tcgaagccat ggtggggcgt taccgcgcca tcaagctgat 240
aggacgcgac cccatcccat gcgcgcaaagg ctttcccaac acaccatgcg gtgtgatgga 300
gcatccggca ttaccaccgc tttccaggag ctattccggt gcatggggca ggtcngtnac 360
gcattactna cccgttcgcc actctcacca ccaggcaaag cccgatggat cccgttcgac 420
ttgcatgtgt taagcacgcc gccngcggtc atccnnaaac aggatcaaac tctaaa 476

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (313)..(313)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (510)..(510)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 3

SV

6

tacacgatat gaacagntta cctctcatac ggtgnttctt cttaacaac agagctttac 60
gagccgaaac cttcttcac tcacgcggtg ttgctccatc aggcttgcc ccattgtgga 120
agattcccta ctgctgcctc ccgtaggagt atgggcggtg tctcagtcac attgtggccg 180
atcagtctct caactcggct atgcatcatc gccttggttag gccgttaccc caccaacaag 240
ctaattgcacc gcaggtccat ccagaagtga tagcgagaag ccatctttta agcgttggtc 300
atgcgaacaa cgntgttatg cggatttagc atctgtttcc aaatgttggt ccccgcttct 360
gggcaggtta cctacgtgtt actcaccgt ccgccactcg ttggcgacca aaatcaatca 420
ggtgcaagca ccatcaatca attgggcca cgcgttcgac ttgcatgtat taggcacacc 480
gccggcggtt atctgagcc aggatcaaan tctaa 515

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> n is a, c, g, or t

53

7

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(46)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (521)..(521)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 4
accgnggggnn aacgacactg cgngnacagn ttactctcac gcacgnttct tctccaacaa 60

cagagcttta cgagccgaaa cccttcttca ctacgcgggt gttgtccat caggcttgcg 120

cccattgtgg aagattccct actgtgcct cccgtaggag tatggaccgt gtctcagttc 180

cattgtggcc gatcagttct tcaactcggc tatgcatcat cgccttggtta agccgttacc 240

ttaccaacta gctaattcac cgcaggtcca tcccagagtg atagccaaag ccatctttca 300

aacaaaagcc atgtggcttt tgttggtatg cgttattagc atctgtttcc aaatgttatc 360

ccccgtccg gggcaggtta cctacgtgtt actcaccgt cgcactca ctggtgatcc 420

atcgtcaatc aggtgcaagc accatcaatc agttgggcca gtgcgtacga cttgcatgta 480

ttaggcacac cgccggcggt catcctgagc caggatcaaa ntctaa 526

sl

<210> 5
 <211> 524
 <212> DNA
 <213> L.reuteri CECT 7260

<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> 5
 gcntggngga acggtcactg cggaacagtt actctcacgc acgttcttct ccaacaacag 60
 agctttacga gccgaaaccc ttcttcactc acgcgggtgtt gctccatcag gcttgcgccc 120
 attgtggaag attccctact gctgcctccc gtaggagtat ggaccgtgtc tcagttccat 180
 tgtggccgat cagtctctca actcggctat gcatcatcgc cttggtaagc cgttacctta 240
 ccaactagct aatgcaccgc aggtccatcc cagagtata gccaaagcca tctttcaaac 300
 aaaagccatg tggcttttgt tggtatgcgg tattagcatc tggttccaaa tggtatcccc 360
 cgctccgggg caggttacct acgtgttact caccgcgccg ccactcactg gtgatccatc 420

SS

gtcaatcagg tgcaagcacc atcaatcagt tgggccagtg cgtacgactt gcatgtatta 480
ggcacaccgc cggcgttcat cctgagncag gatcnaaact ctaa 524

<210> 6
<211> 519
<212> DNA
<213> L. plantarum CECT 7262

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 6
ggcctgggaa nccggtcata cctggaacag gttacctctc agatatgggtt cttctttaac 60
aacagagttt tacgagccga aacccttctt cactcacgcg gcgttgctcc atcagacttt 120
cgtccattgt ggaagattcc ctactgctgc ctcccgtagg agtttgggcc gtgtctcagt 180
cccaatgtgg ccgattaccc tctcaggtcg gctacgtatc attgccatgg tgagccgtta 240
cctcaccatc tagctaatac gccgcgggac catccaaaag tgatagccga agccatcttt 300
caaactcgga ccatgcggtc caagttgtta tgcggtatta gcatctgttt ccaggtgtta 360
tcccccgctt ctgggcaggt ttcccacgtg ttactcacca gttcgccact cactcaaagt 420
taattcatga tgcaagcacc aatcattacc agagttcggt cgacttgcac gtattaggca 480
cgccgccagc gttcgtcctg agacaggatc aaaactota 519

<210> 7
<211> 474
<212> DNA

56

10

<213> Enterococcus hirae EHG11

<400> 7

gacagttact ctcacacctg ttcttctcta acaacagagt ttacgatcc gaaaaccttc	60
ttcactcacg cggcggttgc cggtcagact ttcgccatt gccgaagatt ccctactgct	120
gcctcccgta ggagtttggg ccgtgtctca gtcccaatgt ggccgatcac cctctcaggt	180
cggctatgca tcgtcgctt ggtgagccgt tacctacca actagctaata gcaccgcggg	240
tccatccatc agcgacaccc gaaagcgct ttcaaataa aaccatgcgg ttctgattgt	300
tatacgggtat tagcacctgt ttccaagtgt tatcccttc tgatgggcag gttaccacg	360
tggtactcac ccgttcgcca ctctctttt tccggtggag caagctccgg tggaaaaaga	420
agcggtcgac ttgcatgtat taggcacgcc gccagcgctt gtcctgagcc aggt	474

<210> 8

<211> 469

<212> DNA

<213> Lactobacillus plantarum LG14:

<400> 8

ttactctcag atatgttctt ctttaacaac agagttttac gagccgaaac cttcttcac	60
tcacgcggcg ttgctccatc agactttcgt ccattgtgga agattcccta ctgctgcctc	120
ccgtaggagt ttgggccgtg tctcagtcac aatgtggccg attaccctct caggctcggt	180
acgtatcatt gccatggtga gccgttaccy caccatctag ctaatacgcc gcgggaccat	240
ccaaaagtga tagccgaagc catctttcaa gtcgggacca tgcggtccaa gttgttatgc	300
ggtattagca tctgtttcca ggtgttatcc cccgcttctg ggcaggtttc ccacgtgtta	360
ctcaccagtt cgccactcac tcaaataaa atcatgatgc aagcaccaat caataccaga	420

51

gttcgttoga cttgcatgta ttaggcacgc cgccagcggt cgtcctgag 469

<210> 9

<211> 493

<212> DNA

<213> Enterococcus faecalis EFG1:

<400> 9

ctatcatgca agtcgaacgc ttctttcctc ccgagtgcct gcactcaatt ggaaagagga 60

gtggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctaccatc agagggggat aacacttgga 120

aacaggtgct aataccgcat aacagtttat gccgcatggc ataagagtga aaggcgcttt 180

cggtgtgcgc tgatggatgg acccgcggtg cattagctag ttggtgaggt aacggctcac 240

caaggccacg atgcatagcc gacctgagag ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg 300

gcccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcgg caatggacga aagtctgacc 360

gagcaacgcc gcgtgagtga agaaggTTTT cggtatgtaa aactctgttg ttagagaaga 420

acaaggacgt tagtaactga acgtcccctg acggtatcta accagaaagc cacggctaac 480

tacgtgcca gca 493

<210> 10

<211> 524

<212> DNA

<213> Lactobacillus salivarius CELA200:

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

56

12

<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

<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 cacctcgctg nttcttcctc 60

taacaacaga gcttttacga ctccgaagga ccttcttcac atcacgcggc gtntgctcca 120

tcagacttgc gtccattgtg gaagattccc tactgctgcc tcccgtagga gtttgggccg 180

tgtctcagtc ccaatgtggc cgatcaacct ctgagattcg gctacgtatc atcaccttgg 240

taggccgtta cccaccaac tagttaatac gccgcgggtc catctaaaag cgatagnaga 300

51

accatctttc atctaaggat catgcgatcc ttagagatat acggnattag cacctgtttc 360
caagtgttat ccccttcttt taggcagggt acccacgtgt tactcaccog tccgccactc 420
aacttcttac ggtgaatgca agcattcggg gtaagaaagt ttcgttcgac ttgcatgtat 480
taggcacgcc gccagcggtc gtnatgagcc aggatcaaac tcta 524

<210> 11
<211> 524
<212> DNA
<213> Lactobacillus reuteri PDA3:

<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
gcntgggnga acggtcactg cggaacagtt actctcacgc acgttcttct ccaacaacag 60
agctttacga gccgaaaccc ttcttcactc acgcgggtgtt gctccatcag gcttgcgccc 120

attgtggaag attccctact gctgcctccc gtaggagtat ggaccgtgtc tcagttccat	180
tgtggccgat cagtctctca actcggctat gcatcatcgc cttggtaagc cgttacctta	240
ccaactagct aatgcaccgc aggtccatcc cagagtgata gccaaagcca tctttcaaac	300
aaaagccatg tggcttttgt tggtatgcgg tattagcatc tgtttccaaa tggtatcccc	360
cgctccgggg caggttacct acgtgttact caccggtcgc cactcactg gtgatccatc	420
gtcaatcagg tgcaagcacc atcaatcagt tgggccagtg cgtacgactt gcatgtatta	480
ggcacaccgc cggcgttcat cctgagncag gatcnaaact ctaa	524

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

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un enfoque novedoso para
prevenir o tratar la mastitis tanto en seres humanos como en
animales a través del uso de microorganismos derivados de la
leche de mamífero obtenidos a partir de huéspedes sanos de las
especies homólogas; a los nuevos microorganismos probióticos
10 obtenidos a partir de la leche que pueden reducir la mastitis
infecciosa; al uso de estas bacterias probióticas para la
profilaxis o tratamiento contra la mastitis y otras
enfermedades; y finalmente, a composiciones que comprenden estos
compuestos.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La mastitis es una inflamación e infección de la glándula
mamaria que es particularmente frecuente en mujeres y otras
hembras de mamífero durante la lactancia. La mastitis está
20 producida principalmente por la selección y crecimiento excesivo
de estafilococos y/o estreptococos en los conductos mamarios y
glándulas de la areola mamaria. La mastitis humana afecta hasta
al 30% de mujeres en la lactancia y con frecuencia conduce a un
destete precoz e indeseado debido a que es un estado muy
25 doloroso.

Además, la mastitis no es una patología específica de los
seres humanos, sino que afecta a todas las especies de
mamíferos. En este sentido, la mastitis infecciosa en especies
animales y razas criadas para la producción de leche, tales como
30 vacas, ovejas o cabras, es un importante problema económico ya
que la leche producida durante el proceso infeccioso debe
desecharse debido a los altos recuentos de células somáticas y
bacterianas. Además, la mastitis puede ser un problema
importante en aquellas especies domésticas (cerdos, conejos...) y
35 razas (por ejemplo, bovina para la producción de carne) no
dedicadas a la producción de leche ya que un suministro de leche

reducido de baja calidad bacteriológica puede aumentar notablemente las tasas de morbilidad entre las crías.

En estos casos, el tratamiento basado en antibióticos ha surgido como la única opción terapéutica. Sin embargo, los antibióticos dirigidos a bacterias Gram-positivas o de amplio espectro son escasamente eficaces para las cepas de estafilococos y estreptococos que producen la mastitis, y, de hecho, tales tratamientos pueden ser, en algunas circunstancias, perjudiciales debido a que eliminan normalmente la flora comensal que caracteriza la leche de mamífero, que ejercería algunos efectos protectores. Además, el tratamiento con antibióticos puede dar como resultado la aparición de residuos de antibióticos en la leche, que también es perjudicial si se produce durante el periodo de la lactancia. Alternativamente, se ha usado también GM-CSF bovino recombinante para el tratamiento de la mastitis subclínica producida por *S. aureus* (Takahashi, H. et al. 2004, Cad.J.Vet.Res. 68:182-187) pero no probó ser eficaz en el tratamiento de la infección por *S. aureus* de fase tardía.

Un enfoque alternativo para el tratamiento de la mastitis es el uso de probióticos. Por ejemplo Sytnik, S.I. et al. (Vrach Delo., 1990, 3:98-100) intentaron usar *Bifidobacterium* para prevenir la mastitis pero no observaron nada de inhibición en el tiempo de permanencia de la microflora de las mamas. Greene, W.A. et al. (J. Dairy Sci., 1991, 74:2976-2981) describieron el uso de una preparación de lactobacilo comercial para el tratamiento del recuento elevado de células somáticas (SSC) cuando se administra mediante inyección intramamaria directa pero concluyen que el producto de *Lactobacillus* usado en el ensayo no era eficaz como tratamiento intramamario de la mastitis subclínica basada en SCC. La patente estadounidense US4591499 describe un método para tratar la mastitis usando una inyección intramamaria de una emulsión de aceite en agua que contiene una cepa o una mezcla de cepas de lactobacilos no patógenos. Sin embargo, las cepas descritas en este documento parecen actuar por medio de una disminución no específica en el pH de la glándula mamaria y, debido a su formulación particular

3

como emulsiones, es necesario administrarlas mediante inyección intramamaria directa. La patente rusa RU2134583 describe el uso de una composición tópica que contiene lactobacterin (masa microbiana de lactobacterias que se han liofilizado/secado vivas en medio de cultivo) o bifidobacterin (una biopreparación liofilizada inmovilizada sobre carbón activado especial) para el tratamiento de la diseminación microbiana masiva de la leche materna. Sin embargo, esta preparación es sólo adecuada para la administración tópica y forma parte de un tratamiento de múltiples etapas que incluye masajes de relajación y la aplicación de una suspensión de microorganismos derivados de la microflora normal del intestino que contiene adicionalmente un medio formador de una película protectora. La solicitud de patente internacional W005/34970 describe el tratamiento de la mastitis mediante inyección intramamaria directa de una cepa de *Lactococcus lactis*.

Por tanto, toda la técnica anterior descrita previamente se refiere al uso de cepas probióticas mediante o bien inyección intramamaria o bien aplicación tópica. Así, existe un deseo en la técnica de enfoques adicionales que permitan la prevención y el tratamiento de la mastitis y otras patologías de las glándulas mamarias, en mujeres y en otras hembras de mamífero, que puedan aplicarse más fácilmente y a través de medios menos invasivos.

25

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención en el hallazgo sorprendente e inesperado de que la leche de mamífero contiene cepas probióticas que pueden transferirse a las glándulas mamarias tras su ingestión oral, y ejercen un efecto terapéutico localmente contra los patógenos que producen la mastitis, ayudando así a reducir la incidencia de mastitis. Además, estas cepas tienen varias propiedades ventajosas inesperadas adicionales que las hacen útiles para el tratamiento de otras enfermedades. La presente invención es ventajosa con respecto a los métodos conocidos en la técnica en vista de las propiedades

64

valiosas que puede proporcionar la lactancia, y debido al interés económico de la productividad láctea para los ganaderos.

En un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la selección de probióticos que comprende las
5 etapas de:

- (i) aislar las cepas de bifidobacterias o bacterias del ácido láctico presentes en la leche fresca de una especie de mamífero mediante la selección en medios de cultivo de ácido láctico,
- 10 (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
15 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
20 mastitis.

En otro aspecto, la invención proporciona cepas probióticas que pueden obtenerse mediante el procedimiento de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un sobrenadante de un cultivo de una cepa o de una mezcla de cepas según la
25 invención.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición, un producto farmacéutico, una alimentación o un producto nutricional que comprende al menos una cepa probiótica de la invención o un sobrenadante de un cultivo de una o más
30 cepas de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de las cepas probióticas de la invención o el sobrenadante de cultivo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de una infestación o infección aguda o crónica, o de
35 una colonización microbiana no deseada, en el que la infección, infestación o colonización está producida por parásitos,

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

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una cepa probiótica o de una mezcla de cepas probióticas de la invención o el sobrenadante de cultivo 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 la EII (enfermedad inflamatoria del intestino), colitis ulcerosa, artritis, aterosclerosis, esclerosis múltiple, psoriasis o sarcoidosis; y del crecimiento tumoral, la metástasis y el cáncer en un sujeto o animal que lo necesite.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una cepa probiótica o de una mezcla de cepas probióticas o el sobrenadante de cultivo de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de trastornos alérgicos y asma en un sujeto o animal que lo necesite.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una cepa probiótica o de una mezcla de cepas probióticas o el sobrenadante de cultivo de la invención 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.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 proporciona las secuencias de las secuencias de ARNr de 16S de las bacterias de las cepas probióticas incluidas en esta invención y su perfil de PCR-RADP.

La figura 2 es un gráfico de barras que muestra la capacidad de transferencia a la glándula mamaria de y la colonización del intestino por las cepas de la presente

66

invención en ratones. El número de lactobacilos (barras grises), bifidobacterias (barras negras) y enterococos (barras blancas) en las muestras fecales y de leche extraída en ratones lactantes con aporte complementario diario durante 14 días con 10^8 ufc de las cepas marcadas genéticamente se analizó mediante cultivo en placas de colonias bacterianas. Las muestras de leche y fecales se recogieron el día 0, 5 y 10 de aporte complementario probiótico. Las colonias positivas para la PCR en leche se indican como %. La figura 3 es un gráfico de barras que muestra la inhibición de la adhesión y la supervivencia de los estafilococos producidas tras el cocultivo de los estafilococos con las cepas incluidas en esta invención. A) Se evaluó el efecto inhibidor de los probióticos incluidos en esta invención sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus in vitro* mediante un ensayo de difusión en pocillos de agar en placas de TSA. El diámetro del halo de inhibición (en milímetros) producido por los sobrenadantes bacterianos determina el efecto antimicrobiano. B) Se evaluó la adhesión de la cepa de *Staphylococcus aureus* patógena a células Caco-2 en presencia de las cepas probióticas de esta invención. Se contaron diez campos aleatorizados y se expresaron los resultados como la media del % de bacterias Gram-negativas adheridas unidas a las células en comparación con el número de bacterias patógenas adheridas en ausencia de probióticos.

La figura 4 es un gráfico de barras que muestra la protección frente a la mastitis estafilocócica. Se indujo mastitis en ratones lactantes 10 días después del parto mediante inyección de 10^6 ufc de *S. aureus* en el cuarto par mamario. Se evaluó la carga estafilocócica en la leche extraída (A) y la puntuación mamaria inflamatoria (B) tras 5 y 10 días de infección.

La figura 5 es un gráfico de barras que muestra la adhesión de las cepas probióticas a las células intestinales. Se evaluó la adhesión de las cepas probióticas de esta invención usando líneas de células intestinales HT-29 (barras negras) o Caco-2 (barras grises). Se contaron veinte campos aleatorizados y se

67

expresaron los resultados como la media del número de bacterias unidas a las células por campo $\pm$ DE.

La figura 6 es un gráfico de barras que muestra la supervivencia de las cepas probióticas frente a condiciones semejantes a la digestión. Se evaluó la resistencia de las cepas probióticas de esta invención frente a un alto contenido en sales biliares (barras negras) y ácido (barras grises) *in vitro* mediante el cultivo de las bacterias en MRS pH 3,0 o sales biliares al 0,15% durante 90 minutos. Los resultados se representan como la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

La figura 7 muestra el efecto de las cepas probióticas sobre un modelo de infección por *Salmonella* inducida por vía oral. A) Gráfico de barras que muestra el efecto del tratamiento probiótico en la inhibición de la traslocación de *Salmonella* al bazo. Se midió el número de colonias de *Salmonella* en los bazos de ratones tratados con los probióticos, con vacunación (barras grises) o sin ella (barras negras) con 10^8 ufc de *Salmonella* inactivada, tras 24 horas de una exposición oral con 10^{10} ufc de *Salmonella*. B) Curvas de supervivencia de los animales tras la infección por *Salmonella*.

La figura 8 es un gráfico de barras que muestra el efecto de las cepas probióticas sobre la expresión de inmunoglobulina G y citocinas. Se analizó la producción de las citocinas TNF- α (A) e IL-10 (B) en macrófagos derivados de la médula ósea estimulados con LPS y la cepa probiótica indicada durante 12 horas mientras se analizó la expresión de IgG (C) en linfocitos obtenidos del bazo de ratones Balb/c (de 6-8 semanas de edad) estimulados con LPS y la cepa probiótica indicada durante 6 días. Se detectó la producción tanto de citocinas como de IgG mediante ELISA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención proporciona un nuevo método para el tratamiento terapéutico y profiláctico de la mastitis infecciosa tanto en mujeres como en otras hembras de mamífero que lo

68

necesitan. El método se basa en el uso de cepas probióticas específicas seleccionadas especialmente para esa aplicación en particular.

En un primer aspecto, la invención proporciona un 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.

En la etapa (i), puede usarse cualquier leche obtenida a partir de un organismo mamífero como material de partida para el procedimiento de la invención. En una realización preferida, la leche usada es leche humana, bovina, porcina, de oveja, de gato o canina. Además, puede usarse cualquier medio de cultivo de ácido láctico conocido en la técnica para seleccionar las cepas. Preferiblemente, el medio de cultivo de ácido láctico se selecciona de medio MRS, medio APT, medio RCM, medio LM17, medio GM17 y medio Elliker. Lo más preferiblemente, el medio de cultivo de ácido láctico es medio MRS.

En la etapa (ii), las cepas aisladas en la etapa (i) se seleccionan basándose en su capacidad para transferirse a la glándula mamaria tras la ingestión oral y/o colonizar la glándula mamaria tras la aplicación tópica. Para detectar la capacidad para transferirse a la glándula mamaria, puede

69

utilizarse un ensayo tal como se describe en el documento WO2004003235 para detectar la transferencia de un microorganismo a la leche tras la ingestión oral.

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* CELA200, *Enterococcus hirae* EHG11, *Enterococcus faecalis* EFG1, 5 *Lactobacillus plantarum* LG14, *Lactobacillus reuteri* PDA3. En un 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 10 centrifugación, filtración, flotación y similares.

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.

15 En otro aspecto, la invención proporciona una composición 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 20 representada en la composición en una proporción de desde el 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 25 cepas y en la que cada una de las cepas está representada en la 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 30 cultivo de una o más de las cepas según la invención. 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%.

35 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

42✓

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,

73

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.

5 En el caso de una composición farmacéutica, la dosificación 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
10 preferiblemente desde aproximadamente 10^7 ufc/g hasta 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
15 microbiológicos sobre placas de agar.

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
20 general del sujeto, la edad, peso y sexo del sujeto, tiempo y 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
25 la semivida y la tasa de aclaramiento de la formulación en 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
30 pueden obtenerse mediante cualquier método convencional conocido 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
35 parcial o totalmente inactivada.

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 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 *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 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 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 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 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

25

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

5 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

10 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

15 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

20 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

25 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,

30 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

35 autoinmunitarias e inflamatorias de este tipo incluyen EII,

76

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
5 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
10 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.

15 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
20 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
25 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
30 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.

35 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de las cepas, composiciones y sobrenadante de la invención en la

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.

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.

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, 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.

Los siguientes métodos y ejemplos ilustran la invención.

EJEMPLOS

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

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 mujeres ni los animales tuvieron complicaciones durante el parto y no se administró ningún tratamiento con antibióticos en las 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 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 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.

Estos 68 aislados seleccionados se caracterizaron adicionalmente tanto fenotípica (API CH50, APIZYM 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 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 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.

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

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

15

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 (BioMerieux) 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:

35

- *Bifidobacterium breve* CECT7263



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

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

- 10 • *Lactobacillus salivarius* CELA200
- *Enterococcus hirae* EHG11
- *Enterococcus faecalis* EFG1
- *Lactobacillus plantarum* LG14
- *Lactobacillus reuteri* PDA3

81

Tabla I: Patrón de fermentación de las diferentes cepas probióticas de la invención Los sustratos fermentables positivos se indican en gris.

TEST	T263	T264	T260	T262	T265	T266	PDA3	LG14	CELA200	EBG1	EHG11
Glicerol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eritritol	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
D-Ambinosa	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	5
L-Ambinosa	0	0	0	5	0	5	5	5	0	1	0
Ribosa	5	0	0	5	5	5	5	5	4	0	0
D-Xilosa	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
L-Xilosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5
Adonitol	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	5
β-Metil-glucosido	0	0	0	0	0	5	5	0	0	5	5
Galactosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
D-Glucosa	5	5	5	5	5	5	0	5	5	0	0
D-Fructosa	5	5	0	5	5	0	5	5	5	0	0
D-Manosa	1	0	0	5	5	0	0	5	5	0	0
L-Sorbose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Ramnosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Dulcitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inositol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Manitol	4	0	0	5	5	0	4	5	5	5	5
Sorbitol	5	0	0	5	0	0	0	5	5	5	5
α-Metil-D-mannosido	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
α-Metil-D-glucosido	2	0	0	0	5	0	5	0	0	5	5
N-Acetil glucosamina	2	1	0	5	5	0	5	5	5	5	5
Amigdalina	0	1	0	5	0	0	5	5	0	5	5
Arbutina	0	0	0	5	0	0	5	5	4	5	5
Esculina	5	5	0	5	0	0	0	5	5	5	5
Salicina	1	0	0	5	0	0	5	5	0	0	5
Celobiosa	5	0	0	5	0	0	5	5	4	5	5
Maltosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Lactosa	5	0	5	5	5	5	5	5	5	0	0
Melibiosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0
Sacarosa	5	0	5	0	5	5	5	0	5	0	0
Trehalosa	0	0	0	5	0	0	0	5	5	1	5
Inulina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Melecitosa	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
D-Rafinosa	5	0	5	5	5	5	0	5	5	0	0
Amidon	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucógeno	5	4	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Xilitol	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
β-Gentiobiosa	0	2	0	5	0	0	0	5	0	0	0
D-Turanosa	5	4	0	5	0	0	0	5	0	0	0
D-Licosa	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
D-Tagatosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
D-Fucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
L-Fucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Arabitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Arabitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gluconato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 ceto-gluconato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 ceto-gluconato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

5

Ejemplo 3: Selección selectiva de las cepas

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

genéticamente tal como se describió previamente (documento WO 2004/003235) y se administraron por vía oral a ratas preñadas como modelo animal. Se midieron los lactobacilos, bifidobacterias y enterococos totales en muestras fecales neonatales y de leche. Además, la transferencia específica de bacterias se analizó mediante selección por PCR de las colonias obtenidas a partir de la leche de ratas en periodo de lactancia y de heces neonatales.

Se inocularon por vía oral a cuatro ratas Wistar preñadas 10^8 ufc de cepas marcadas genéticamente en un vehículo de 0,5 ml de leche cada dos días a partir de dos semanas antes del parto. Tras el parto, se analizó la transferencia de bacterias marcadas genéticamente a la leche materna mediante comparación de las bacterias aisladas de las heces neonatales en el día 0, 5 y 10 tras el parto. Se incubaron todas las placas durante 24 horas a 37°C en condiciones anaerobias. Por cada muestra obtenida se midieron los recuentos de lactobacilos, bifidobacterias y enterococos totales. Entre las colonias que crecieron sobre placas de MRS, se seleccionaron aleatoriamente 50 de cada muestra y se subcultivaron sobre placas de Cm-MRS. Finalmente, las colonias resistentes a Cm se usaron como plantillas para detectar las colonias con marcado genético específico (figura 2). La transferencia se consideró positiva cuando al menos el 1% de las colonias obtenidas eran positivas para PCR.

25

Ejemplo 3b: Inhibición de la supervivencia de *Staphylococcus aureus*

Se evaluaron las cepas probióticas de esta invención para determinar su capacidad para producir metabolitos bactericidas que pueden reducir la supervivencia de *Staphylococcus aureus* usando en ensayo de difusión en pocillos de agar. Se prepararon placas de agar TSA que contenían 10^6 ufc/ml de *S. aureus*. Se cortaron pocillos con un diámetro de 5 mm en el agar usando un sacabocados estéril. Luego, se añadieron 50 μl de un sobrenadante concentrado 2 veces de cada disolución de cepa probiótica a los pocillos y se dejó difundir en el agar durante

un periodo de preincubación de 2 horas a 4°C, seguido de incubación aerobia de las placas a 37°C durante 16-18 horas. Tras el periodo de incubación, se observó un halo de inhibición y se midió (en milímetros) para evaluar el efecto bactericida de los candidatos probióticos (figura 3A).

Ejemplo 3c: Inhibición de la adhesión de *Staphylococcus aureus* a las células epiteliales

Se cultivaron líneas de células intestinales Caco-2 hasta confluencia en placas de plástico de 35 mm que contenían 2 ml de medio sin antibióticos. En el día 10-14 posterior a la confluencia, se sustituyó 1 ml del medio por 1 ml de una suspensión de 10^8 bacterias probióticas en DMEM. Se incubaron los cultivos durante 1 hora a 37°C. Después de esto, se añadió 1 ml de una suspensión de 10^8 bacterias patógenas (*S. aureus*) en DMEM a los cultivos y se incubó durante 1 hora más a 37°C. Se lavaron las células dos veces con PBS y se fijaron con metanol al 70% enfriado con hielo durante 30 minutos. Se secaron con aire las placas y se realizó tinción de Gram. Las bacterias unidas se visualizaron usando un microscopio óptico Axiovert 200 (Zeiss) a aumento de 1000x en inmersión en aceite. Se contó el número de bacterias Gram-negativas en 10 campos aleatorizados y los resultados se expresaron como la media del % de bacterias patógenas unidas a las células en comparación con los cultivos control sin cepas probióticas (figura 3B).

Ejemplo 3d: Protección frente a la mastitis

Para evaluar la eficacia de los candidatos probióticos para proteger frente a la mastitis, se usó un modelo de ratones de esta patología. En resumen, se administró un aporte complementario a 10 ratas Wistar preñadas por grupo diariamente mediante sonda nasogástrica de 10^8 ufc/día de cada cepa probiótica en un vehículo de 200 µl de leche durante dos semanas después del parto. Una semana tras el parto, se indujo la infección de mastitis en los animales mediante la inyección de 10^6 ufc de *S. aureus* en el cuarto par de glándulas mamarias. Se

gel

recogió la leche extraída los días 0, 5 y 10 posteriores a la infección para medir la carga bacteriana (figura 4A); y se sacrificaron 5 animales de cada grupo los días 5 y 10 posteriores a la infección con el fin de obtener biopsias de glándulas mamarias para evaluar el proceso inflamatorio mediante examen histológico.

Se fijaron las glándulas enteras en formalina al 5% y se deshidrataron con alcohol, y finalmente se incluyeron en parafina. Se tiñeron los cortes de tejido con hematoxilina-eosina y se examinaron de un modo ciego (figura 4B). Para evaluar cualitativamente las alteraciones de la histología de la glándula mamaria, se determinó un valor (IIV) del índice inflamatorio de la siguiente forma:

- Puntuación 0: Sin infiltración
- 15 - Puntuación 1: Infiltración intersticial leve de células PMN en zonas aisladas de secciones de tejido, epitelio tubular no dañado
- Puntuación 2: Infiltración intersticial cubriendo la mayoría de los campos, zonas dispersas de daño tisular con pérdida de estructura tisular, y escasas imágenes de formación de abscesos
- 20 - Puntuación 3: Infiltración severa cubriendo la mayoría de los campos, zonas frecuentes de daño tisular con pérdida de de la arquitectura tisular, e imágenes frecuentes de formación de abscesos.
- 25

Ejemplo 4: Potencial probiótico de las cepas

30 Las cepas seleccionadas se analizaron adicionalmente para determinar diferentes características que podrían potenciar sus capacidades para actuar como cepas probióticas. Los resultados obtenidos se describen en los ejemplos indicados.

35 Ejemplo 4a: Adhesión a células Caco-2 y HT-29

45

Para los ensayos de adhesión se usaron las líneas celulares Caco-2 (ATCC HTB-37) y HT-29 (ATCC HTB-38) como modelo de las células intestinales. Ambas líneas celulares presentaban propiedades características de las células intestinales tales como la polarización, expresión de enzimas intestinales, producción de polipéptidos estructurales particulares y mucinas.

Se hicieron crecer las células en frascos de plástico (75 cm², Nunc) en DMEM como medio de cultivo complementado con STF inactivado al 10%, aminoácidos no esenciales, penicilina/estreptomicina 100 U/ml, anfotericina 1 µg/ml. El cultivo se realizó a 37°C en una atmósfera que comprendía aire al 95% y CO₂ al 5%. El medio se cambió dos veces al día y las células se dividieron cada semana.

Las líneas de células intestinales Caco-2 y HT-29 se dividieron en placas de plástico de 35 mm en 2 ml de medio sin antibióticos hasta confluencia. En los días 10-14 posteriores a la confluencia, se sustituyó 1 ml del medio por 1 ml de una suspensión de 10⁸ bacterias en DMEM (PAA). Se incubaron los cultivos durante 1 hora a 37°C. Después de esto, se lavaron las células dos veces con PBS y se fijaron con metanol al 70% enfriado en hielo durante 30 minutos. Las placas se secaron con aire y se realizó tinción de Gram. Las bacterias unidas se visualizaron usando un microcopio óptico Axiovert 200 (Zeiss) a aumento de 1000x en inmersión en aceite. Se contaron veinte campos aleatorizados y los resultados se expresaron como la media del número de bacterias unidas a las células por campo ± DE (figura 5)

Ejemplo 4b: Resistencia a las sales biliares y ácido

Para analizar la resistencia de las cepas probióticas de esta invención al contenido en sales biliares alto y ácido, condiciones que se encontrarán estas bacterias durante el tránsito digestivo, se cultivaron bacterias en medio de caldo MRS a pH 3,0 o con un 2% de sales biliares (Sigma) durante 90 minutos. Se calculó la supervivencia mediante siembra en placas de agar MRS de diluciones seriadas y se comparó con el número de

colonias obtenidas en las condiciones control (caldo MRS, pH 5,8). Se cultivaron las placas durante 24 horas a 36°C en condiciones anaerobias extremas. El experimento se repitió tres veces (figura 6).

5

Ejemplo 4c: Resistencia a antibióticos

El uso de antibióticos modernos conduce a una reducción de la microflora intestinal comensal que algunas veces se relaciona con diarrea y otros trastornos intestinales. Además, esta
10 reducción de la cantidad de bacterias intestinales podría ser la consecuencia de bacterias patógenas oportunistas y virus para infectar al huésped. El uso de antibióticos para bloquear la infección no soluciona este trastorno sino que lo complica. En otras situaciones como inflamación intestinal, en la que los
15 probióticos podrían ejercer un papel beneficioso, este posible efecto está limitado algunas veces por el tratamiento simultáneo con antibióticos. Por todas estas razones, la selección de posibles cepas probióticas que pueden resistir a antibióticos comunes debe ser claramente interesante.

20 Para analizar la resistencia de las cepas probióticas de esta invención, se usó un ensayo de difusión en pocillos de agar. Se prepararon placas de agar Mueller-Hinton que contenían 10^6 ufc/ml de cada cepa probiótica. Luego se añadieron discos comerciales con antibióticos a los pocillos y se les permitió
25 difundir en el agar durante un periodo de preincubación de 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de incubación anaerobia extrema de las placas a 36°C durante 16-18 horas.

La resistencia a antibióticos de las cepas probióticas de esta invención se resume en la tabla II.

30

Tabla II: Resistencia a antibióticos de las diferentes cepas probióticas de la invención

88

	7263	7264	7260	7262	7265	7266	PDA3	LG14	CELA200	EFG1	EHG11
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
Eritromicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Clindamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Tetraciclina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Vancomicina	S	S	R	R	R	R	R	R	R	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	R

Ejemplo 4d: Producción de metabolitos antimicrobianos

Se ha sugerido que el mecanismo principal usado por las
5 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
podrían crecer excesivamente y alterar el bienestar del huésped
o incluso inducir una infección. La mayoría de los organismos
10 bacterianos han adquirido características o mecanismos que
reducen las capacidades de crecimiento de otros microorganismos
que cohabitan con ellos y así, permitir su crecimiento
selectivo. La reducción de pH a través de la producción de ácido
por bacterias del ácido láctico es uno de tales mecanismos.
15 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,
levaduras u hongos. Este es el caso de reuterina (un aldehído) o
bacteriocinas (péptidos, tales como nisina o pediocina PA-1).
20 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
placas de agar TSA que contenían 10⁶ ufc/ml de diferente cepa de
bacterias patógenas y se sometieron a ensayo tal como se indicó
25 previamente en el ejemplo 3b para *S. aureus*. Los resultados
obtenidos se describieron en la tabla III.

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

88

	PDA3	LG14	CELA20 0	EFG1	EHG11	7263	7264	7260	7262	7265	7266
<i>E. faecium</i> P21	+	+	+	-	-	+++	+++	+	+	+++	+++
<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> RJM1	+++	+++	+++	+	+	+	+++	++	+++	+++	+/-
<i>S. enteritidis</i> 4396	+++	+++	+++	++	++	+/-	++	++	+++	+++	++
<i>K. pneumoniae</i> CECT142	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+	+++	++
<i>K. oxytoca</i> CECT860T	+/-	+	+++	++	++	+++	+++	+/-	+/-	+/-	++
<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

a *S. typhimurium* viva (10^{10} ufc en 0,2 ml de leche). Luego, tras 24-48 horas, se determinó el nivel de colonización de *S. typhimurium* en el bazo en la mitad de los animales. Se siguió al resto de los animales durante dos semanas adicionales con el fin de evaluar la supervivencia de los animales tras la infección por *Salmonella*.

Los resultados obtenidos demuestran que la mayoría de las sustancias probióticas sometidas a prueba potencian el efecto beneficioso de la vacunación de ratones con la vacuna de *Salmonella* inactivada tal como se muestra en la figura 7.

Ejemplo 6: Efecto de *L. plantarum* CECT7262 o *L. reuteri* CECT7260 sobre la prevención de la diarrea neonatal en lechones recién nacidos.

El destete de lechones a las 3-4 semanas de edad está correlacionado con una tasa de mortalidad alta en aquellos animales, debido principalmente a un aumento en la incidencia de infecciones diarreicas. Probablemente, esta alta mortalidad se relaciona con una regulación por disminución de sus defensas debido a la modificación estresante de su estado de tratamiento médico y nutricional y con cambios en la composición de su microbiota intestinal.

Por esta razón, los ganaderos han intentado solucionar este problema con el uso de varios enfoques tales como el uso de antibióticos, componentes protectores de la mucosa o estimulantes inmunitarios, tales como colistina o ZnO. Sin embargo, la prohibición de la UE del uso de antibióticos para la producción animal en 2006 ha agravado la situación. Por esta razón, el uso de sustancias probióticas que pueden modular la microbiota intestinal y la respuesta inmunitaria aparece como una posible alternativa.

Se comparó el efecto de la administración de 3×10^9 ufc/día de *L. reuteri* CECT7260 y *L. plantarum* CECT7262 frente a la administración de una formulación de alimentación animal que contenía 3000 ppm de ZnO y 40 ppm de colistina en dos grupos de

48 y 45 cerdos destetados, respectivamente, durante un periodo de 34 días.

En ambos grupos, ninguno de los animales padeció diarrea ni murió durante el estudio, y la evolución del peso corporal fue también similar entre ambos tratamientos, sugiriendo que una formulación de alimentación animal complementada con estos probióticos es, al menos, tan buena como las que contenían sustancias probióticas convencionales y moduladores inmunitarios.

10

Ejemplo 7: Efecto de las bacterias probióticas sobre la producción de citocinas inflamatorias e IgG

Aparte de la reducción del riesgo de infección, muchos efectos clínicos asociados a tratamientos probióticos se deben a las capacidades inmunomoduladoras de las cepas probióticas seleccionadas. La regulación de la respuesta inmunitaria está mediada normalmente a través de un cambio en el equilibrio entre citocinas proinflamatorias (Th1) tales como TNF- α , citocinas humorales (Th2) tales como IL-4 o IL-13, y citocinas reguladoras (Th3) tales como IL-10 y TGF- β . Además, el sesgo en la respuesta inmunitaria modulará también la secreción de inmunoglobulinas durante la respuesta humoral posterior. Por esta razón, también se ha sometido a prueba el efecto de algunas de las cepas probióticas de esta invención para regular la expresión de algunas de estas IgG y citocinas clave.

Se han usado macrófagos derivados de la médula ósea estimulados con LPS 100 ng/ml (Sigma) como modelo celular. Se cultivaron 10^5 macrófagos/pocillo en placas de plástico de 24 pocillos (Nunc) con 1 ml de DMEM. Una vez unidos, se estimularon los macrófagos o no con LPS 100 ng/ml y con 10^7 ufc/ml de las cepas probióticas indicadas durante 12 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Se recogieron los sobrenadantes y se analizó la producción de citocinas usando un ELISA (Biosource) de TNF- α de ratón o IL-10 de ratón. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 8A y B.

pl

Se realizó el análisis del efecto de las cepas probióticas de esta invención sobre la producción de inmunoglobulinas usando cultivos de linfocitos obtenidos del bazo de ratones Balb/c macho (de 6-8 semanas de edad). Se cultivaron 2×10^6 linfocitos en 1 ml de DMEM en placas de plástico de 24 pocillos y se estimularon con cultivos probióticos inactivados (10^8 ufc/ml) en presencia o ausencia de LPS 25 μ g/ml durante 6 días. Se evaluó la producción de IgG por los linfocitos usando un ELISA para IgG de ratón de Bethyl (figura 8C).

92

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 pueden 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* EHG11, *Lactobacillus plantarum* LG14, *Enterococcus faecalis* EFG1, *Lactobacillus salivarius* CELA200, *Lactobacillus reuteri* PDA3.

93

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
5 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
10 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
15 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
20 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,
25 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.
- 30 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
35 reivindicación 5, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de reacciones de hipersensibilidad frente a alimentos e intolerancia

Ged

- 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.
- 5
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.
- 10
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.
- 15
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.
- 20
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.
- 25

05

***Bifidobacterium breve* (CECT under Accession N° 7263)**

TCGNGTNNGAAGNACAATAAACACNTAAGTGCCTTGCTCCCTAACAAAAGA
GGTTTACAACCCGCAAGGCCTCCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAG
GCTTGCGCCCATTTGATGCAATATTTCCCAANTGCTGCCTCCCGATANGAGT
CTGGGCCGTATCTCAGTCCCAATGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGC
TACCCGTCGAAGCCATGGTGGGCCGTTACCCCGCCATCAAGCTGATAGGA
CGCGACCCCATCCCATGCCGCAAAGGCTTTCCCAACACACCATGCGGTGT
GATGGAGCATCCGGCATTACCACCCGTTTCCAGGAGCTATTCCGGTGCAT
GGGGCAGGTCGGTCACGCATTACTACCCGTTCCGCACTCTCACCACCAG
GCAAAGCCCGATGGATCCCGTTGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCA
GCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTAA

***Bifidobacterium breve* (CECT under Accession N° 7264)**

TNCGCGANGAAGAAATAAAACAAAGTGCCTTGCTCCTAACAAAAGAGGTT
TACAACCCGAANGCCTCCATNCCTCACGNNGNGTCNCATGCATCAGGCTT
GCGCCCATTTGTGNAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTANGAGTCTGGGC
CGTATCTNANTCCCAATGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGT
CGAAGCCATGGTGGGCCGTTACCCCGCCATCAAGCTGATAGGACGCGAC
CCCATCCCATGCCGCAAAGGCTTTCCCAACACACCATGCGGTGTGATGGA
GCATCCGGCATTACCACCCGTTTGCAGGAGCTATTCCGGTGCATGGGGCA
GGTCNGTNACGCATTACTNACCCGTTCCGCACTCTCACCACCAGGCAAAG
CCCGATGGATCCCGTTGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCNGCGTTC
ATCCNNAACAGGATCAAACCTCTAA

***Lactobacillus reuteri* (CECT under Accession N° 7260)**

GCNTGGGNGAACGGTCACTGCGGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACA
GAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGC
CCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTTC
CATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGTAAGCCGTTAC
CTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTT
CAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTT
ATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTACCCGTCCGCCACTCACTGGTG
ATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACTTGC
ATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGNCAGGATCNAACTCTAA

***Lactobacillus plantarum* (CECT under Accession N° 7262)**

GGCCTGGGAANCCGGTCATACCTGGAACAGGTTACCTCTCAGATATGGTTCTTCTTTAA
CAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACT
TTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTC
AGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCC
GTTACCTCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCA
TCTTTCAAACCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAG
GTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCACGTGTTACTCACCAGTTCGCCACTCAC
TCAAATGTAATTCATGATGCAAGCACCATCATTACCAGAGTTCGTTTCGACTTGCATGT
ATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGACAGGATCAAACCTCTA

Figura 1A

***Lactobacillus fermentum* (CECT under Accession N° 7265)**

TACACGATATGAACAGNTTACCTCTCATACGGTGNTTCTTCTTTAACAACAGAGCTTTA
 CGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCCATTGTG
 GAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTGTGG
 CCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAGGCCGTTACCCACCAA
 CAAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAGCGT
 TGTTTCATGCGAACAACGNTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTGTCCCC
 GCTTCTGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCGTTGGCGACCAAAA
 TCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAATTGGGCCAACGCGTTCGACTTGCATGTATTA
 GGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAANTCTAA

***Lactobacillus reuteri* (CECT under Accession N° 7266)**

ACCGNGGGNNAACGACACTGCGNGNACAGNTTACTCTCACGCACGNTTCTTCTCCAACA
 ACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTG
 CGCCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAG
 TTCCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGT
 TACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATC
 TTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAAT
 GTTATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCACTG
 GTGATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACT
 TGCATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAANTCTAA

***Enterococcus hirae* EHG11:**

GACAGTTACTCTCATCCTTGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTT
 CTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTGAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTG
 CTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCTCTCA
 GGTGCGCTATGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCG
 CGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGCGGTTTCG
 ATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTGATGGGCAGGTTA
 CCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCCACTCCTCTTTTTCCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGG
 AAAAAGAAGCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCTGAGCCAG
 GT

***Lactobacillus plantarum* LG14:**

TTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCA
 CTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCC
 TCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTG
 GCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCYCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGA
 CCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGT
 TATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCAC
 GTGTTACTCACCAAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCAATCAA
 TACCAGAGTTCGTTGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAG

Figura 1B

97

***Enterococcus faecalis* EFG1:**

CTATCATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGG
AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTG
GAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGC
TTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
TCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGT
CTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTA
GAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCCAGCA

***Lactobacillus salivarius* CELA200:**

GGGTGGGGNGANCAGAACATGAAATGAACAGTTTACATCTCACCTCGCTGNTTCTTCCT
CTAACAACAGAGCTTTTACGACTCCGAAGGACCTTCTTCACATCACGCGGCGTNTGCTC
CATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGG
CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGATTTCGGCTACGTATCATCACC
TTGGTAGGCCGTTACCCACCAACTAGTTAATACGCCGCGGTCCATCTAAAAGCGATA
GNAGAACCATCTTTCATCTAAGGATCATGCGATCCTTAGAGATATACGGNATTAGCACC
TGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTTTTAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCC
GCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTTCGGTGTAAAGAAAGTTTCGTTGACTT
GCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTNATGAGCCAGGATCAAACCTCTA

***Lactobacillus reuteri* PDA3:**

GCNTGGGNGAACGGTCACTGCGGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACA
GAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGC
CCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTTC
CATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTTAC
CTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTT
CAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTT
ATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCACTGGTG
ATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACTTGC
ATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGNCAGGATCNAACTCTAA

Figura 1C

98

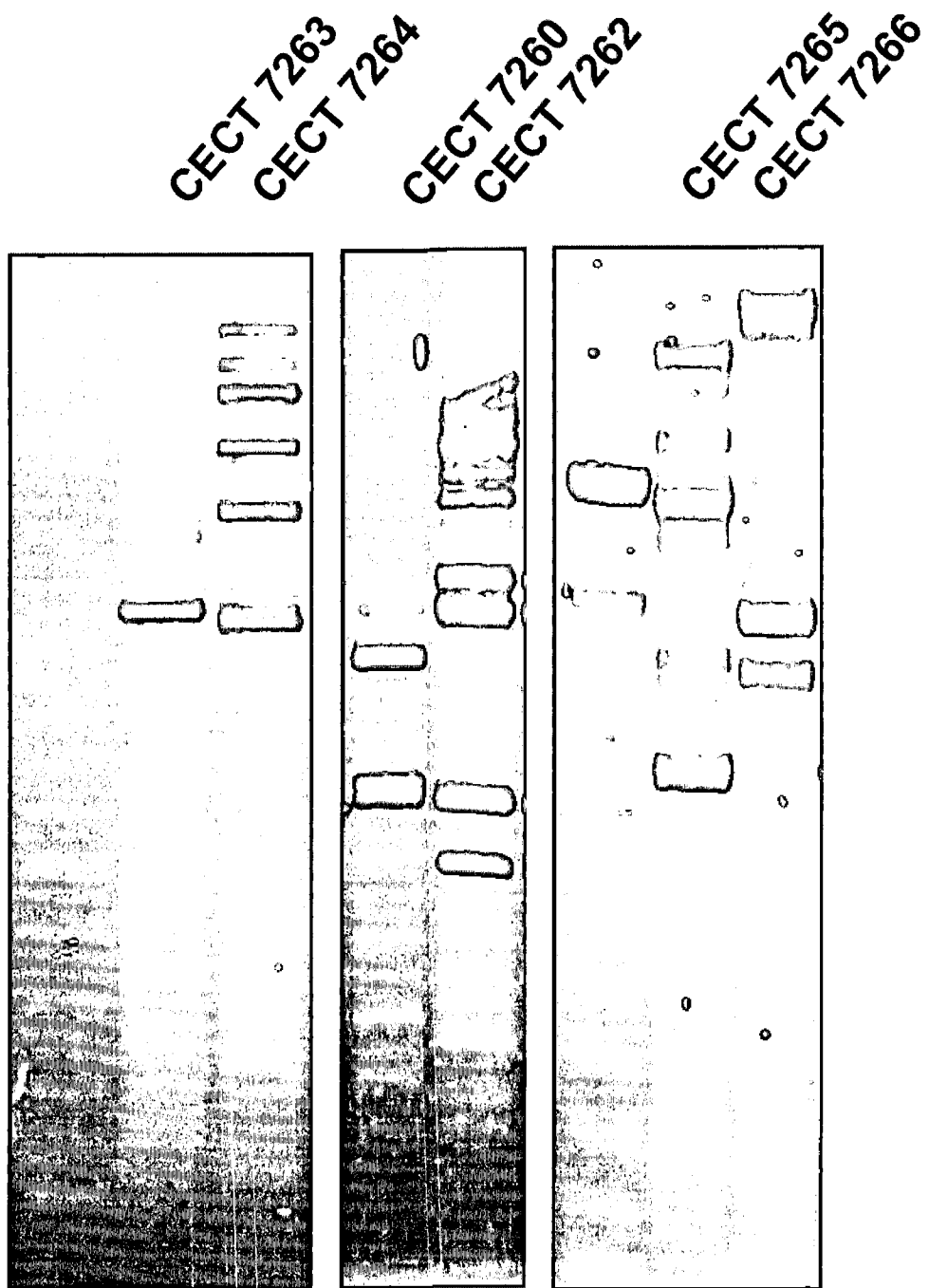


Figura 1D

99

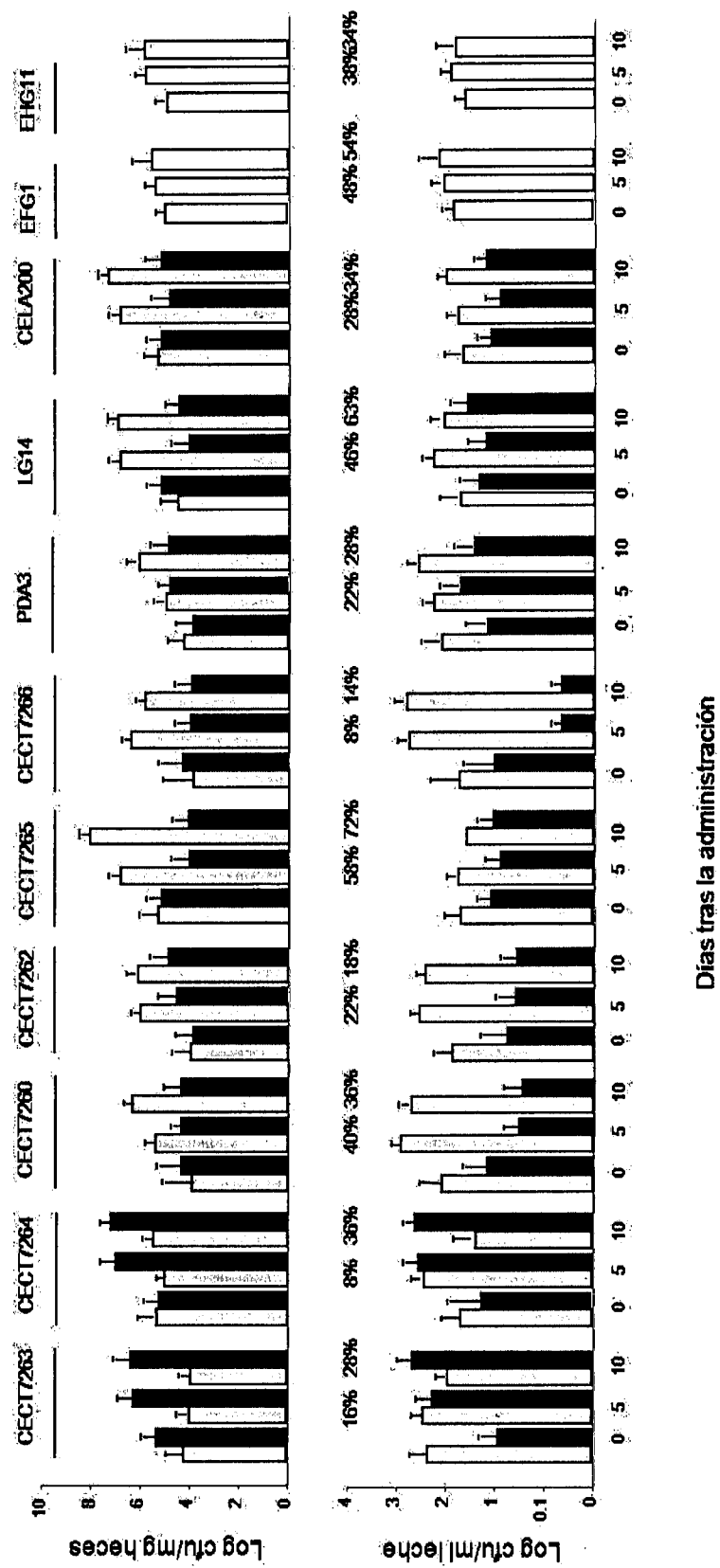


Figura 2

100

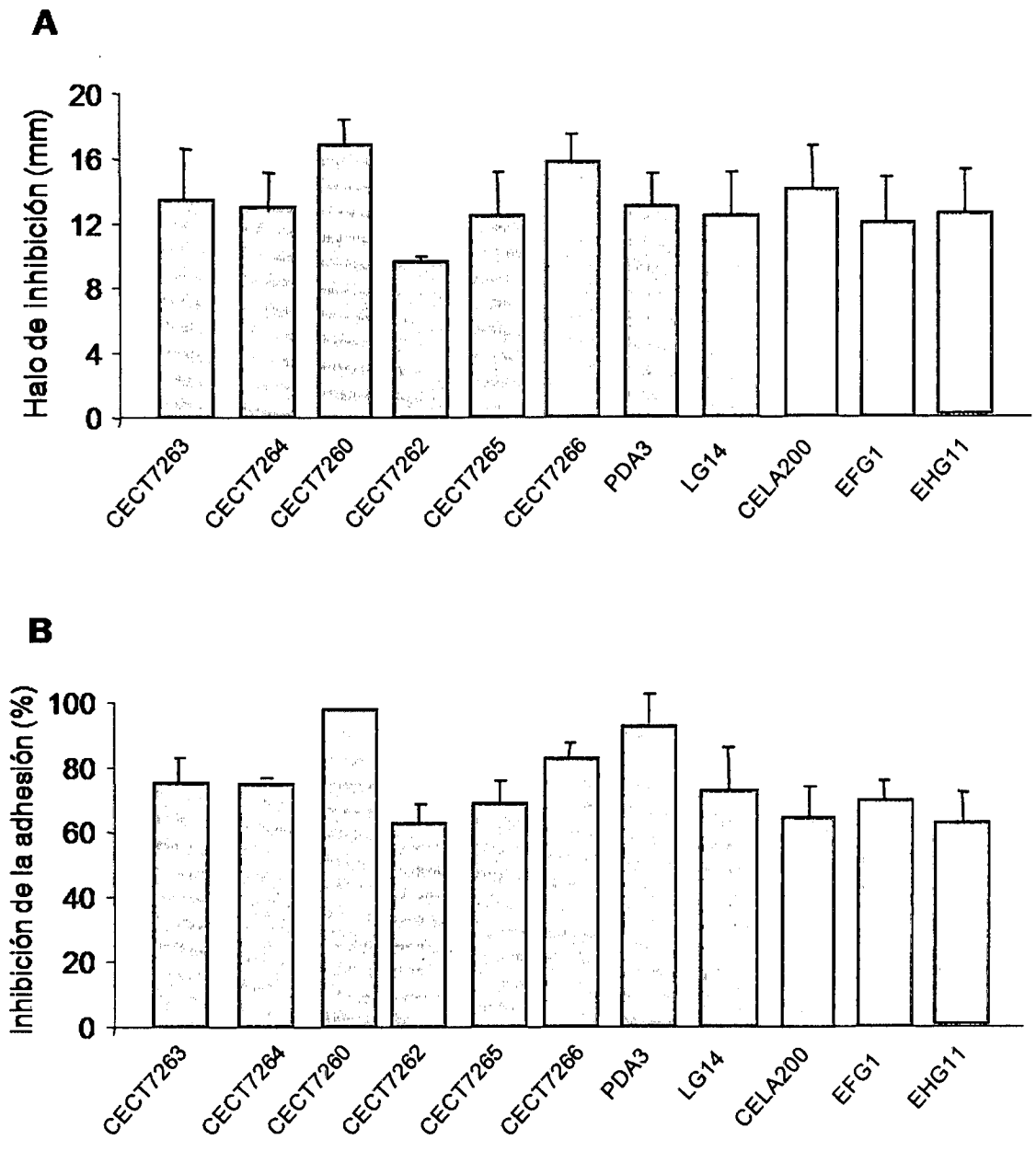
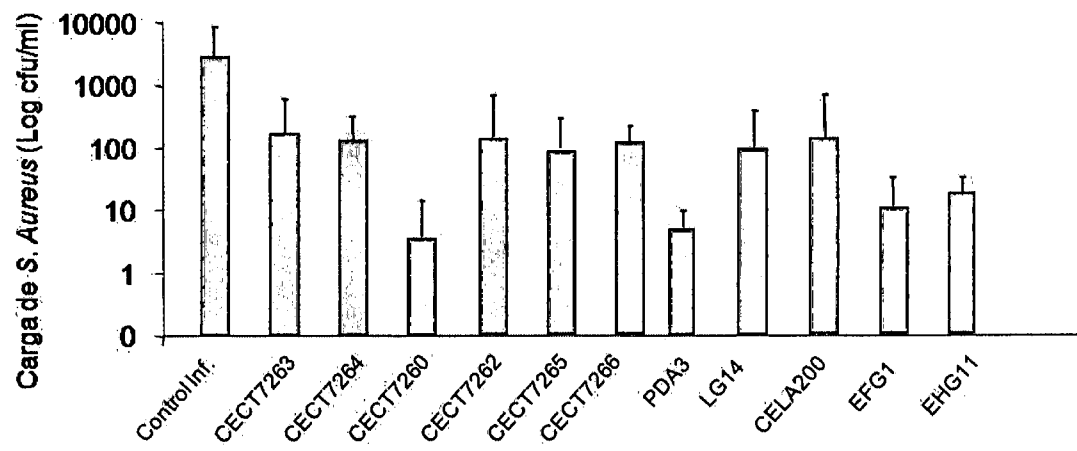
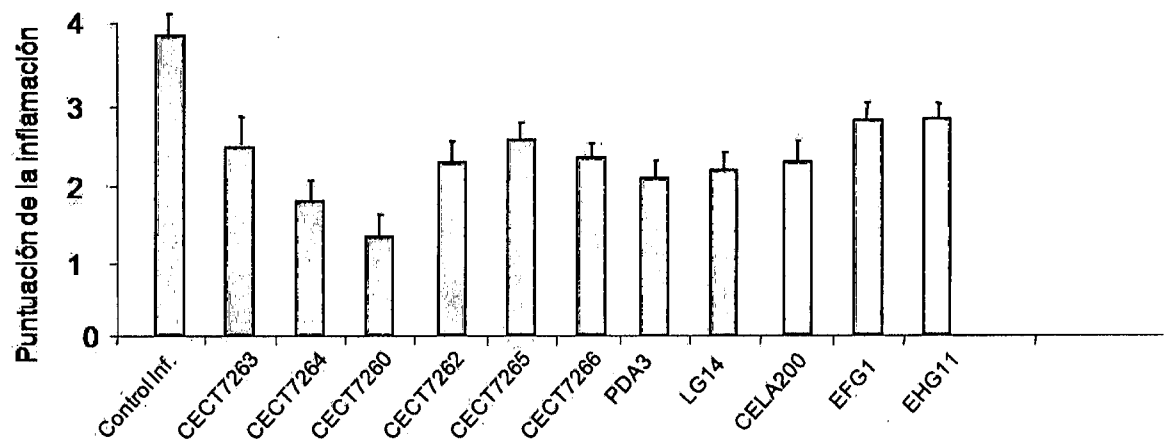


Figura 3

A**B****Figura 4**

102

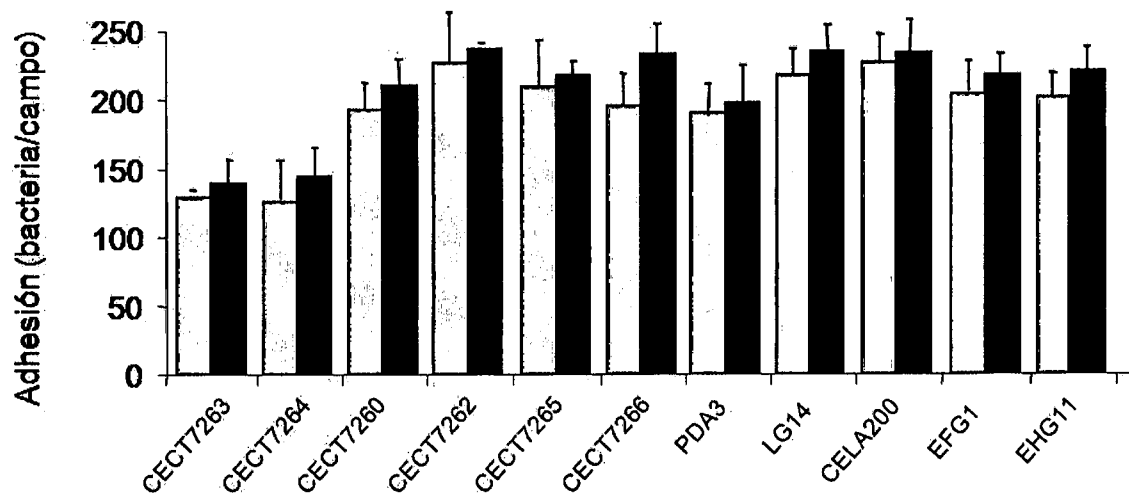


Figura 5

103

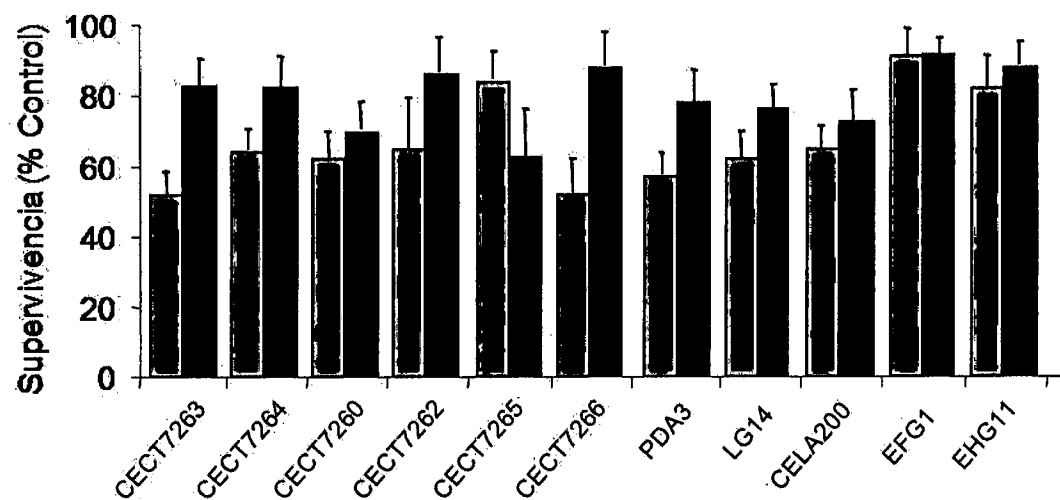
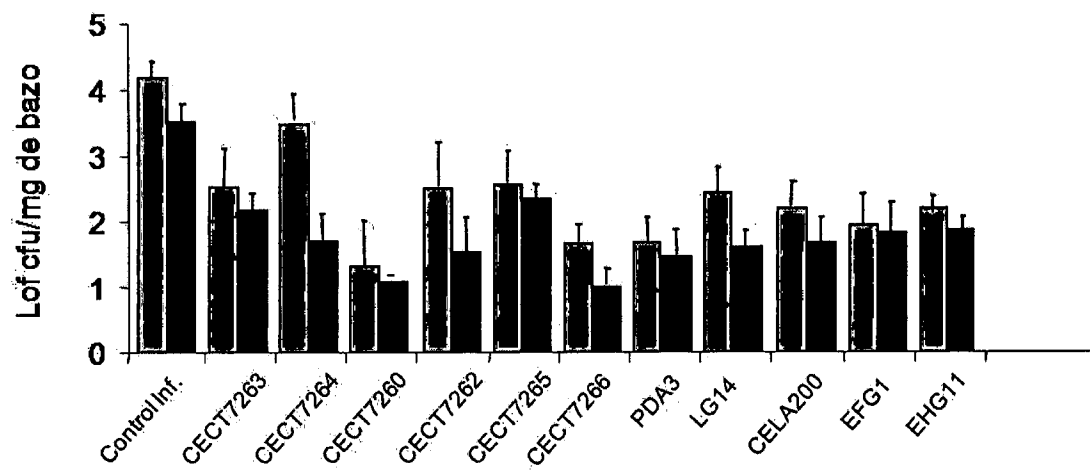


Figura 6

109

A



B

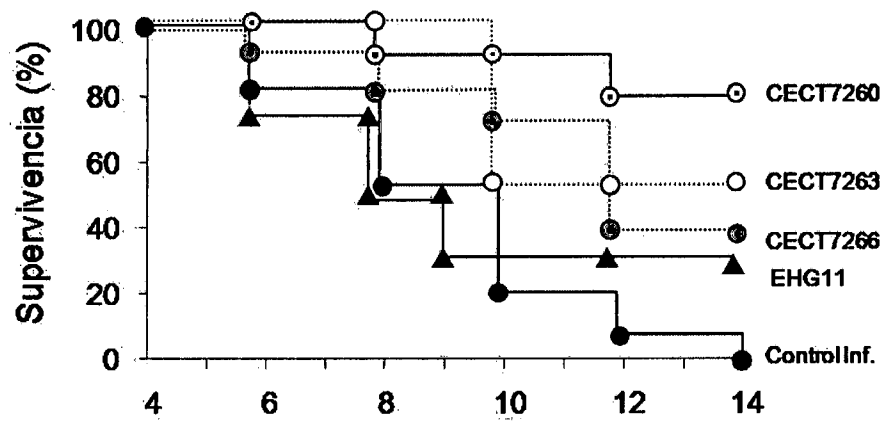
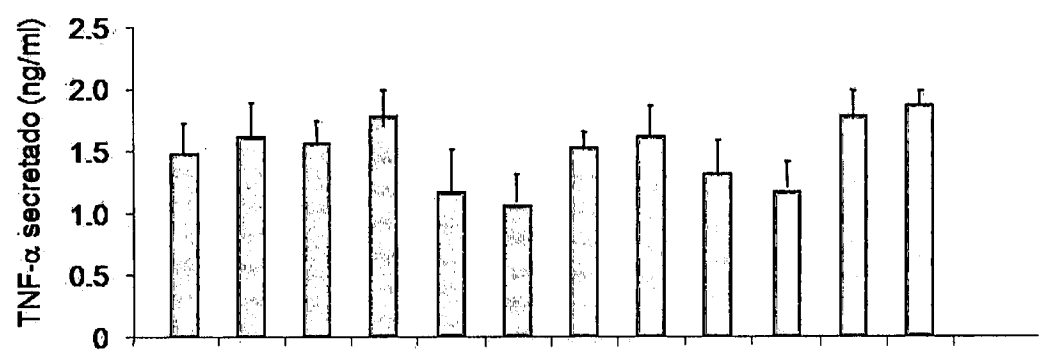


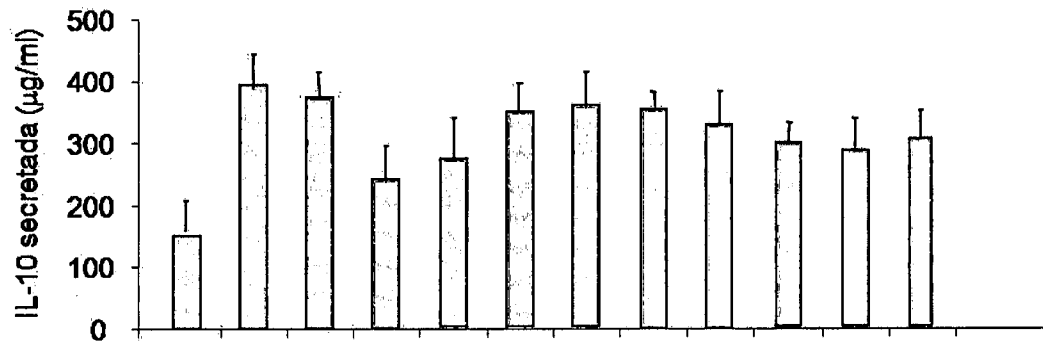
Figura 7

103

A



B



C

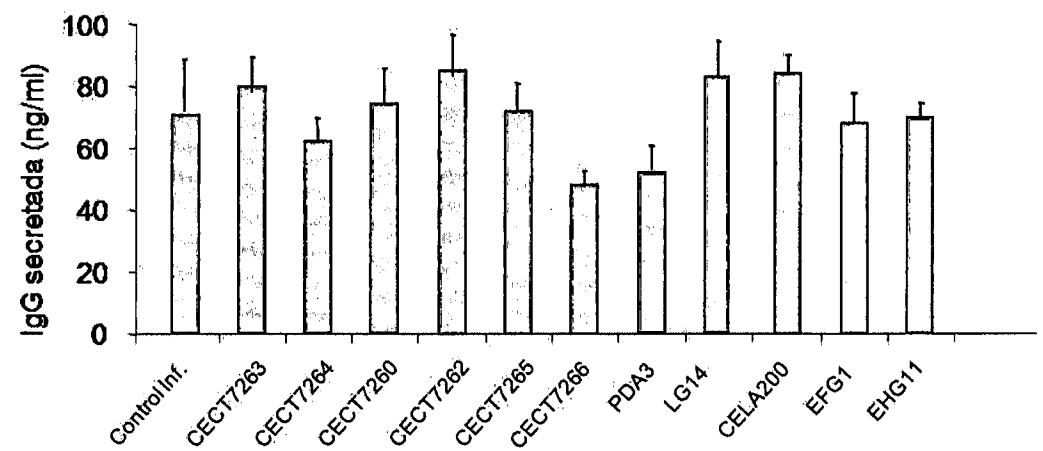


Figura 8

106

LISTA DE SECUENCIAS

<110> PULEVA BIOTECH S.A.

5

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

<130> P2922ES00

10

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.4

15

<210> 1

<211> 481

<212> ADN

<213> *B. breve* CECT 7263

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

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

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(8)

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

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

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

35

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

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

40

107

<220>
<221> misc_feature
<222> (131)..(131)
<223> n es a, c, g, o t

5
<220>
<221> misc_feature
<222> (147)..(147)
<223> n es a, c, g, o t

10
<400> 1
tcgngtnnga agnacaataa acacntaagt gccttgctcc ctaacaaaag aggtttacaa 60
cccgcaaggc ctccatccct cacgcggcgt cgctgcatca ggcttgcgcc cattgatgca 120
15 atattcccca ntgctgcctc ccgatangag tctgggccgt atctcagtc caatgtggcc 180
ggtcgccctc tcaggccggc taccgctcga agccatgggtg ggccgttacc ccgccatcaa 240
20 gctgatagga cgcgacccca tcccatgccg caaaggcttt cccaacacac catgcggtgt 300
gatggagcat ccggcattac caccgcttcc caggagctat tccggtgcat ggggcaggtc 360
ggtcacgcat tactcaccgg ttcgccactc tcaccaccag gcaaagcccg atggatcccg 420
25 ttcgacttgc atgtgttaag cacgccgcca gcgttcaccc tgagccagga tcaaactcta 480
a 481

30
<210> 2
<211> 476
<212> ADN
<213> *B. breve* CECT 7264

35
<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
40 <223> n es a, c, g, o t

108

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
5 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (63)..(63)
10 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (72)..(72)
15 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (80)..(80)
20 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (83)..(83)
25 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (87)..(87)
30 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (114)..(114)
35 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (141)..(141)
40 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (159)..(159)
5 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (161)..(161)
10 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (355)..(355)
15 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (358)..(358)
20 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (369)..(369)
25 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (444)..(444)
30 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (455)..(456)
35 <223> n es a, c, g, o t

<400> 2
tnccgcganga agaaataaaa caaagtcgct tgctccctaa caaaagaggt ttacaacccg 60
40 aangcctcca tncctcacgn ggngtcncat gcatcaggct tgcgcccatt gtgnaatatt 120

110

ccccactgct gcctcccgtgta ngagtctggg ccgtatctna ntcccaatgt ggccgggtcgc 180
cctctcaggc cggctacccg tcgaagccat ggtggggcgt taccocgcca tcaagctgat 240
5 aggacgcgac cccatcccat gccgcaaagg ctttcccaac acaccatgcg gtgtgatgga 300
gcatccggca ttaccacccg tttccaggag ctattccggt gcatggggca ggtcngtnac 360
10 gcattactna cccgttcgcc actctcacca ccaggcaaag ccgatggat cccgttcgac 420
ttgcatgtgt taagcacgcc gccngcggtc atccnnaaac aggatcaaac tctaaa 476

15 <210> 3
<211> 515
<212> ADN
<213> *L. fermentum* CECT 7265

20
<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n es a, c, g, o t

25
<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> n es a, c, g, o t

30
<220>
<221> misc_feature
<222> (313)..(313)
<223> n es a, c, g, o t

35
<220>
<221> misc_feature
<222> (510)..(510)
<223> n es a, c, g, o t

40



<400> 3
tacacgatat gaacagntta cctctcatac ggtgnttctt cttaacaac agagctttac 60

gagccgaaac ccttcttcac tcacgcggtg ttgctccatc aggcttgccg ccattgtgga 120
5 agattcccta ctgctgcctc ccgtaggagt atgggccgtg tctcagtccc attgtggcgg 180

atcagtctct caactcggct atgcatcatc gccttggtag gccgttacc caccaacaag 240

10 ctaatgcacc gcaggtccat ccagaagtga tagcgagaag ccattcttta agcgttggtc 300

atgcgaacaa cgntgttatg cgggtattagc atctgtttcc aaatgttgtc ccccgcttct 360

gggcaggtta cctacgtgtt actcacccgt ccgccactcg ttggcgacca aaatcaatca 420
15 ggtgcaagca ccatcaatca attgggccaa cgcgttcgac ttgcatgtat taggcacacc 480

gccggcggtc atcctgagcc aggatcaaan tctaa 515

20

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

25

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
30 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
35 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
40 <223> n es a, c, g, o t

112

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
5 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
10 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(46)
15 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (521)..(521)
20 <223> n es a, c, g, o t

<400> 4
accgnggggnn aacgacactg cgngnacagn ttactctcac gcacgnttct tctccaacaa 60

25 cagagcttta cgagccgaaa cccttcttca ctcacgcggt gttgctccat caggcttgcg 120

cccattgtgg aagattccct actgctgcct cccgtaggag tatggaccgt gtctcagttc 180

cattgtggcc gatcagtctc tcaactcggc tatgcatcat cgccttggtgta agccggttacc 240
30 ttaccaacta gctaatgcac cgcagggtcca tcccagagtg atagccaaag ccatctttca 300

aacaaaagcc atgtggcttt tgttggttatg cggtattagc atctgtttcc aaatgttatc 360

35 ccccgctccg gggcagggtta cctacgtggt actcaccggt ccgccactca ctggtgatcc 420

atcgtcaatc aggtgcaagc accatcaatc agttgggcca gtgcgtacga cttgcatgta 480

ttaggcacac cgccggcggt catcctgagc caggatcaaa ntctaa 526
40

```

113

<210> 5
<211> 524
<212> ADN
5 <213> *L. reuteri* CECT 7260

<220>
<221> misc_feature
10 <222> (3)..(3)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (8)..(8)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
20 <222> (507)..(507)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
25 <222> (515)..(515)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 5
gcntgggnga acggtcactg cggaacagtt actctcacgc acgttcttct ccaacaacag 60
30 agctttacga gccgaaaccc ttcttcactc acgcggtggt gctccatcag gcttgcgccc 120
attgtggaag attccctact gctgcctccc gtaggagtat ggaccgtgtc tcagttccat 180
35 tgtggccgat cagtctctca actcggctat gcatcatcgc cttggtaagc cgttacctta 240
ccaactagct aatgcaccgc aggtccatcc cagagtgata gccaaagcca tctttcaaac 300
aaaagccatg tggcttttgt tggtatgcgg tattagcatc tgtttccaaa tgttatcccc 360
40

cgctccgggg caggttacct acgtgttact caccgcgtccg ccactcactg gtgatccatc 420

gtcaatcagg tgcaagcacc atcaatcagt tgggccagtg cgtacgactt gcatgtatta 480

5 ggacacaccgc cggcggttcac cctgagncag gatcnaaact ctaa 524

<210> 6

<211> 519

10 <212> ADN

<213> *L. plantarum* CECT 7262

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (11)..(11)

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

<400> 6

20 ggccctgggaa nccggtcata cctggaacag gttacctctc agatatgggtt cttctttaac 60

aacagagttt tacgagccga aacccttctt cactcacgcg gcgttgctcc atcagacttt 120

cgtccattgt ggaagattcc ctactgctgc ctcccgtagg agtttgggcc gtgtctcagt 180

25 cccaatgtgg ccgattaccc tctcaggtcg gctacgtatc attgccatgg tgagccgtta 240

cctcaccatc tagctaatac gccgcgggac catccaaaag tgatagccga agccatcttt 300

30 caaactcgga ccatgcggtc caagttgtta tgcggtatta gcatctgttt ccaggtgtta 360

tcccccgctt ctgggcaggt ttcccacgtg ttactcacca gttcgccact cactcaaag 420

taattcatga tgcaagcacc aatcattacc agagttcggt cgacttgcat gtattaggca 480

35 cgccgccagc gttcgtcctg agacaggatc aaaactcta 519

<210> 7

<211> 474

40 <212> ADN

MS

<213> Enterococcus hirae EHG11

<400> 7

5 gacagttact ctcatccttg ttctttctcta acaacagagt ttacgatcc gaaaaccttc 60

ttcactcacg cggcgttgct cggtcagact ttctgccatt gccgaagatt ccctactgct 120

gcctcccgtg ggagtttggg ccgtgtctca gtcccaatgt ggccgatcac cctctcaggt 180

10 cggctatgca tcgtcgcctt ggtgagccgt tacctacca actagctaata gcaccgcggg 240

tccatccatc agcgacaccc gaaagcgcct ttcaaataca aaccatgcgg ttctgattgt 300

tatacgggat tagcacctgt ttccaagtgt tatcccttc tgatgggcag gttaccacg 360

15 tgttactcac ccgttcgcca ctctctttt tccggtggag caagctccgg tggaaaaaga 420

agcgttcgac ttgcatgtat taggcacgcc gccagcgttc gtcttgagcc aggt 474

20

<210> 8

<211> 469

<212> ADN

<213> Lactobacillus plantarum LG14:

25

<400> 8

ttactctcag atatgttctt cttaacaac agagttttac gagccgaaac cttcttcac 60

tcacgcggcg ttgtccatc agactttcgt ccattgtgga agattcccta ctgtgcctc 120

30 ccgtaggagt ttgggccgtg tctcagtcac aatgtggccg attaccctct caggtcggct 180

acgtatcatt gccatggtga gccgttaccy caccatctag ctaatacgcc gcgggaccat 240

35 ccaaaagtga tagccgaagc catctttcaa gctcggacca tgcggtccaa gttgttatgc 300

ggattagca tctgtttcca ggtgttatcc cccgcttctg ggcaggtttc ccacgtgtta 360

ctcaccagtt cgccactcac tcaaatgtaa atcatgatgc aagcaccaat caataccaga 420

40

gttcgttcga cttgcatgta ttaggcacgc cgccagcgtt cgtcctgag

<210> 9

5 <211> 493

<212> ADN

<213> Enterococcus faecalis EFG1:

<400> 9

10 ctatcatgca agtcgaacgc ttctttcctc ccgagtgcctt gcactcaatt ggaaagagga 60

gtggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctacccatc agagggggat aacacttgga 120

15 aacaggtgct aataccgcat aacagtttat gccgcatggc ataagagtga aaggcgcttt 180

cggtgtcgc tgatggatgg acccgcggtg cattagctag ttggtgaggt aacggctcac 240

caaggccacg atgcatagcc gacctgagag ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg 300

20 gccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcgg caatggacga aagtctgacc 360

gagcaacgcc gcgtgagtga agaaggtttt cggtatcgtaa aactctgttg ttagagaaga 420

25 acaaggacgt tagtaactga acgtcccctg acggtatcta accagaaagc cacggctaac 480

tacgtgcca gca 493

<210> 10

30 <211> 524

<212> ADN

<213> Lactobacillus salivarius CELA200:

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n is a, c, g, or t

40 <220>

117

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

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n is a, c, g, or t

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (113)..(113)
 <223> n is a, c, g, or t

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (297)..(297)
 <223> n is a, c, g, or t

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (345)..(345)
 <223> n is a, c, g, or t

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (503)..(503)
 <223> n is a, c, g, or t

30 <400> 10
 gggtggggng ancagaacat gaaatgaaca gtttacatct cacctcgctg nttcttcctc 60
 taacaacaga gctttttacga ctccgaagga ccttcttcac atcacgcggc gtntgctcca 120
 35 tcagacttgc gtccattgtg gaagattccc tactgctgcc tcccgtagga gtttgggccg 180
 tgtctcagtc ccaatgtggc cgatcaacct ctgagattcg gctacgtatc atcaccttgg 240
 taggcggtta cccaccaaac tagttaatac gccgcgggtc catctaaaag cgatagnaga 300

40

118

accatctttc atctaaggat catgcgatcc ttagagatat acggnattag cacctgtttc 360
 caagtgttat ccccttcttt taggcaggtt acccacgtgt tactcacccg tccgccactc 420
 5 aacttcttac ggtgaatgca agcattcggg gtaagaaagt ttcgttcgac ttgcatgtat 480
 taggcacgcc gccagcggtc gtnatgagcc aggatcaaac tcta 524

10 <210> 11
 <211> 524
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus reuteri PDA3:

15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n is a, c, g, or t

20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> n is a, c, g, or t

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (507)..(507)
 <223> n is a, c, g, or t

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (515)..(515)
 <223> n is a, c, g, or t

35
 <400> 11
 gcntgggnga acggtcactg cggaacagtt actctcacgc acgttcttct ccaacaacag 60
 agctttacga gccgaaaccc ttcttcaactc acgcggtgtt gctccatcag gcttgcgccc 120

40

19

attgtggaag attccctact gctgcctccc gtaggagtat ggaccgtgtc tcagttccat 180
tgtggccgat cagtctctca actcggctat gcatcatcgc cttggtaagc cgttacctta 240
5 ccaactagct aatgcaccgc aggtccatcc cagagtgata gccaaagcca tctttcaaac 300
aaaagccatg tggcttttgt tgttatgcgg tattagcatc tgtttccaaa tgttatcccc 360
cgctccgggg caggttacct acgtgttact caccgcgccg ccactcactg gtgatccatc 420
10 gtcaatcagg tgcaagcacc atcaatcagt tgggccagtg cgtacgactt gcatgtatta 480
ggcacaccgc cggcgttcat cctgagncag gatcnaaact ctaa 524

170

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*

121

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%,

122

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

123

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

124

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 15 preferiblemente desde aproximadamente 10^7 ufc/g hasta 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 35 pueden obtenerse mediante cualquier método convencional conocido en la técnica.

125

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,

126

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

129

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

128

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

129

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 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 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.

Estos 68 aislados seleccionados se caracterizaron adicionalmente tanto fenotípica (API CH50, APIZYM 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 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 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

130

- *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
- *Enterococcus hirae* obteniéndose dicha bacteria de leche
- 10 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 (BioMerieux) 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:

131

- *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

132

Tabla I: Patrón de fermentación de las diferentes cepas probióticas de la invención Los sustratos fermentables positivos se indican en gris.

TEST	7263	7264	7260	7262	7265	7266	7413	7412	7409	7411	7410
Glicerol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eritritol	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
D-Arabinosa	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	5
L-Arabinosa	0	0	0	5	0	5	5	5	0	1	0
Ribosa	5	0	0	5	5	5	5	5	4	0	0
D-Xilosa	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
L-Xilosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5
Adonitol	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	5
β Metil-glucosido	0	0	0	0	0	5	5	0	0	5	5
Galactosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
D-Glucosa	5	5	5	5	5	5	0	5	5	0	0
D-Fructosa	5	5	0	5	5	0	5	5	5	0	0
D-Manosa	1	0	0	5	5	0	0	5	5	0	0
L-Sorbose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Ramnose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Dulcitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inositol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Manitol	4	0	0	5	5	0	4	5	5	5	5
Sorbitol	5	0	0	5	0	0	0	5	5	5	5
α Metil-D-manosido	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
α Metil-D-glucosido	2	0	0	0	5	0	5	0	0	5	5
N-Acetil glucosamina	2	1	0	5	5	0	5	5	5	5	5
Amigdalina	0	1	0	5	0	0	5	5	0	5	5
Arbutina	0	0	0	5	0	0	5	5	4	5	5
Esculina	5	5	0	5	0	0	0	5	5	5	5
Salicina	1	0	0	5	0	0	5	5	0	0	5
Celobiosa	5	0	0	5	0	0	5	5	4	5	5
Maltosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Lactosa	5	0	5	5	5	5	5	5	5	0	0
Melibiosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0
Sacarosa	5	0	5	0	5	5	5	0	5	0	0
Trehalosa	0	0	0	5	0	0	0	5	5	1	5
Inulina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Melechiosa	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
D-Rafinosa	5	0	5	5	5	5	0	5	5	0	0
Amidon	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucógeno	5	4	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Xilitol	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
β Gentiobiosa	0	2	0	5	0	0	0	5	0	0	0
D-Turanosa	5	4	0	5	0	0	0	5	0	0	0
D-Licosa	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
D-Tagatosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
D-Fucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
L-Fucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Arabitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Arabitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gluconato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 ceto-gluconato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 ceto-gluconato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

5

Ejemplo 3: Selección selectiva de las cepas

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

133

	7263	7264	7260	7265	7266	7413	7412	7409	7411	7410
Penicilina	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S
Ampicilina	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S
Ciprofloxacino	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Eritromicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Clindamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Tetraciclina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Vancomicina	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S
Gentamicina	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S
Cloranfenicol	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Rifampicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R

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 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 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, 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 placas de agar TSA que contenían 10^6 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.

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

	7413	7412	7409	7411	7410	7263	7264	7260	7262	7265	7266
<i>E. faecium</i> P21	+	+	+	-	-	+++	+++	+	+	+++	+++
<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> RJM1	+++	+++	+++	+	+	+	+++	++	+++	+++	+/-
<i>S. enteritidis</i> 4396	+++	+++	+++	++	++	+/-	++	++	+++	+++	++
<i>K. pneumoniae</i> CECT142	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+	+++	++
<i>K. oxytoca</i> CECT860T	+/-	+	+++	++	++	+++	+++	+/-	+/-	+/-	++
<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

13

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

136

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

Reivindicaciones modificadas

137

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 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.

130

***Lactobacillus fermentum* (CECT under Accession N° 7265)**

TACACGATATGAACAGNTTACCTCTCATACGGTGNTTCTTCTTTAACAACAGAGCTTTA
CGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCCATTGTG
GAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTGTGG
CCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAGGCCGTTACCCACCAA
CAAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAGCGT
TGTTTCATGCGAACAACGNTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTGTCCCC
GCTTCTGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCGTTGGCGACCAAAA
TCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAATTGGGCCAACGCGTTCGACTTGCATGTATTA
GGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAANTCTAA

***Lactobacillus reuteri* (CECT under Accession N° 7266)**

ACCGNGGGNNAACGACACTGCGNGNACAGNTTACTCTCACGCACGNTTCTTCTCCAACA
ACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTG
CGCCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAG
TTCCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGT
TACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATC
TTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAAT
GTTATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCACTG
GTGATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACT
TGCATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAANTCTAA

***Enterococcus hirae* (CECT under Accession N° 7410)**

GACAGTTACTCTCATCCTTGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTT
CTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTGAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTG
CTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCTCTCA
GGTCGGCTATGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCG
CGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGCGGTTTCG
ATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTGATGGGCAGGTTA
CCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCCACTCCTCTTTTTCCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGG
AAAAGAAGCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCTTGAGCCAG
GT

***Lactobacillus plantarum* (CECT under Accession N° 7412)**

TTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCA
CTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCG
GCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCYCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGA
CCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGT
TATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCAC
GTGTTACTCACAGTTCCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCAATCAA
TACCAGAGTTCGTTGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTTGAG

Figura 1B*Figuras modificadas*

139

***Enterococcus faecalis* (CECT under Accession N° 7411)**

CTATCATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGG
AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTG
GAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGC
TTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGC
TCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGT
CTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTA
GAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCCAGCA

***Lactobacillus salivarius* (CECT under Accession N° 7409)**

GGGTGGGGNGANCAGAACATGAAATGAACAGTTTACATCTCACCTCGCTGNTTCTTCCT
CTAACAACAGAGCTTTTACGACTCCGAAGGACCTTCTTCACATCACGCGGCGTNTGCTC
CATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGG
CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGATTTCGGCTACGTATCATCACC
TTGGTAGGCCGTTACCCCACTAGTTAATACGCCGCGGGTCCATCTAAAAGCGATA
GNAGAACCATCTTTCATCTAAGGATCATGCGATCCTTAGAGATATACGGNATTAGCACC
TGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTTTTAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCC
GCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTTCGGTGTAAGAAAGTTTCGTTTCGACTT
GCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTNATGAGCCAGGATCAAACCTCTA

***Lactobacillus reuteri* (CECT under Accession N° 7413)**

GCNTGGGNGAACGGTCACTGCGGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACA
GAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGC
CCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTTC
CATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTTAC
CTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTT
CAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAATGTT
ATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCACTGGTG
ATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACTTGC
ATGTATTAGGCACACCGCCGCGTTCATCCTGAGNCAGGATCNAACTCTAA

Figura 1C*Figuras modificadas*

140

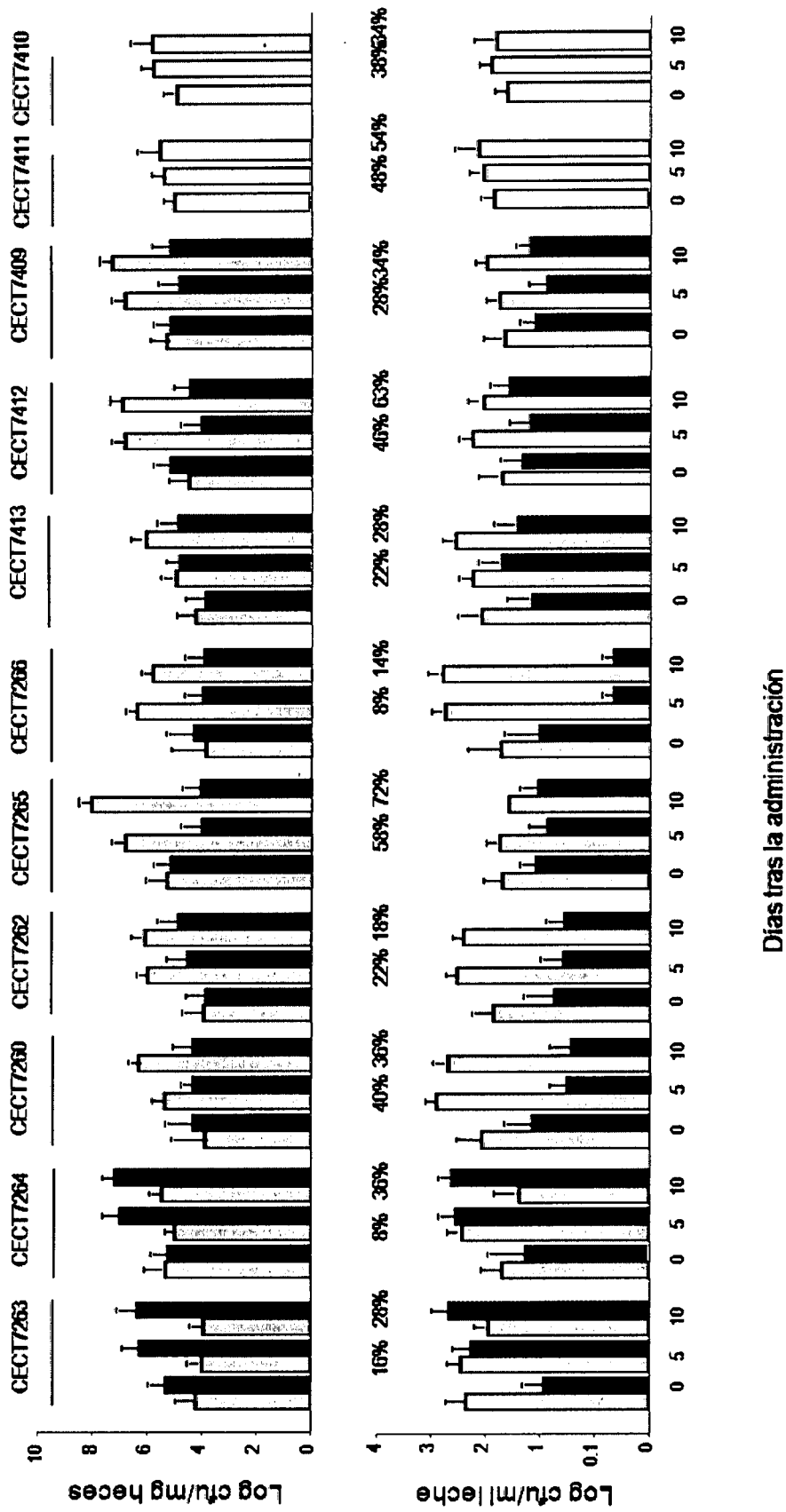


Figura 2

Figuras modificadas

111

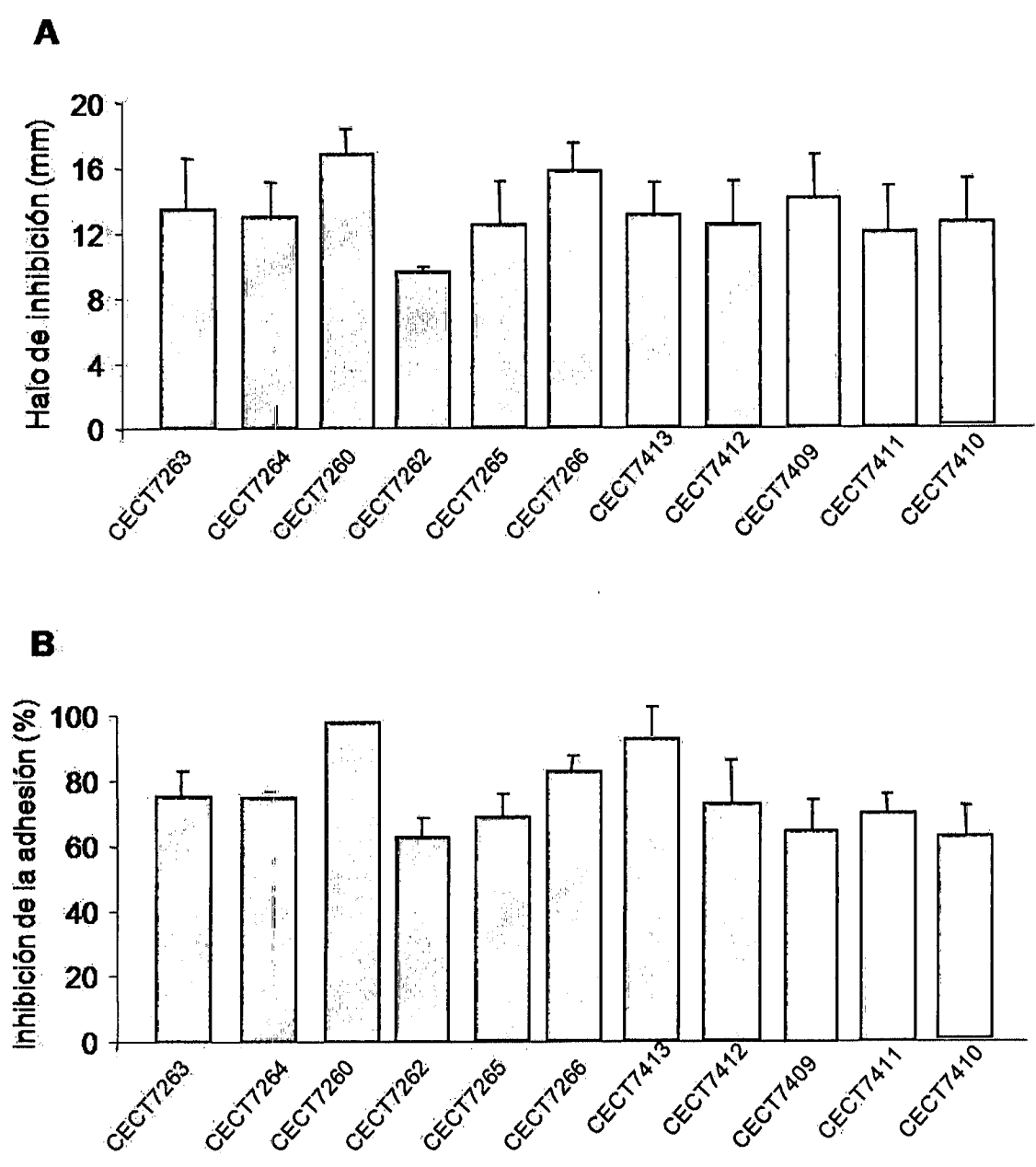


Figura 3

Figuras modificadas

1472

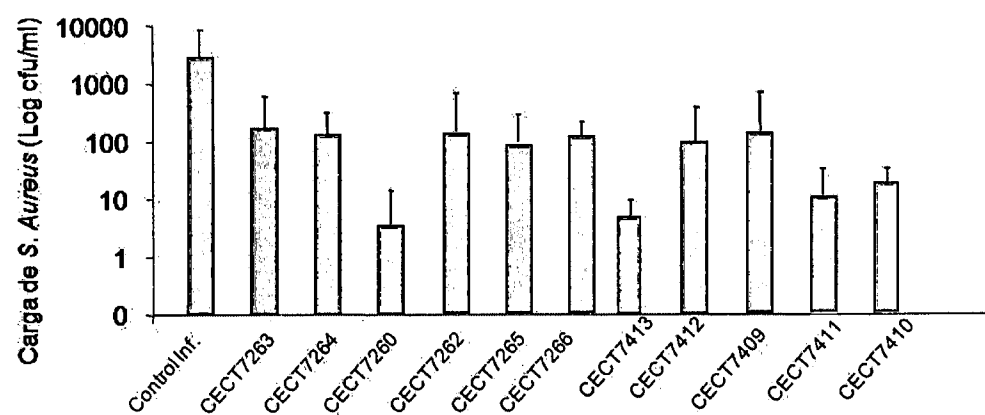
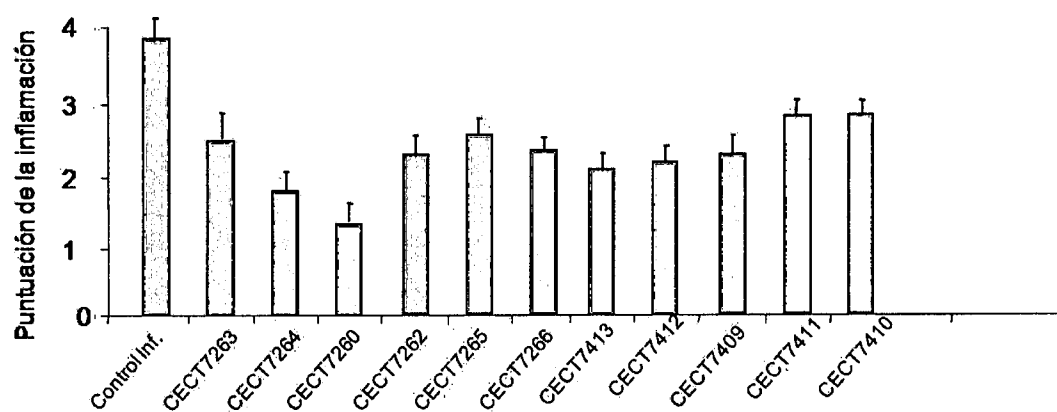
A**B**

Figura 4

Figuras modificadas

143

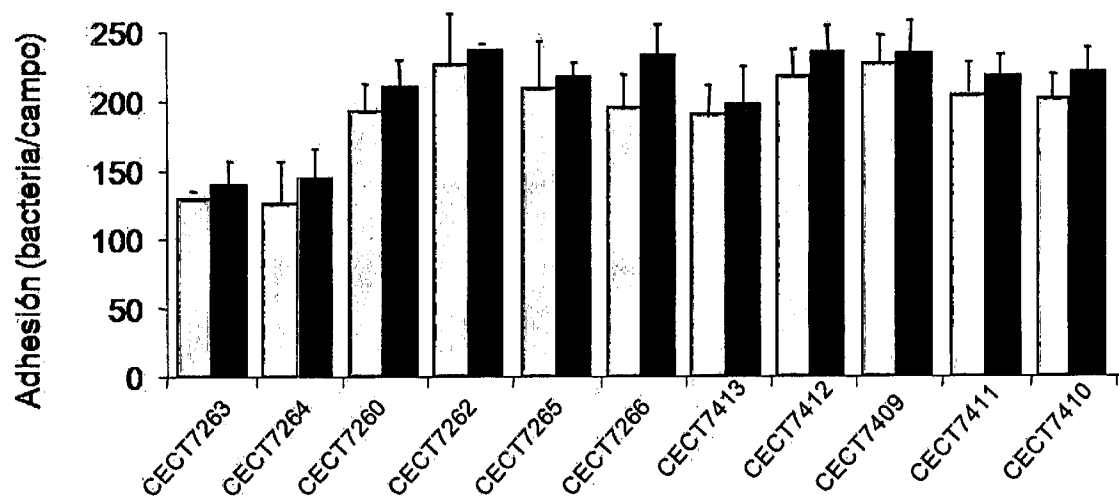


Figura 5

Figuras modificadas

144

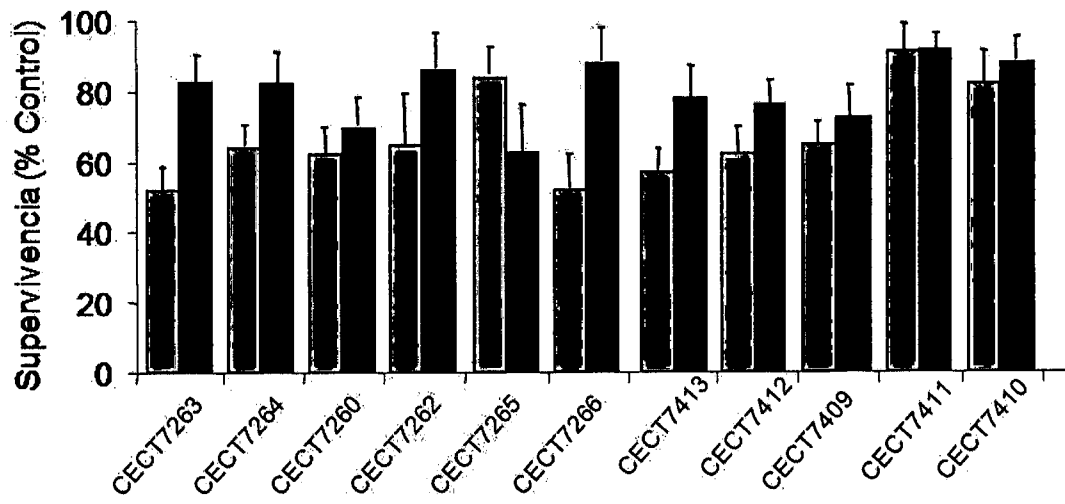
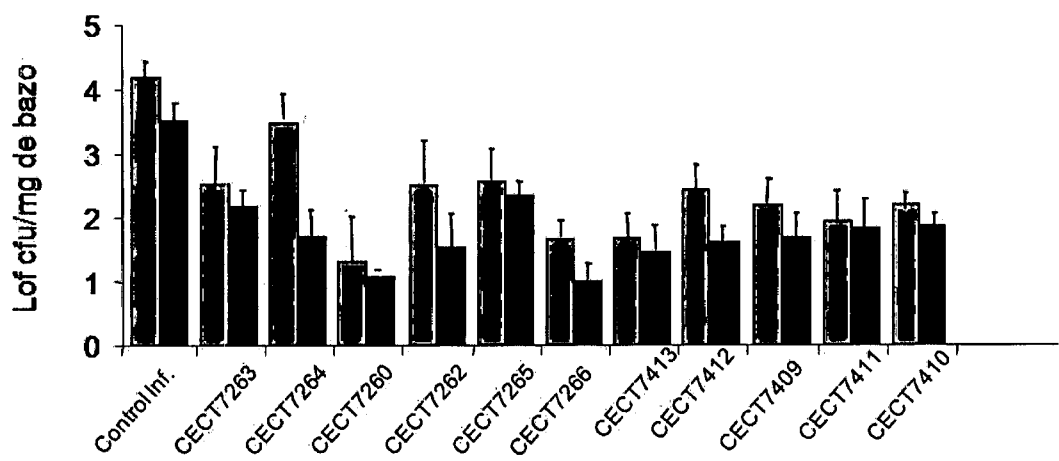


Figura 6

Figuras modificadas

MS

A



B

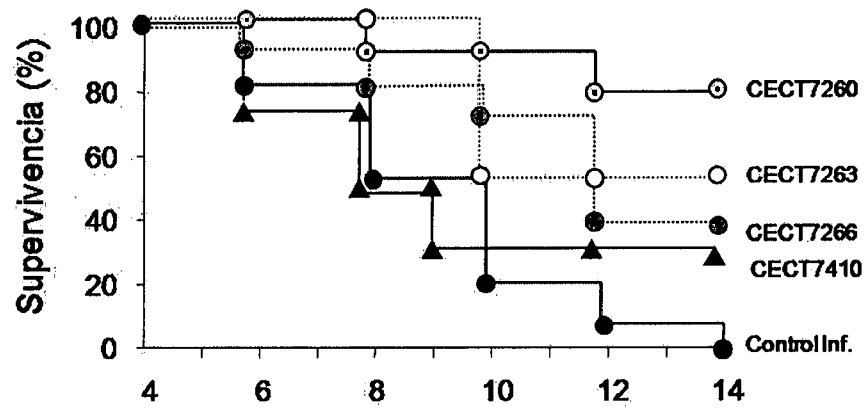
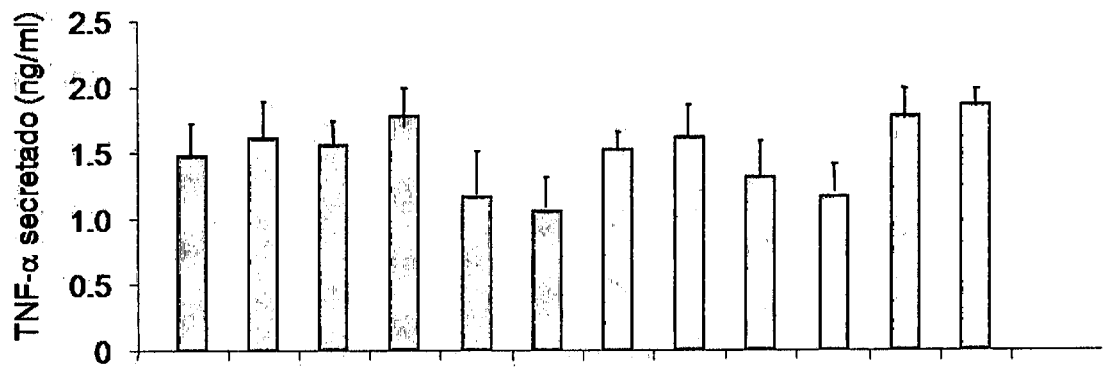


Figura 7

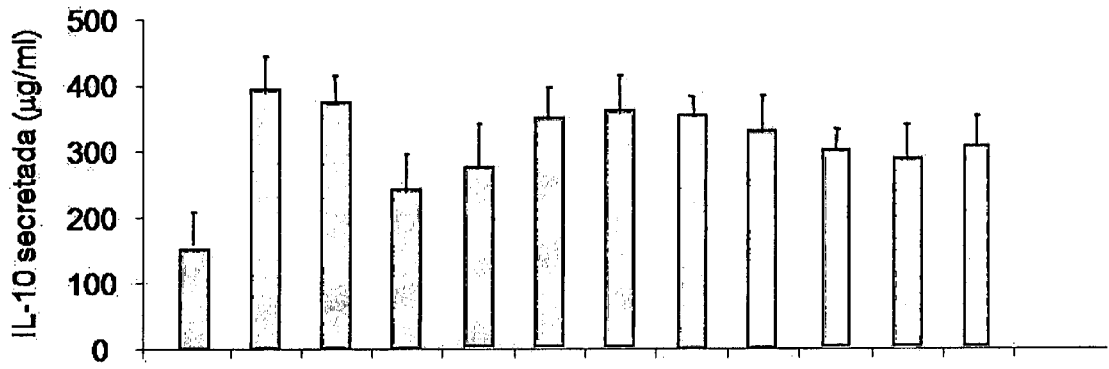
Figuras modificadas

14/6

A



B



C

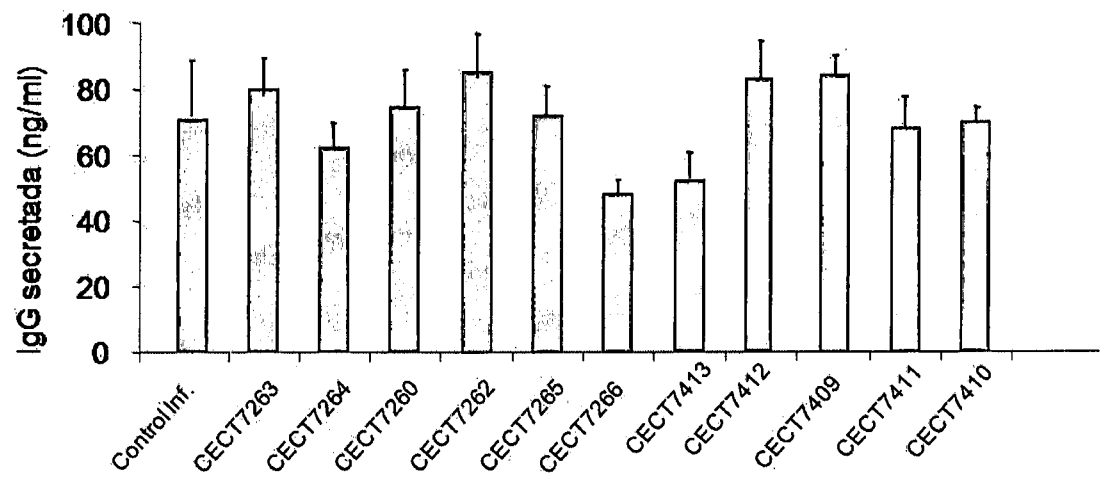


Figura 8

Figuras modificadas

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> P2922PC00

<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 e s a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(8)

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

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

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

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

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

Lista de secuencias modificada

<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
 tcgngtnnga agnacaataa acacntaagt gccttgctcc ctaacaaaag aggtttacaa 60
 cccgcaaggc ctccatccct cacgcggcgt cgctgcatca ggcttgcgcc cattgatgca 120
 atattcccca ntgctgcctc ccgatangag tctggggcgt atctcagtcc caatgtggcc 180
 ggctgccttc tcaggccggc taccctgcca agccatgggtg ggccgttacc ccgccatcaa 240
 gctgatagga cgcgacccca tcccatgccg caaaggcttt cccaacacac catgcggtgt 300
 gatggagcat ccggcattac caccctgttc caggagctat tccggtgcat ggggcaggtc 360
 ggtcacgcat tactcaccgc ttgcgcaactc tcaccaccag gcaaagcccg atggatcccg 420
 ttgcacttgc atgtgttaag cacgccgcca gcgttcaccc tgagccagga tcaaactcta 480
 a 481

<210> 2
 <211> 476
 <212> ADN
 <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

149

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

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

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

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

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

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

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

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

Lista de secuencias modificada

150

<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 tgctccctaa caaaagaggt ttacaacccg 60
 aangctcca tncctcaogn ggngtcncat gcatcaggct tgcgcccatt gtgnaatatt 120
 cccactgct gcctcccgta ngagtctggg ccgtatctna ntcccaatgt ggccggtcgc 180

Lista de secuencias modificada

151

cctctcaggc cggctacccg tcgaagccat ggtggggccgt taccccgcca tcaagctgat 240
 aggacgcgac cccatcccat gccgcaaagg ctttcccaac acaccatgcg gtgtgatgga 300
 gcatccggca ttaccacccg tttccaggag ctattccggt gcatggggca ggtcngtnac 360
 gcattactna cccgttcgcc actctcacca ccaggcaaag cccgatggat cccgttcgac 420
 ttgcatgtgt taagcacgcc gccngcggtc atccnnaaac aggatcaaac tctaaa 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 cctctcatat ggtgnttctt ctttaacaac agagctttac 60

Lista de secuencias modificada

gagccgaaac ccttcttcac tcacgcggtg ttgctccatc aggcttgccg ccattgtgga 120
 agattcccta ctgctgcctc ccgtaggagt atgggcccgtg tctcagtccc attgtggccg 180
 atcagtctct caactcggct atgcatcatc gccttggtag gccgttacc caccaacaag 240
 ctaatgcacc gcaggtccat ccagaagtga tagcgagaag ccattcttta agcgttggtc 300
 atgcgaacaa cgntgttatg cgttattagc atctgtttcc aaatgtgtgc ccccgcttct 360
 gggcaggtta cctacgtggt actcaccgt cgcacctcg ttggcgacca aaatcaatca 420
 ggtgcaagca ccatcaatca attgggcca cgcgttcgac ttgcatgtat taggcacacc 480
 gccggcgttc atcctgagcc 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

153

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

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

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

<220>

<221> misc_feature

<222> (46)..(46)

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

<220>

<221> misc_feature

<222> (521)..(521)

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

<400> 4

accnggggnn aacgacactg cgngnacagn ttactctcac gcacgnttct tctccaacaa 60

cagagcttta cgagccgaaa cccttcttca ctcacgcggt gttgctccat caggcttgcg 120

cccattgtgg aagattccct actgctgcct cccgtaggag tatggaccgt gtctcagttc 180

cattgtggcc gatcagtctc tcaactcggc tatgcatcat cgccttggtta agccgttacc 240

ttaccaacta gctaatgcac cgcagggtcca tcccagagtg atagccaaag ccattctttca 300

aacaaaagcc atgtggcttt tggtgttatg cggtattagc atctgtttcc aaatgttatc 360

ccccgctccg gggcagggtta cctacgtggt actcaccgt cgcactca ctggtgatcc 420

atcgtcaatc aggtgcaagc accatcaatc agttgggcca gtgcgtacga cttgcatgta 480

ttaggcacac cgccggcggt catcctgagc caggatcaaa ntctaa 526

<210> 5

<211> 524

<212> ADN

<213> *L. reuteri* CECT 7260

Lista de secuencias modificada

154

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

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

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

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

<400> 5
gcntgggnga acgggtcactg cggaacagtt actctcacgc acgttcttct ccaacaacag 60

agctttacga gccgaaaccc ttcttcactc acgcggtggt gctccatcag gcttgcgccc 120

attgtggaag attccctact gctgcctccc gtaggagtat ggaccgtgtc tcagttccat 180

tgtggccgat cagtctctca actcggctat gcatcatcgc cttggtaagc cgttacctta 240

ccaactagct aatgcaccgc aggtccatcc cagagtgata gccaaagcca tctttcaaac 300

aaaagccatg tggcttttgt tgttatgcgg tattagcatc tgtttccaaa tgttatcccc 360

cgctccgggg caggttacct acgtgttact cacccgccg ccaactcactg gtgatccatc 420

gtcaatcagg tgcaagcacc atcaatcagt tgggccagtg cgtacgactt gcatgtatta 480

ggcacaccgc cggcggttcat cctgagncag gatcnaaact ctaa 524

Lista de secuencias modificada

155

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

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

<400> 6
 ggcctgggaa nccggtcata cctggaacag gttacctctc agatatggtt cttctttaac 60
 aacagagttt tacgagccga aacccttctt cactcacgcg gcgttgctcc atcagacttt 120
 cgtccattgt ggaagattcc ctactgctgc ctcccgtagg agtttgggcc gtgtctcagt 180
 cccaatgtgg cagattaccc tctcaggtcg gctacgtatc attgccatgg tgagccgcta 240
 cctcaccatc tagctaatac gccgcgggac catccaaaag tgatagccga agccatcttt 300
 caaactcgga ccatgcggtc caagttgtta tgcggtatta gcatctgttt ccagggtgta 360
 tcccccgctt ctgggcaggt ttcccacgtg ttactcacca gttcgccact cactcaaag 420
 taattcatga tgcaagcacc aatcattacc agagttcgtt cgacttgcat gtattaggca 480
 cgccgccagc gttcgtcctg agacaggatc aaaactcta 519

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

<400> 7
 gacagttact ctcatccttg ttctttctcta acaacagagt ttacgatcc gaaaaccttc 60
 ttactcacg cggcgttgct cggtcagact ttcgtccatt gccgaagatt ccctactgct 120

Lista de secuencias modificada

gcctcccgtg ggagtttggg ccgtgtctca gtcccaatgt ggccgatcac cctctcaggt 180
 cggctatgca tcgtcgccctt ggtgagccgt tacctcacca actagctaata gcaccgcggg 240
 tccatccatc agcgacaccc gaaagcgccct ttcaaatcaa aaccatgcgg tttcgattgt 300
 tatacgggtat tagcacctgt ttccaagtgt tatccccttc tgatgggcag gttaccacg 360
 tggtactcac ccgttcgcca ctctcttttt tccggtggag caagctccgg tggaaaaaga 420
 agcgttcgac ttgcatgtat taggcacgcc gccagcggtc gtcctgagcc aggt 474

<210> 8
 <211> 469
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus plantarum CECT 7412

<400> 8
 ttactctcag atatgttctt ctttaacaac agagttttac gagccgaaac ccttcttcac 60
 tcacgcggcg ttgctccatc agactttcgt ccattgtgga agattcccta ctgctgcctc 120
 ccgtaggagt ttgggcccgtg tctcagtccc aatgtggccg attaccctct caggtcggct 180
 acgtatcatt gccatggtga gccgttaccy caccatctag ctaatacgcc gcgggaccat 240
 ccaaaagtga tagccgaagc catctttcaa gctcggacca tgcggtccaa gttgttatgc 300
 ggtattagca tctgtttcca ggtgttatcc cccgcttctg ggcaggtttc ccacgtgtta 360
 ctcaccagtt cgccactcac tcaaatgtaa atcatgatgc aagcaccaat caataccaga 420
 gttcgttcga cttgcatgta ttaggcacgc cgccagcggt cgtcctgag 469

<210> 9
 <211> 493
 <212> ADN
 <213> Enterococcus faecalis CECT 7411

Lista de secuencias modificada

15

<400> 9
 ctatcatgca agtcgaacgc ttcttttcctc ccgagtgcctt gcactcaatt ggaaagagga 60
 gtggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctacccatc agaggggggat aacacttgga 120
 aacaggtgct aataccgcat aacagtttat gccgcatggc ataagagtga aaggcgcttt 180
 cgggtgtcgc tgatggatgg acccgcggtg cattagctag ttggtgaggt aacggctcac 240
 caaggccacg atgcatagcc gacctgagag ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg 300
 gccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcgg caatggacga aagtctgacc 360
 gagcaacgcc gcgtgagtga agaaggtttt cggatcgtaa aactctgttg ttagagaaga 420
 acaaggacgt tagtaactga acgtcccctg acggtatcta accagaaagc cacggctaac 480
 tacgtgcccc gca 493

<210> 10
 <211> 524
 <212> ADN
 <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

158

<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
 ggggtggggng ancagaacat gaaatgaaca gtttacatct cacctcgctg nttcttctc 60
 taacaacaga gcttttacga ctccgaagga cttcttcac atcacgcggc gtntgctcca 120
 tcagacttgc gtccattgtg gaagattccc tactgctgcc tcccgtagga gtttgggccg 180
 tgtctcagtc ccaatgtggc cgatcaacct ctcagattcg gctacgtatc atcaccttgg 240
 taggccgtta cccaccaaac tagttaatac gccgcggggtc catctaaaag cgatagnaga 300
 accatctttc atctaaggat catgcgatcc ttagagatat acggnattag cacctgtttc 360
 caagtgttat ccccttcttt taggcagggt acccacgtgt tactcaccg tccgccactc 420
 aacttcttac ggtgaatgca agcattcggg gtaagaaagt ttcgttcgac ttgcatgtat 480
 taggcacgcc gccagcggtc gtnatgagcc aggatcaaac tcta 524

<210> 11

Lista de secuencias modificada

159

<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
 gcntgggnga acggtcactg cggaacagtt actctcacgc acgttcttct ccaacaacag 60
 agctttacga gccgaaaccc ttcttcactc acgcggtggt gctccatcag gcttgcgccc 120
 attgtggaag attccctact gctgcctccc gtaggagtat ggaccgtgtc tcagttccat 180
 tgtggccgat cagtctctca actcggtat gcatcatcgc cttggtaagc cgttacctta 240
 ccaactagct aatgcaccgc aggtccatcc cagagtata gcaaagcca tctttcaaac 300
 aaaagccatg tggcttttgt tggtatgcgg tattagcatc tgtttccaaa tggtatcccc 360
 cgtccgggg caggttacct acgtgttact caccggtccg cactcactg gtgatccatc 420
 gtcaatcagg tgcaagcacc atcaatcagt tgggccagtg cgtacgactt gcatgtatta 480

Lista de secuencias modificada

160

ggcacaccgc cggcggttcac cctgagncag gacnaaaact ctaa

524

Lista de secuencias modificada

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P2922PC00		FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/EP2008/056768		International filing date (day/month/year) 02.06.2008		Priority date (day/month/year) 31.05.2007
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K35/74				
Applicant PULEVA BIOTECH, S.A.				
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>11</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau a total of <u>17</u> sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☒ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).				
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application				
Date of submission of the demand 2009-03-31			Date of completion of this report 15.09.2009	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465			Authorized officer Sirim, Pinar Telephone No. +49 89 2399-7732	



**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2008/056768

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on (*replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report*):

Description, Pages

1-25 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1-9 as originally filed

Claims, Numbers

1-17 as originally filed

Drawings, Sheets

1/11-11/11 as originally filed

- ☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing
3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☒ the description, pages 8, 16, 17, 22, 23
 - ☒ the claims, Nos. 1-17
 - ☒ the drawings, sheets/figs 2/11, 3/11, 5/11-11/11
 - ☒ the sequence listing (*specify*): 1-9
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).

163

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2008/056768

6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) have been received and taken into account in drawing up this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1, 2, 4</u>
	No: Claims	<u>3, 5-17</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	=
	No: Claims	<u>1-17</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-17</u>
	No: Claims	=

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

168
International application No.
PCT/EP2008/056768

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report was established on the basis of:

a. type of material:

- ☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material:

- ☒ on paper
☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing:

- ☒ contained in the international application as filed
☐ filed together with the international application in electronic form
☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
☐ received by this Authority as an amendment* on

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

* If item 4 in Box No. 1 applies, the listing and/or table(s) related thereto, which form part of the basis of the report, may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2008/056768

The Applicant has filed amended claims, amended pages of the description and an amended sequence listing wherein the Applicant's own internal designations of several bacterial strains have been replaced by the corresponding deposit numbers. As this information was not contained in the application as filed and the time limit set out in Rule 13bis.4(ii) PCT has expired, the introduction of the missing deposit accession numbers is considered to go beyond the disclosure in the international application as filed. Therefore, these amendments have not been taken into consideration when establishing the present report.

Re Item V.

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Documents

The following documents (D) have been taken into consideration:

- D1: WO 2004/003235 A (PULEVA BIOTECH S A [ES]; XAUS PEY JORDI [ES]; MARTIN JIMENEZ ROCIO [ES] 8 January 2004 (2004-01-08)
- D2: WO 2005/117532 A (BIOGAIA AB [SE]; BJOERKSTEN BENGT [SE]; MOELLSTAM BO [SE]; SJOEBERG EL) 15 December 2005 (2005-12-15)
- D3: WO 2005/034970 A (TEAGASC [IE]; UNIV CORK [IE]; ROSS PAUL [IE]; HALLAHAN STEPHEN [IE]) 21 April 2005 (2005-04-21)
- D4: WO 97/46104 A (BIOGAIA BIOLOG AB [SE]; CASAS IVAN A [US]; MOLLSTAM BO [SE]) 11 December 1997 (1997-12-11)
- D5: EP-A-0 577 904 (NESTLE SA [CH]) 12 January 1994 (1994-01-12)
- D6: OLIVARES M ET AL: "Antimicrobial potential of four Lactobacillus strains isolated from breast milk" JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 101, no. 1, July 2006 (2006-07), pages 72-79, XP002458357 ISSN: 1364-5072
- D7: HEIKKILA M P ET AL: "Inhibition of Staphylococcus aureus by the

766

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2008/056768

commensal bacteria of human milk" JOURNAL OF APPLIED
MICROBIOLOGY, OXFORD, GB, vol. 95, no. 3, 2003, pages 471-478,
XP002312462 ISSN: 1364-5072

2. Subject-matter of the application

The present application relates to a method of screening for probiotic microorganisms from milk which, after oral intake and/or topical application, are capable of protecting animals from mastitis caused by *S. aureus*, and to pharmaceutical compositions comprising said microorganisms useful for the treatment and/or prophylaxis of hypersensitivity reactions to food and metabolic intolerance, of constipation and other gastro-intestinal disorders (e.g. neonatal diarrhoea), of inflammatory or auto-immune disorders selected from the group of IBD, ulcerative colitis, arthritis, atherosclerosis, multiple sclerosis, psoriasis or sarcoidosis, and of tumour growth, metastasis and cancer in subject or animal in need thereof.

3. Prior art

D1, cited in the application, discloses a method for the selection of probiotic microbial strains, comprising the following steps: (i) selecting for non-pathogenic strains which are capable of surviving in fresh breast milk and/or amniotic fluid, and (ii) selecting for non-pathogenic strains which are able to be transferred to breast milk and/or amniotic fluid after oral intake in healthy individuals without colonizing other internal organs except mucosae. Further D1 discloses the lactic acid strains CEST 5711 (*Lactobacillus coryniformis*), CEST 5713 (*Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*), CEST 5714 (*Lactobacillus gasseri*, formerly *L. acidophilus*), CEST 5715 (*Lactobacillus gasseri*), CEST 5716 (*Lactobacillus fermentum*) isolated by said method. The same strains the antimicrobial activity thereof against *S. aureus* have also been disclosed by D6.

D2 discloses a method for selecting a lactic acid bacterial strain for oral administration to a woman for improving the woman's breast milk, comprising selecting a strain of *Lactobacillus* which increases the levels of anti-inflammatory IL-10 and decreases the level of TGF-beta-2 in breast milk when administered to women, thereby reducing the risk for the lactating mother to develop mastitis (see e.g. page 7, 14, claims 1-10).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2008/056768

D3 discloses the isolation a non-pathogenic food-grade probiotic bacterium from kefir grain for treating infectious diseases, e.g. localized infection of the skin, such as a mastitis infection caused by *S. aureus*. Here, the culture is supposed to be administered by direct intramammary injection.

D4 discloses the treatment of rotavirus induced diarrhoea by oral administration of *Lactobacillus reuteri*.

D5 discloses a *Bifidobacterium* strain for production of foods or pharmaceuticals, e.g. powdered milk formula, for treating gastrointestinal disorders.

D7 discloses that lactic acid bacteria (LAB) isolated from fresh milk. As stated in the abstract, the focus of the study of D7 is the detection of bacteria with antimicrobial activity against *S. aureus*, "known as the causative agent of maternal breast infections". Several samples of enterococci or LAB, such as *Ent. faecalis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lact. crispatus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconoctoc mesenteroides* were found to inhibit the growth of *S. aureus* (see table 3).

4. Novelty

The product claim 3 relating to the probiotic strains obtainable by the method of claim 1, to the supernatant of a culture of such a strain, to (pharmaceutical) compositions or to feed or nutritional products comprising said strains or relating to the therapeutic uses thereof the following objections are made:

The prior art already discloses several lactic bacteria of the genus *Lactobacillus* or *Bifidobacterium* isolated from milk which, after oral or topical administration, are useful for the treatment of infectious diseases such as mastitis caused by *Staphylococcus aureus* infections (see e.g. D2 or D7) or gastrointestinal disorders (see e.g. either of D1, D4-D6).

Technical features which would allow to unambiguously distinguish the claimed bacteria from those of the cited prior art are lacking. However, a product is not rendered novel merely by the fact that it is produced by means of a new/different process as those of the prior art disclosing the same product. Thus, although the selection process is novel, the probiotic strains obtainable thereby are not novel in

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2008/056768

light of the cited prior art.

Consequently, claims 3, 5 to 17 lack novelty according to Art. 33(2) PCT.

5. Inventive step

The subject-matter of claims 1 to 17 lacks inventive step for the following reasons:

Claim 1 is directed to a process for the selection of probiotics comprising the steps (i) to (iv) recited therein.

D1 discloses a method for the selection of probiotic microbial strains, comprising (i) a step for selecting for non-pathogenic strains which are capable of surviving in breast milk and/or amniotic fluid, and (ii) selecting for non-pathogenic strains which are able to be transferred to breast milk and/or amniotic fluid after oral intake in healthy individuals without colonizing other internal organs except mucosas. The same strains and the antimicrobial activity thereof have also been disclosed by D6 (see, for example, table 1 on page 75 of D6). Thus, at least D6 explicitly discloses the step of selecting strains which are able to reduce the rates of survival of *S. aureus* (corresponds to step (iii) of present claim 1).

From the prior art, e.g. D3 or D7, it was known that mastitis is caused by *Staphylococcus aureus* infections and that probiotic bacteria can be isolated from milk and can be used to treat this disease.

Each of D1 or D6 may be considered to represent the closest state of the art which discloses steps (i) to (iii). The closest prior art does not disclose step (iv) of present claim 1, namely the step of selecting those strains from step (iii) that are capable of protecting animals from mastitis.

Thus, in light of the closest prior art D1/D6 the problem underlying the application may be formulated as "the provision of a method to isolate probiotic bacteria from fresh milk of mammalian origin useful in the treatment of a further *S. aureus* caused disease".

The present application solves this problem by the provision of a selection method as described in present claim 1 which involves the selection of strains which are

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2008/056768

capable of protecting animals from mastitis.

However, this solution is regarded to be obvious in the light of either of D1 or D6 combined with the teachings of either of D3 or D7. The closest prior art document discloses all steps of the selection procedure of claim 1 for selecting probiotic strains except of step (iv), namely the selection of strains from step (iii) that are capable of protecting animals from mastitis. Thus, when compared to the closest prior art, the present application just mentions one further disease associated with *S. aureus*. The connection of *S. aureus* and mastitis, however, is already disclosed by any of D3 or D7. Therefore, the provision of probiotic strains capable of protecting from mastitis is obvious in the light of D1/D6 when combined with D3 or D7.

Consequently, the subject-matter of claims 1 to 17 is not inventive in the sense of Art. 33(3) PCT.

Even if it is considered that either of D3 or D7 represent the closest state of the art, the present claims lack inventive step for the following reasons:

In the light of any of these documents, the technical problem to be solved can be seen as "the provision of an alternative method for the isolation of probiotic bacteria suitable for the treatment of mastitis".

From the cited prior art, e.g. D1/D6 or D7, it was known that probiotic bacteria which are useful for the inhibition of *S. aureus* naturally colonise the breast of female mammals, that these bacteria are secreted from the mammary gland into the breast milk, and that they can be isolated therefrom. In the light of these disclosures, it is obvious that these probiotic bacteria have to be transported by natural routes to enter the mammary gland. These routes may include, either an oral uptake and then the transport from the maternal gut via the lymph or blood stream or a topical uptake via the skin to the mammary glands. Thus, it is not surprising that probiotic bacteria which have been isolated from breast milk are capable of colonising the mammary gland after oral or topical application.

Therefore, it is considered that it comes within the scope of the skilled person to adapt the methods of D3 or D7 and to perform an additional step for the selection

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2008/056768

of probiotic bacteria which are able to colonise the mammary gland after oral uptake or topical application.

Consequently, it is considered that the subject-matter of present also claims lacks inventive step in the light of D3 or D7 when combined with D1 or D6.

6. Further remarks

It should be noted that as a consequence of the objections made above under items 4 and 5, the present application in principle also lacks unity of invention as required by Rule 13 PCT.

However, due to the serious defects mentioned above, at the present stage it appears not to be expedient to raise a non-unity objection.

Re Item VIII.

Clarity and disclosure

1. The subject-matter of claims 10, 13, 14 and 15 is unclear and its subject-matter is not sufficiently disclosed by the present application for the following reasons (Art. 6 and 5 PCT):

The process of claim 1 is directed to the identification of bacteria which inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, the causative agent of mastitis. Therefore it is unclear how diseases which are not related to mastitis or are not caused by *Staphylococcus aureus* or other bacterial infections can be treated with the bacteria identified by the process of claim 1.

2. In claim 4 reference is made to biological material which has been deposited. Several of these strains are solely characterized by the Applicant's own internal designations.

However, the Applicant has not supplied the information required by Rule 13bis PCT with regard to said deposits, namely the accession numbers of said deposits, within the time limit set out in Rule 13bis.4(ii) PCT. It should be noted, that after expiry of said time limit, the introduction of the missing deposit accession numbers is not possible.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2008/056768

Consequently, claim 4 contravenes the requirements of Art. 5 PCT.

number of attached cells is measured by direct inspection of the cell monolayers under light microscopy. Moreover, the selection step (iii) may also or alternatively involve measuring the viability of *S.aureus* in the presence of the probiotic strains. Any assay suitable for measuring growth inhibition of bacterial strains may be used.

- 5 Typically, the assessment of *S.aureus* viability is carried out by an agar well diffusion assay.

- In step (iv), any assay to measure protection of mastitis can be used. Preferably, the assay involves using an animal model of mastitis wherein at least one of the pathogens
10 known to be the causative agent of mastitis is injected into the mammary gland. More preferably, the animal model is a mouse and the pathogen that needs to be administered to cause mastitis is *S.aureus*.

- In another aspect, the invention provides a probiotic strain which is obtainable by the
15 process of the invention. Preferably, the probiotic strain is selected from the group of *Bifidobacterium breve* deposited in the CECT under Accession N° 7263, *Bifidobacterium breve* deposited in the CECT under Accession N° 7264, *Lactobacillus reuteri* deposited in the CECT under Accession N° 7260, *Lactobacillus plantarum* deposited in the CECT under Accession N° 7262, *Lactobacillus fermentum* in the CECT
20 under Accession N° 7265, *Lactobacillus reuteri* deposited in the CECT under Accession N° 7266, *Lactobacillus salivarius* deposited in the CECT under Accession N° 7409, *Enterococcus hirae* deposited in the CECT under Accession N° 7410, *Enterococcus faecalis* deposited in the CECT under Accession N° 7411; *Lactobacillus plantarum* deposited in the CECT under Accession N° 7412, *Lactobacillus reuteri* deposited in the
25 CECT under Accession N° 7413.

- In a further aspect, the invention provides a supernatant of a culture of one or more of the strains according to the invention. The supernatant can be obtained from the culture by any means available to the skilled person, including centrifugation, filtration,
30 flotation and the like.

- *Enterococcus faecalis* said bacteria being obtained from feline milk
- *Lactobacillus plantarum* said bacteria being obtained from feline milk
- *Lactobacillus reuteri* said bacteria being obtained from canine milk

5

Example 2: Physiologic and genetic characterization

All these isolates were physiological and genetically characterized. For the identification of each probiotic strain, we performed a fermentation API 50CH
10 (BioMerieux) analysis of the strains at 37°C in anaerobic conditions for 24 and 48 hours, following the manufacturer instructions. The 24 hours results were summarized in Table I. A positive fermentable substrate is that with a value higher than 3.

Due to the low specificity of the API characterization, we also performed the analysis of
15 the 16S rRNA sequences of the selected bacterial strains. The 16S RNA sequence of the selected bacteria and their RAPD-PCR profile are shown in Figure 1. The results obtained led to the classification of the bacterial strains as indicated above. With this classification the bacterial strains of the invention were deposited according to the Budapest Agreement at the CECT -Colección Española de Cultivos Tipo-, Valencia
20 (Spain) on April 17th 2007 and accorded the following accession numbers:

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

The following bacterial strains of the invention were deposited according to the
30 Budapest Agreement at the CECT -Colección Española de Cultivos Tipo-, Valencia (Spain) on May 30th, 2008

- *Lactobacillus salivarius* CECT 7409

- *Enterococcus hirae* CECT 7410
- *Enterococcus faecalis* CECT 7411
- *Lactobacillus plantarum* CECT 7412
- *Lactobacillus reuteri* CECT 7413

5

Table I: Fermentation pattern of the different probiotic strains of the invention Positive fermentable substrates are indicated in grey.

TEST	7203	7204	7200	7202	7205	7206	7413	7412	7402	7411	7410
Glycerol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Erythritol	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
D-Arabinose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5
L-Arabinose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Ribose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Xylose	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
L-Xylose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5
Adonitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5
D-Methyl-xyloside	0	0	0	0	0	5	0	0	0	5	5
Gelactose	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
D-Glucose	5	5	5	5	5	5	0	5	5	0	0
D-Fructose	5	5	0	5	5	0	5	5	5	0	0
D-Mannose	1	0	0	5	5	0	0	5	5	0	0
L-Sorbose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Rhamnose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Dulcitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inositol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mannitol	4	0	0	5	5	0	0	5	5	5	5
Sorbitol	5	0	0	5	5	0	0	5	5	5	5
D-Methyl-D-mannoside	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
D-Methyl-D-glucoside	2	0	0	0	5	0	0	0	0	5	5
N-Acetyl-glucosamine	2	1	0	5	5	0	5	5	5	5	5
Amygdaline	0	1	0	5	0	0	0	5	0	5	5
Arbutine	0	0	0	5	0	0	0	5	0	5	5
Esculine	5	5	0	5	0	0	0	5	5	5	5
Salicine	1	0	0	5	0	0	0	5	0	0	5
Cellulose	5	0	0	5	0	0	0	5	5	5	5
Maltose	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Lactose	5	0	5	5	5	5	5	5	5	0	0
Melibiose	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0
Saccharose	5	0	5	0	5	5	5	0	5	0	0
Trehalose	0	0	0	5	0	0	0	5	5	1	5
Inuline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Melazitose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Raffinose	5	0	5	5	5	5	0	5	5	0	0
Amidon	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glycogene	5	5	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Xylitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Gentobiose	0	2	0	5	0	0	0	5	0	0	0
D-Turanose	5	4	0	5	0	0	0	5	0	0	0
D-Lyxose	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0
D-Tagatose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
D-Fucose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
L-Fucose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Arabitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Arabitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gluconate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-cabo-gluconate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-cabo-gluconate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

Example 3: Selective screening of the strains

15 Example 3a: Transfer to the mammary gland after oral intake

AS

The antibiotic resistance of the probiotic strains of this invention is summarized in
5. Table II.

Table II: Antibiotic resistance of the different probiotic strains of the invention

	7263	7264	7260	7262	7265	7266	7413	7412	7409	7411	7410
Penicillin	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S
Ampicilin	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S
Ciprofloxacin	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Erythromycin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Clindamicin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Tetracycline	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
Vancomycin	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S
Gentamicin	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Cloramphenicol	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Rifampicine	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R

10

Example 4d: Production of antimicrobial metabolites

It has been suggested that the main mechanism used by probiotics is controlling the balance between useful and harmful intestinal bacteria is the gut. When the number of
15 useful bacteria is reduced, opportunistic bacteria could over-grow and disturb the well-being of the host or even induce an infection. Most bacterial organisms have acquired characteristics or mechanisms that reduce the growth capabilities of other microorganisms that cohabituate with them and thus, enabling their selective growth. The reduction of pH through acid production by lactic acid bacteria is one of such
20 mechanisms. Moreover, some lactic acid bacteria also produce bioactive peptides components and other metabolites that selective inhibit the growth of other bacteria, yeast or fungi. This is the case of reuterin (an aldehyde) or bacteriocins (peptides, such as nisin or pediocin PA-1).

25 The probiotic strains of this invention were assessed for their capability to produce bactericidal metabolites using an agar well diffusion assay. TSA agar plates containing 10⁶ cfu/ml of different pathogenic bacteria strain were prepared and assayed as previously indicated in Example 3b for *S. aureus*. Results obtained were described in Table III.

Table III: pathogen inhibitory potential of the different probiotic strains of the invention :

	7413	7412	7409	7411	7410	7263	7264	7260	7262	7265	7266
<i>E. faecium</i> P21	+	+	+	-	-	+++	+++	+	+	+++	+++
<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> RJM1	+++	+++	+++	+	+	+	+++	++	+++	+++	+/-
<i>S. enteritidis</i> 4396	+++	+++	+++	++	++	+/-	++	++	+++	+++	++
<i>K. pneumoniae</i> CECT142	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+	+++	++
<i>K. oxytoca</i> CECT860T	+/-	+	+++	++	++	+++	+++	+/-	+/-	+/-	++
<i>P. vulgaris</i> CECT484	++	++	++	+	+	+/-	+	+++	+++	+++	+/-
<i>S. aureus</i> CECT5191	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++
<i>S. epidermidis</i> CECT231	++	++	+++	++	++	++	+++	+++	++	++	++

Example 5: Effect of the probiotic strains of this invention on translocation of *Salmonella typhimurium* in mice following immunization with inactivated *Salmonella* vaccine

Translocation of gram-negative bacteria across the gut epithelium can occur especially in subjects following gastrointestinal infection, disease or surgery. Left untreated it can lead to endotoxemia. In this example, the effect of feeding the probiotic strains of this invention on the translocation of the gut pathogen *Salmonella typhimurium* was examined.

Male Balb/c mice (6-8 weeks old) were daily fasted with 1×10^8 cfu in 0.2 ml of milk or milk alone for two weeks. After that, mice were either orally immunized or not with an inactivated *Salmonella* vaccine (10^8 cfu inactivated with paraphormaldehyde in 0.2 ml milk). After immunization, mice were fasted two weeks more with the probiotic preparations in alternate days for two weeks more. Two weeks after oral immunization, all mice were orally challenged with live *S. typhimurium* (10^{10} cfu in 0.2 ml milk).

AMENDED CLAIMS

- 1- A process for the selection of probiotics comprising the steps of :
 - (i) isolating lactic acid bacteria or bifidobacteria strains present in the fresh milk
5 from a mammalian species by selection in lactic acid culture media,
 - (ii) selecting those strains from step (i) that are capable of being transferred to
the mammary gland after oral intake and/or colonise the mammary gland
after its topic application,
 - (iii) selecting those strains from step (ii) which are able to reduce the rates of
10 survival and/or the rates of adhesion to epithelial cells of *Staphylococcus aureus* and
 - (iv) selecting those strains from step (iii) that are capable of protecting animals
from mastitis.
- 15 2- A process according to claim 1 wherein the milk used in step (i) is selected from human, porcine, bovine, cat, ovine and canine milk.
- 3- A probiotic strain obtainable by the process according to claims 1 or 2.
- 20 4- A probiotic strain according to claim 3 characterised in that the strain is selected from the group of *Bifidobacterium breve* deposited in the CECT under Accession N° 7263, *Bifidobacterium breve* deposited in the CECT under Accession N° 7264, *Lactobacillus reuteri* deposited in the CECT under Accession N° 7260, *Lactobacillus plantarum* deposited in the CECT under Accession N° 7262,
25 *Lactobacillus fermentum* in the CECT under Accession N° 7265 and *Lactobacillus reuteri* deposited in the CECT under Accession N° 7266, *Enterococcus hirae* deposited in the CECT under Accession N° 7410, *Lactobacillus plantarum* deposited in the CECT under Accession N° 7412, *Enterococcus faecalis* deposited in the CECT under Accession N° 7411,
30 *Lactobacillus salivarius* deposited in the CECT under Accession N° 7409, *Lactobacillus reuteri* deposited in the CECT under Accession N° 7413.

- 5- A supernatant of a culture of a strain or of a mixture of strains as defined in claims 3 or 4.
- 6- A probiotic strain according to claims 3 or 4 or a mixture of strains according to claims 3 or 4 or a supernatant according to claim 5 for use as a medicament.
- 7- A composition, a pharmaceutical product, a feed or a nutritional product comprising at least a probiotic strain according to claims 3 or 4 or a supernatant as defined in claim 5.
- 8- A composition, pharmaceutical product, feed or nutritional product as defined in claim 7 which is in a frozen, lyophilized or dried form.
- 9- A composition, pharmaceutical product, feed or nutritional product as defined in claims 7 or 8 wherein the probiotic strain or the mixture thereof is in a partially or totally inactivated form.
- 10- Use of a probiotic strain according to claims 3 or 4 or a mixture thereof or a supernatant as defined in claim 5 for the manufacture of a medicament for the treatment and/or prophylaxis of a chronic or acute infection or infestation, or of an undesirable microbial colonization, wherein the infection, infestation or colonization is caused by parasites, bacteria, yeast, fungi or viruses, affecting any body surface or mucosa in a subject or animal in need thereof.
- 11- Use according to claim 10 wherein the infection is mastitis and the probiotic strain has been selected in step (i) using milk from the same species that is intended to be treated.
- 12- Use according to claim 10 wherein the infection is neonatal diarrhoea.
- 13- Use of a probiotic strain according to claims 3 or 4 or a mixture thereof or a supernatant as defined in claim 5 for the manufacture of a medicament for the treatment and/or prophylaxis of hypersensitivity reactions to food and metabolic

intolerance; of constipation and other gastro-intestinal disorders; of inflammatory or auto-immune disorders selected from the group of IBD, ulcerative colitis, arthritis, atherosclerosis, multiple sclerosis, psoriasis or sarcoidosis; and of tumour growth, metastasis and cancer in subject or animal in need thereof.

5

14- Use of a probiotic strain according to claims 3 or 4 or a mixture thereof or a supernatant as defined in claim 5 for the manufacture of a medicament for the treatment and/or prophylaxis of allergic disorders and asthma in a subject or animal in need thereof.

10

15- Use of a probiotic strain according to claims 3 or 4 or a mixture thereof or a supernatant as defined in claim 5 for the manufacture of a medicament for treatment and/or prophylaxis of temporally depressed immune levels in individuals or animals subjected to physiological and management-derived stress.

15

16- Use according to claims 10 to 15 wherein the strain or composition is administered via oral, topic, nasal, enteral, ocular, urogenital, rectal or vaginal.

20

17- Use according to claims 10 to 15 wherein the strain, composition, pharmaceutical product, feed or nutritional product is designed to be administered to lactating woman or animal for the therapeutic or prophylactic treatment of the foetus and/or their breastfed babies or pups.

2/11

***Lactobacillus fermentum* (CECT under Accession N° 7265)**

TACACGATATGAACAGNTTACCTCTCATACGGTGNNTTCTTCTTTAACAACAGAGCTTT
ACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCCATTG
TGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTG
TGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAGGCCGTTACCCCA
CCAACAAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTA
AGCGTTGTTTCATGCGAACAACGNTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTG
TCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTACCCGTCGCGCCACTCGTTGGCG
ACCAAAATCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAATTGGGCCAACGCGTTCGACTTGC
ATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAANTCTAA

***Lactobacillus reuteri* (CECT under Accession N° 7266)**

ACCGNGGGNNAACGACACTGCGNGNACAGNTTACTCTCACGCACGNTTCTTCTCCAAC
AACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCT
TGCGCCCATTTGTGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCT
CAGTTCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGTTAAG
CCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAG
CCATCTTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTT
CCAAATGTTATCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCGCGCA
CTCACTGGTGATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGC
GTACGACTTGCATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAANT
CTAA

***Enterococcus hirae* (CECT under Accession N° 7410)**

GACAGTTACTCTCATCCTTGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTT
CTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTACAGCTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTG
CTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCTCTCA
GGTCGGCTATGCATCGTCGCCCTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCACCG
CGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGCGGTTTCG
ATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTGATGGGCAGGTTA
CCCACGTGTTACTCACCCGTTGCCACTCCTCTTTTTCCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGG
AAAAGAAGCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAG
GT

***Lactobacillus plantarum* (CECT under Accession N° 7412)**

TACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCA
CTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTG
GCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCYACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGA
CCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGT
TATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCGCTTCTGGGCAGGTTCCAC
GTGTTACTCACCAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCATCAA
TACCAGAGTTCGTTGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAG

Figure 1B

3/11

***Enterococcus faecalis* (CECT under Accession N° 7411)**

CTATCATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGG
AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTG
GAAACAGGTGCTAATAACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGC
TTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGC
TCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGT
CTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTA
GAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCCAGCA

***Lactobacillus salivarius* (CECT under Accession N° 7409)**

GGGTGGGGNGANCAGAACATGAAATGAACAGTTTACATCTCACCTCGCTGNTTCTTCCT
CTAACAACAGAGCTTTTACGACTCCGAAGGACCTTCTTCACATCAGCGGGCGTNTGCTC
CATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGG
CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGATTTCGGCTACGTATCATCACC
TTGGTAGGCCGTTACCCACCAACTAGTTAATACGCCGCGGGTCCATCTAAAAGCGATA
GNAGAACCATCTTTCATCTAAGGATCATGCGATCCTTAGAGATATACGGNATTAGCACC
TGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTTTTAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCC
GCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTCGGTGTAAGAAAGTTTCGTTTCGACTT
GCATGTATTAGGCACGCCGCGCAGCGTTCGTNATGAGCCAGGATCAAACCTCTA

***Lactobacillus reuteri* (CECT under Accession N° 7413)**

GCNTGGGNGAACGGTCACTGCGGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACA
GAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGC
CCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTTC
CATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGTTAAGCCGTTAC
CTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTT
CAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAATGTT
ATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCACTGGTG
ATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACTTGC
ATGTATTAGGCACACCGCGCGGCTTCATCCTGAGNCAGGATCNAACTCTAA

Figure 1C

182

5/11

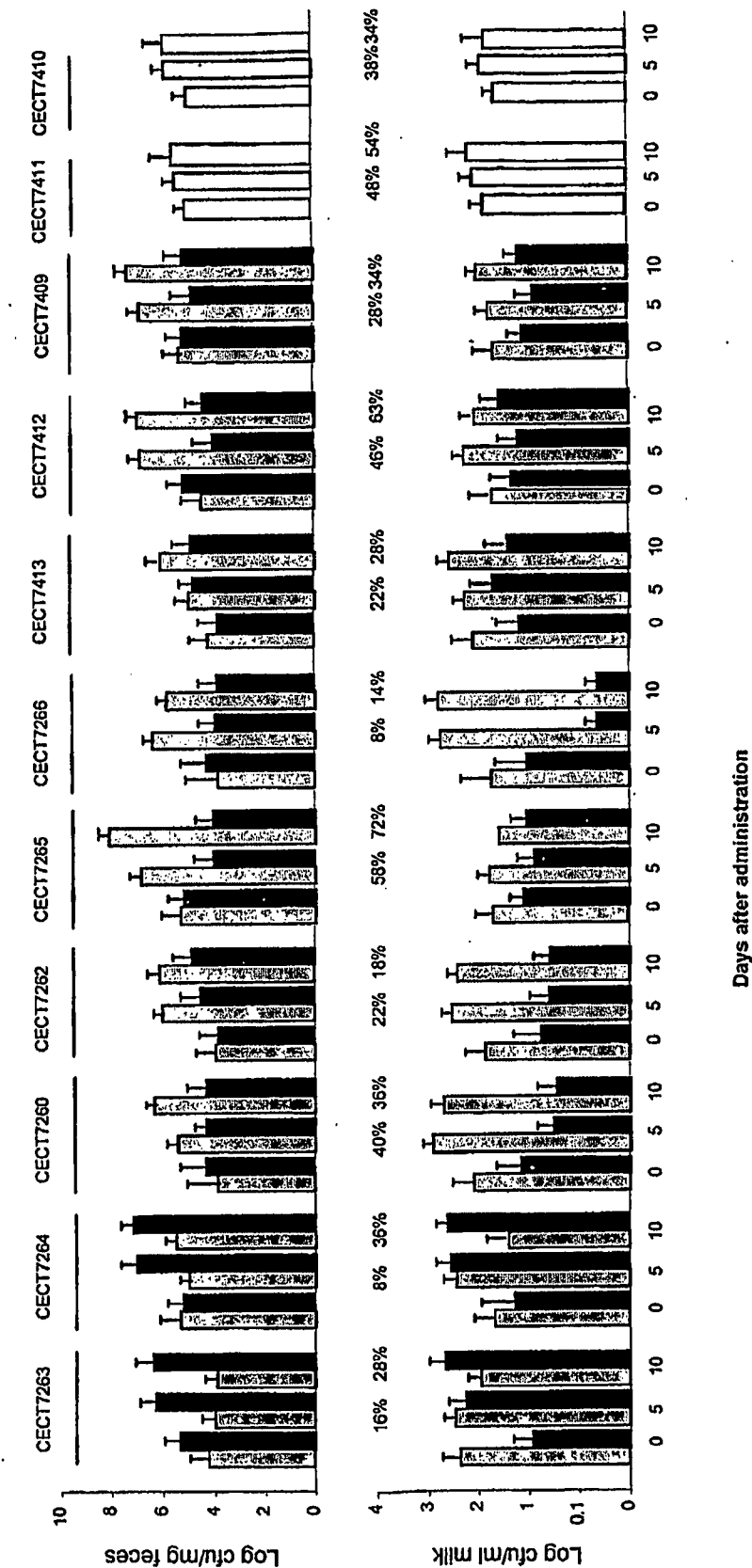


Figure 2

6/11

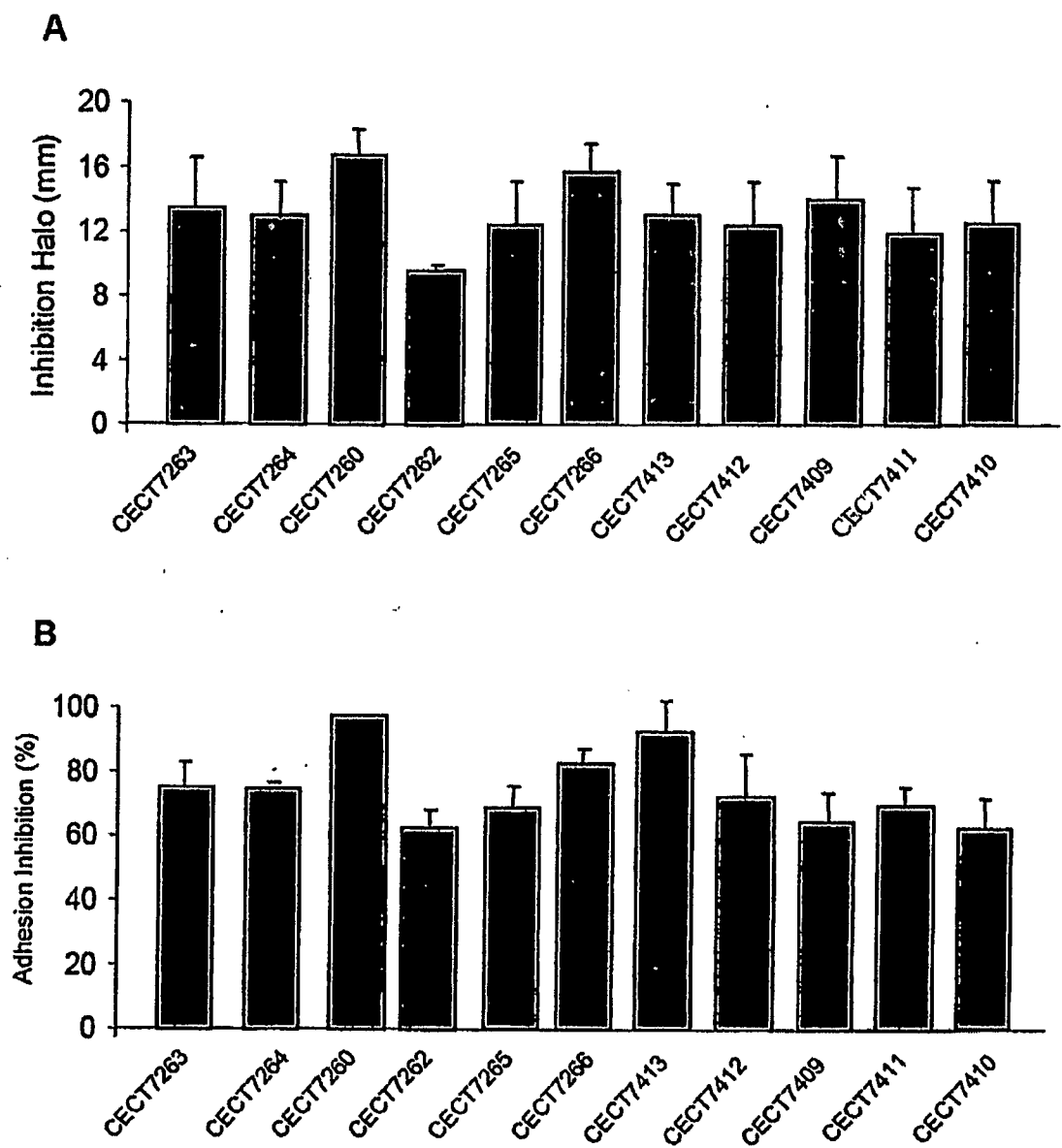


Figure 3

7/11

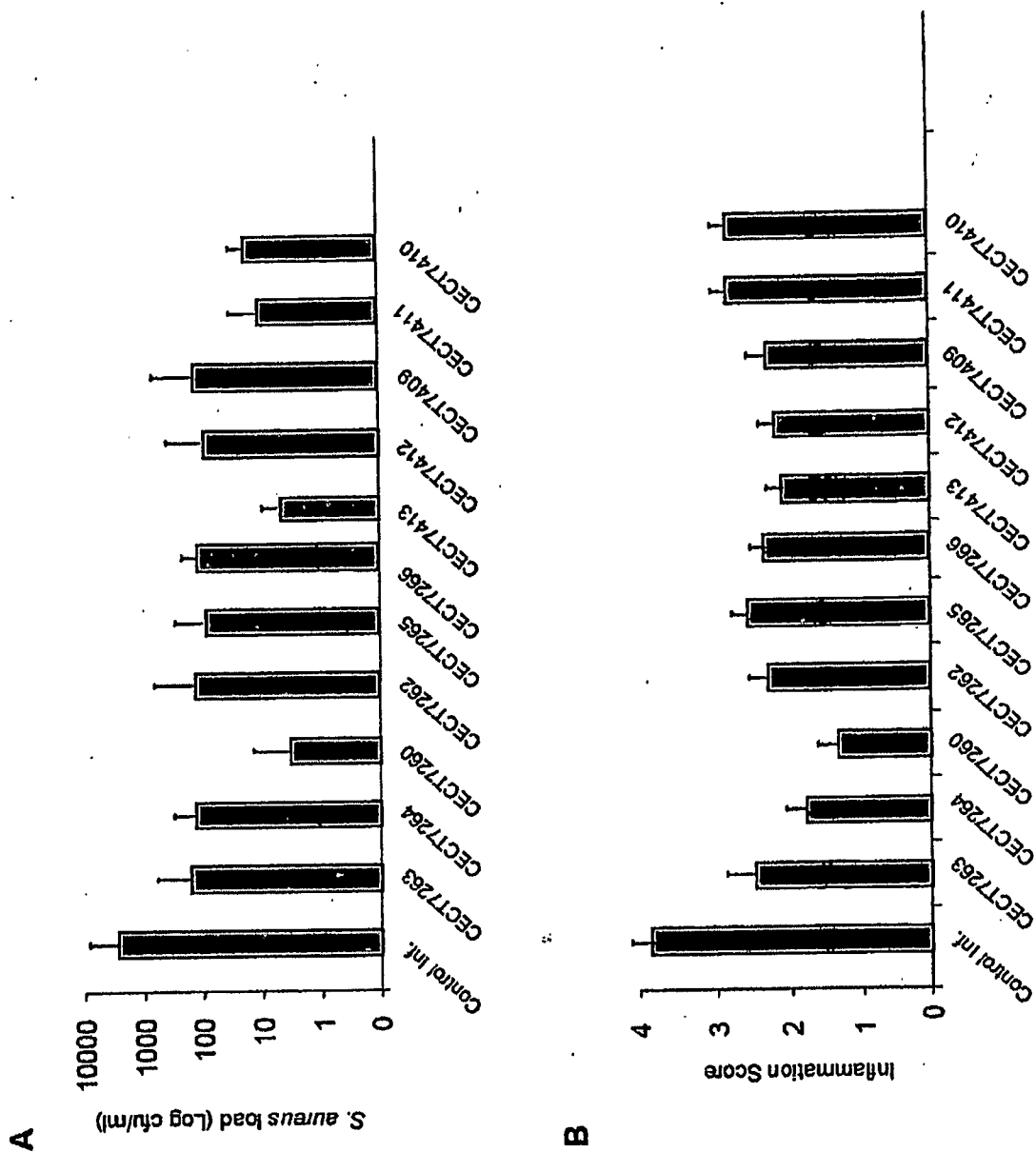


Figure 4

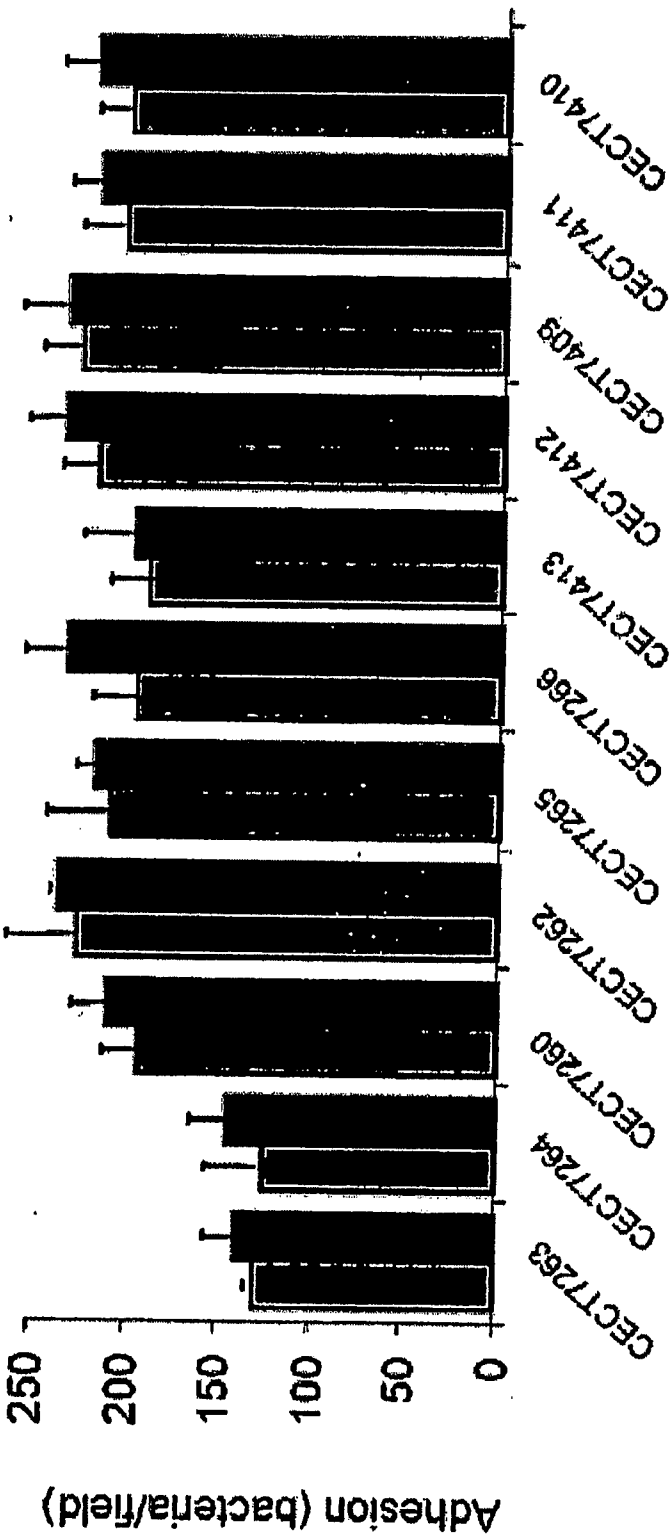


Figure 5

86

9/11

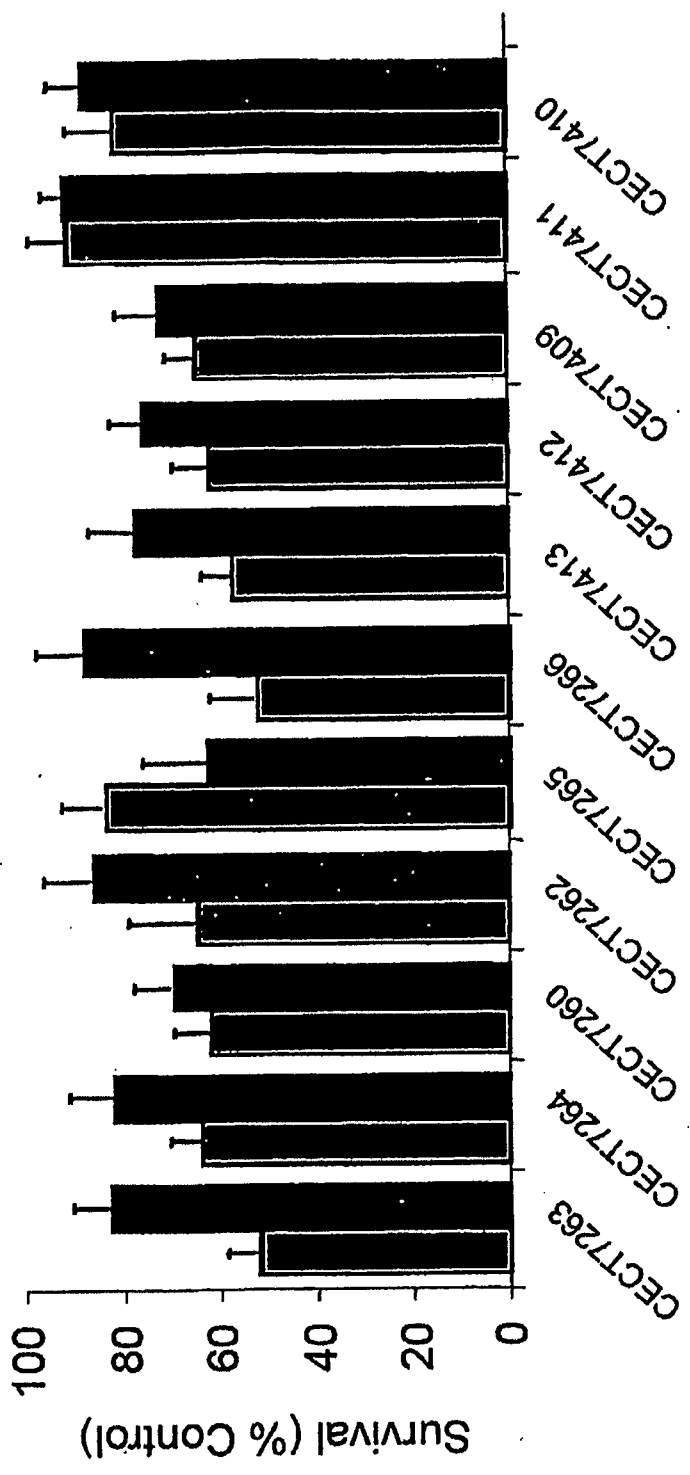
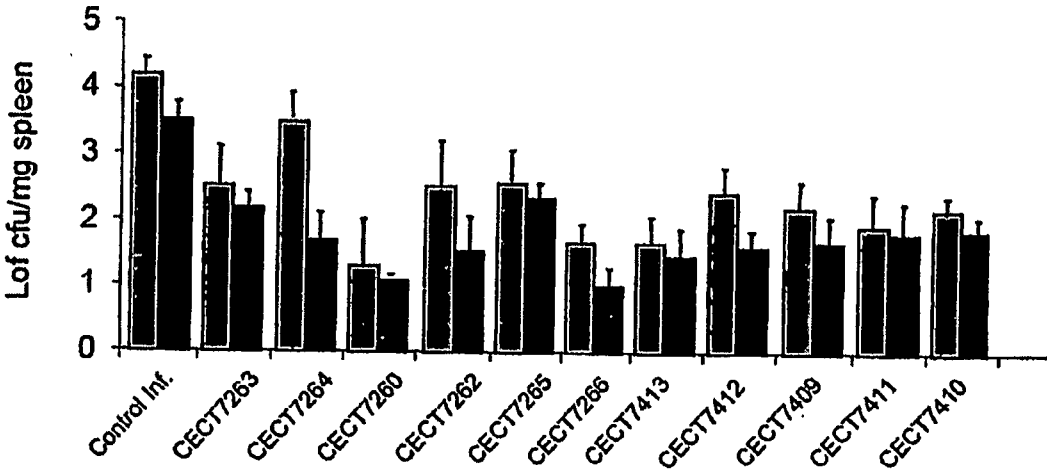


Figure 6

A



B

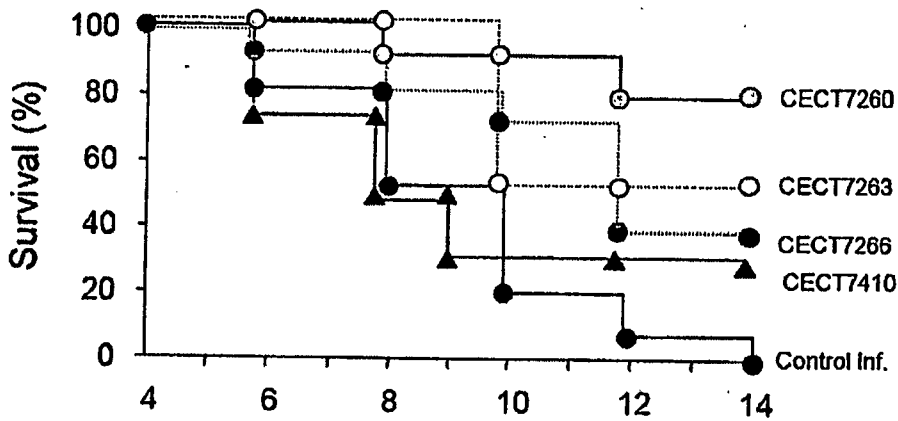


Figure 7

11/11

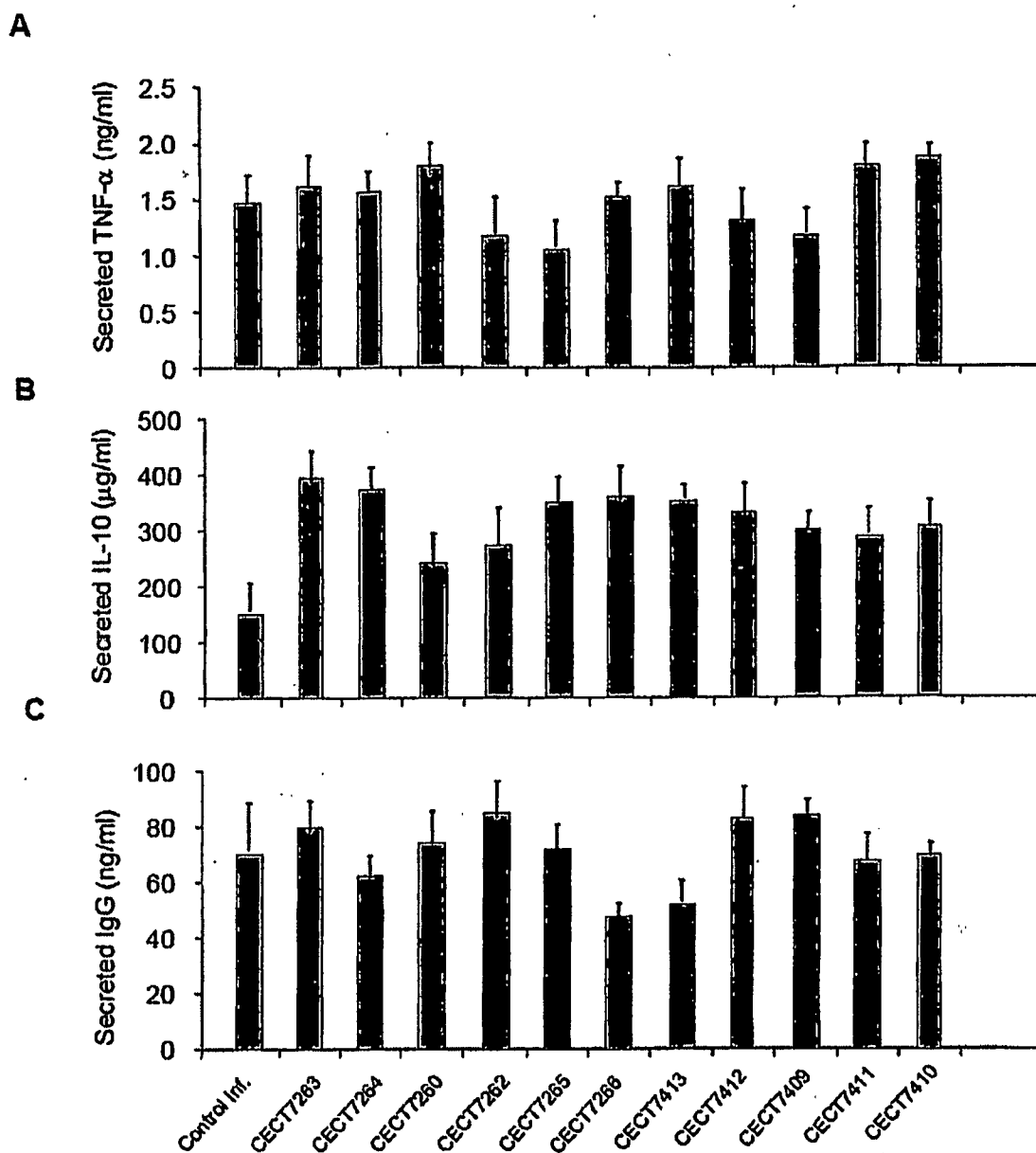


Figure 8

189

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 December 2008 (04.12.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/145756 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 35/74 (2006.01) A23L 1/03 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01) C12R 1/225 (2006.01)
C12Q 1/24 (2006.01) C12R 1/25 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2008/056768

(22) International Filing Date: 2 June 2008 (02.06.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

07380158.1 31 May 2007 (31.05.2007) EP

[ES/ES]; Santa Isabel, 36, E-18110 Granada (ES). **FER-NÁNDEZ ÁLVAREZ, Leónides** [ES/ES]; Monasterio de Poyo, 24 - 2ª, E-28049 Madrid (ES). **SOBRINO ABUJA, Odón Julián** [ES/ES]; Avda. Europa, 30 - portal 6 izqda, bajo C, E-28224 Pozuelo De Alarcón - Madrid (ES). **XAUS PEI, Jordi** [ES/ES]; Avda. Cervantes, 16 - Edif. Ciudad Real 7ºG Izqda., E-18008 Granada (ES). **RODRÍGUEZ GÓMEZ, Juan Miguel** [ES/ES]; Hierbabuena, 16 - 6, E-28770 Colmenar Viejo - Madrid (ES). **DELGADO PALACIO, Susana** [ES/ES]; Padre Suárez, 29; sótano, posterior dcha., E-33009 Oviedo - Asturias (ES).

(74) Agent: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L., Avenida de Burgos, 16D, Edificio Euromor, E-28036 Madrid (ES).

(71) Applicant (for all designated States except US): **PULEVA BIOTECH, S.A.** [ES/ES]; Camino de Purchil, 66, E-18004 Granada (ES).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **MARTÍN JIMÉNEZ, Rocío** [ES/ES]; Gregorio Marañón, 8 - 7ºC, E-11202 Algeciras - Cádiz (ES). **OLIVARES MARTÍN, Mónica** [ES/ES]; Avda. Almendros, 162, E-18198 Huetor Vega - Granada (ES). **JIMÉNEZ QUINTANA, Esther Antonia** [ES/ES]; Travesía de la Cerca, 2, portal nº1 - 2ºC, E-28460 Los Molinos - Madrid (ES). **MARÍN MARTÍNEZ, María Luisa** [ES/ES]; Pasaje Hoyo de Manzanares, 6 - 1º izqda, E-28002 Madrid (ES). **SIERRA ÁVILA, Saleta** [ES/ES]; Pintor Zuloaga, 14 - 5ºB, E-18005 Granada (ES). **MALDONADO BARRAGÁN, Antonio** [ES/ES]; La Laguna, 45, E-41100 Coria Del Río - Sevilla (ES). **MARTÍN MERINO, Virginia** [ES/ES]; Peñascales, 2 - 1ºE, E-28028 Madrid (ES). **BLANCH MARTELL, Francesc** [ES/ES]; Canet, 37, baixos, 4ª, E-08017 Barcelona (ES). **TORRE LLOVERAS, Celina** [ES/ES]; Ávila, 42, E-08195 Sant Cugat Del Vallés - Barcelona (ES). **LARA VILLOSLADA, Federico** [ES/ES]; Ciruelos, 18, E-18220 Albolote - Granada (ES). **ARROYO RODRÍGUEZ, Rebeca** [ES/ES]; Canillas, 4 - 2º 4, E-28850 Torrejón De Ardoz - Madrid (ES). **BOZA PUERTA, Julio** [ES/ES]; Sala Dos Hermanas, 81, E-18008 Granada (ES). **JIMÉNEZ LÓPEZ, Jesús**

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(54) Title: MAMMALIAN MILK MICROORGANISMS, COMPOSITIONS CONTAINING THEM AND THEIR USE FOR THE TREATMENT OF MASTITIS

(57) Abstract: The present invention relates to a novel approach to prevent or treat mastitis both in humans and animals through the use of mammal milk-derived microorganisms obtained from healthy hosts of the homologous species; to those new probiotic microorganisms obtained from milk able to reduce infectious mastitis and the method of screening used for their obtaining; to the use of these probiotic bacteria for the prophylaxis or treatment against mastitis and other diseases; and finally, to compositions comprising these compounds.

WO 2008/145756 A1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/056768

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K35/74 A23C9/12 C12Q1/24 A23L1/03
ADD. C12R1/225 C12R1/25

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23C A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EP0-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/003235 A (PULEVA BIOTECH S A [ES]; XAUS PEY JORDI [ES]; MARTIN JIMENEZ ROCIO [ES] 8 January 2004 (2004-01-08) cited in the application the whole document	1-17
X	WO 2005/117532 A (BIOGAIA AB [SE]; BJOERKSTEN BENGT [SE]; MOELLSTAM BO [SE]; SJOEBERG EL) 15 December 2005 (2005-12-15) the whole document	1-17
X	WO 2005/034970 A (TEAGASC [IE]; UNIV CORK [IE]; ROSS PAUL [IE]; HALLAHAN STEPHEN [IE]) 21 April 2005 (2005-04-21) cited in the application the whole document	1-17

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 September 2008

Date of mailing of the international search report

14/10/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sirim, Pinar

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/056768

191

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/46104 A (BIOGAIA BIOLOG AB [SE]; CASAS IVAN A [US]; MOLLSTAM BO [SE]) 11 December 1997 (1997-12-11) the whole document	1-17
X	EP 0 577 904 A (NESTLE SA [CH]) 12 January 1994 (1994-01-12) the whole document	1-17
X	OLIVARES M ET AL: "Antimicrobial potential of four Lactobacillus strains isolated from breast milk" JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 101, no. 1, July 2006 (2006-07), pages 72-79, XP002458357 ISSN: 1364-5072 the whole document	1-17
X	HEIKKILA M P ET AL: "Inhibition of Staphylococcus aureus by the commensal bacteria of human milk" JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, OXFORD, GB, vol. 95, no. 3, 2003, pages 471-478, XP002312462 ISSN: 1364-5072 the whole document	1-17
X	KAUR I P ET AL: "Probiotics: Potential pharmaceutical applications" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 15, no. 1, February 2002 (2002-02), pages 1-9, XP002232457 ISSN: 0928-0987 the whole document	1-17
A	JACOBSEN C N ET AL: "Screening of probiotic activities of forty-seven strains of Lactobacillus spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 65, no. 11, November 1999 (1999-11), pages 4949-4956, XP002232455 ISSN: 0099-2240 the whole document	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/056768

192

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004003235	A	08-01-2004	AT 402993 T	15-08-2008
			AU 2003242763 A1	19-01-2004
			CA 2490016 A1	08-01-2004
			JP 2005536197 T	02-12-2005
			NZ 537706 A	28-03-2008
			US 2004057943 A1	25-03-2004
WO 2005117532	A	15-12-2005	AU 2005249338 A1	15-12-2005
			BR PI0510198 A	02-10-2007
			CA 2560472 A1	15-12-2005
			CN 1942197 A	04-04-2007
			EP 1758604 A2	07-03-2007
			KR 20080034212 A	18-04-2008
			US 2005271641 A1	08-12-2005
WO 2005034970	A	21-04-2005	EP 1675603 A1	05-07-2006
			IE 20030773 A1	20-04-2005
WO 9746104	A	11-12-1997	AT 281840 T	15-11-2004
			AU 734194 B2	07-06-2001
			AU 3154897 A	05-01-1998
			BR 9710689 A	17-08-1999
			CA 2257077 A1	11-12-1997
			DE 69731540 D1	16-12-2004
			DE 69731540 T2	27-10-2005
			EP 0923293 A1	23-06-1999
			ES 2232869 T3	01-06-2005
			JP 2000512634 T	26-09-2000
			PL 330324 A1	10-05-1999
			PT 923293 T	31-03-2005
			US 5837238 A	17-11-1998
EP 0577904	A	12-01-1994	AT 153063 T	15-05-1997
			AU 673525 B2	14-11-1996
			AU 4158793 A	13-01-1994
			CA 2099856 A1	07-01-1994
			CZ 9301343 A3	16-02-1994
			DE 69219768 D1	19-06-1997
			DK 577904 T3	27-10-1997
			EP 0768375 A1	16-04-1997
			ES 2102485 T3	01-08-1997
			FI 933002 A	07-01-1994
			GR 3024219 T3	31-10-1997
			HK 1000143 A1	24-12-1997
			HU 68567 A2	28-06-1995
			IE 930482 A1	12-01-1994
			JP 2916350 B2	05-07-1999
			JP 6315373 A	15-11-1994
			NO 932408 A	07-01-1994
			NZ 248057 A	28-08-1995
			PL 299542 A1	21-02-1994
			RO 115175 B1	30-11-1999
			RU 2126446 C1	20-02-1999
			SK 280682 B6	12-06-2000
			SK 71293 A3	06-07-1994

193

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-149368- -00000-0000

Fecha: 2009-12-30 17:41:57 Dep. 2020 DIR.NULVASCH
Tra. 11 PATENTILYII Eve: 379 FASLNACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 192



LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

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

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

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

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

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

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

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



Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO

REFERENCIA	Radicación No.	9 149368
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/056768
	Fecha inicio fase nacional	31/12/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	2601

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. El solicitante debe aclarar si la solicitud corresponde al capítulo I o II del PCT por que la indicación en el petitorio no corresponde a los documentos del expediente, en caso necesario adjuntar los documentos que corresponden.

3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

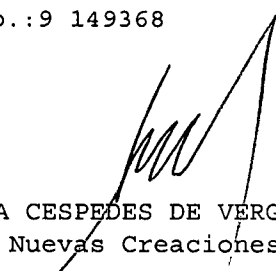
Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.



BICENTENARIO DE LA REPUBLICA DE COLOMBIA

Radicación No.: 9 149368

195
Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 26 FEB. 2010
adpall

Al contestar favor indique el número
de radicación consignado en el rótulo

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int. 2. Tel 5980070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia



Bogotá,
2020

196

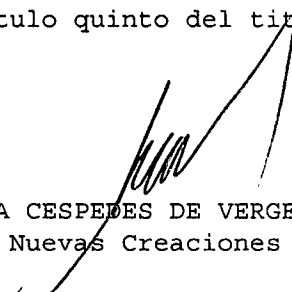
Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PULEVA BIOTECH S.A.

REFERENCIA	Radicación No.	9 149368
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/056768
	Fecha inicio fase nacional	31/12/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	2602

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de quince reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 26 FEB. 2010
adpall