

SEÑORES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COM
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-149368- -00006-0000

Fecha: 2010-06-25 16:35:05 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 97

Re: Expediente N° 09-149.368

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

Solicitante: PULEVA BIOTECH, S.A.

Nuestra Ref: P2009/000203

RESPUESTA AL OFICIO N°. 2601 NOTIFICADO
POR FIJACION EN LISTA No. 66, DE FECHA 26 DE FEBRERO DE 2009,
(EXAMEN DE FORMA)

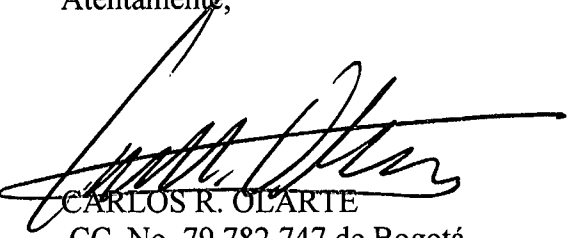
CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad en referencia, me permito dar respuesta al auto proferido por ese Despacho, dentro del término legal previsto en el artículo 39 de la Decisión 486, en los siguientes términos:

1. En respuesta a la primera observación del examinador me permito adjuntar copia autentica del poder a mi conferido por mi representada según lo previsto en los Artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil, acompañada de la correspondiente certificación notarial que acredita la existencia y representación legal de mi representada. OK
2. En respuesta a la segunda observación del Examinador, me permito informar a ese Despacho que la solicitud entra en Fase Nacional Capitulo II para tal efecto adjunto el Reporte Preliminar Internacional de Patentabilidad, junto con la traducción de sus anexos. 7

7204

3. En respuesta a la tercera observación del Examinador, me permito aportar junto al presente memorial, copias auténticas de los dos documentos de cesión debidamente legalizados, en donde consta la cesión de dieciocho (18) inventores al solicitante, según lo previsto en el Art. 26- k de la Decisión 486.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE
CC. No. 79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295

Anexos: Copia auténtica del Poder
 Reporte del Examen Preliminar Internacional
 Copia auténtica de los documentos de Cesión

OLARTE RAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

Camino de Purchil, 66, E-18004 – GRANADA, ESPAÑA

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications, collect refunds, desist, settle, conciliate or negotiate. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Signature/Firma:

Date/Fecha: 8/4/2010

City, Country/Ciudad, País:

GRANADA, SPAIN

El suscrito,

PULEVA BIOTECH, S.A.

domiciliado en

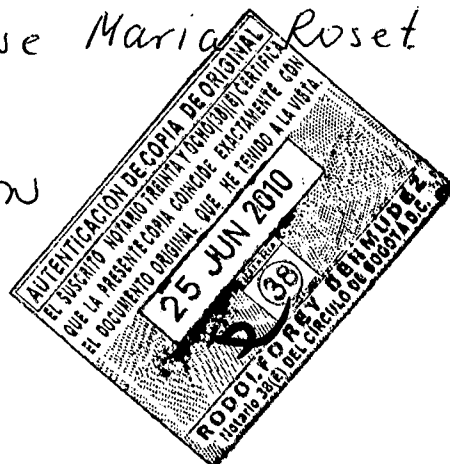
por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir, transigir, y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Poder

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Alexander Agudelo
Catalina Barbastefano
Ángela Correa
Erika Rico
Carlos A. Parra
Andrés Alvarado
Gina Arias
Juan Felipe Acosta
Andrés Rincón
Grace García
Mariana Franco

Of Counsel
Guillermo Chahín
Graciela Melo
Jacqueline Chaparro
Cruz E. de Moncaleano



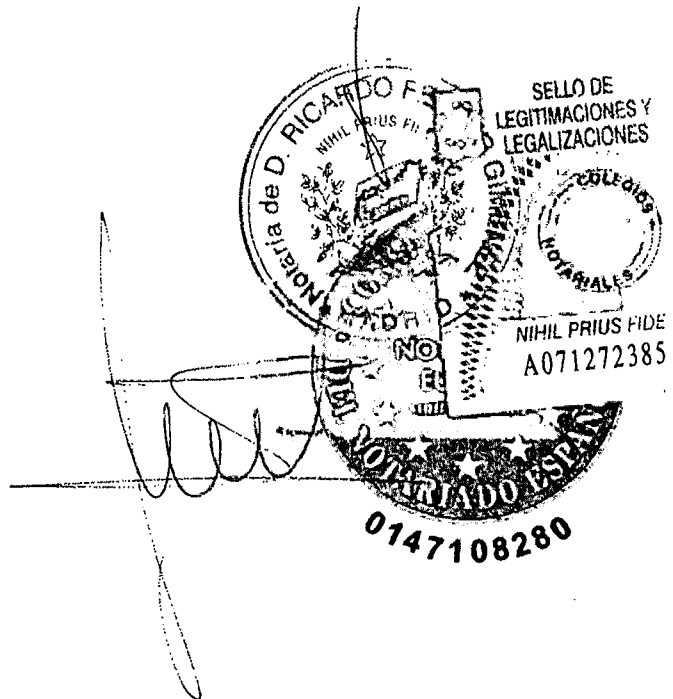
3-206
4

LEGITIMACION

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

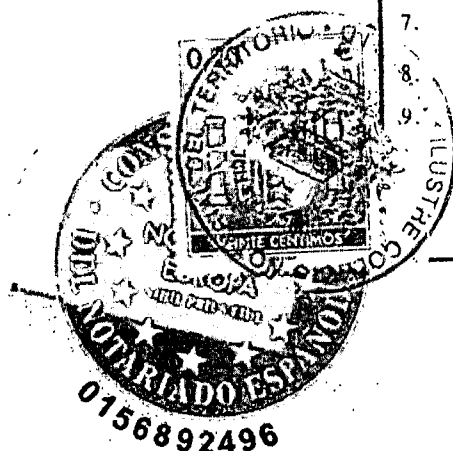
DOY FE: De que la firma y rúbrica que antecede, DON JOSE MARIA ROSET MONROS con D.N.I número, 05265134-C, la considero legítima por cotejo con otra firma original legitimada.

En Madrid a 21 de Junio de 2010

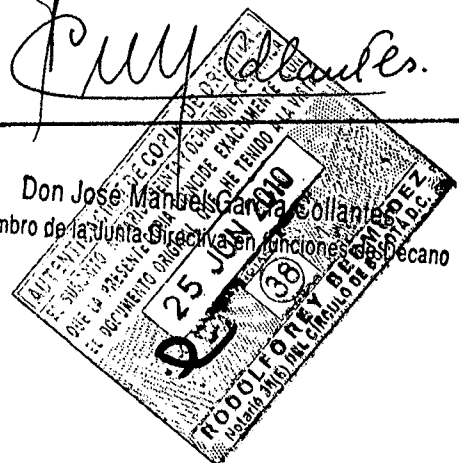


Apostille (o legalización única)
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)
(Real Decreto 2433/1978, de 2 de octubre)

1. País: España
El presente documento público
2. Ha sido firmado por D. Ricardo Ferrer Gimenez
3. Actuando en calidad de NOTARIO
4. Se halla sellado/timbrado con el de su Notario
CERTIFICADO
5. En Madrid 6. El 22 JUN. 2010
7. Por el Decano del Colegio Notarial de Madrid
8. Con el número 34787
9. Sello/timbre: 10. Firma:



Don Jose Manuel Garcia Collantes
Miembro de la Junta Directiva en funciones de Decano



5 209

N.º 9445 Fecha 27 ABR 2010

CERTIFICACION

Registro Mercantil de la Provincia
de Granada

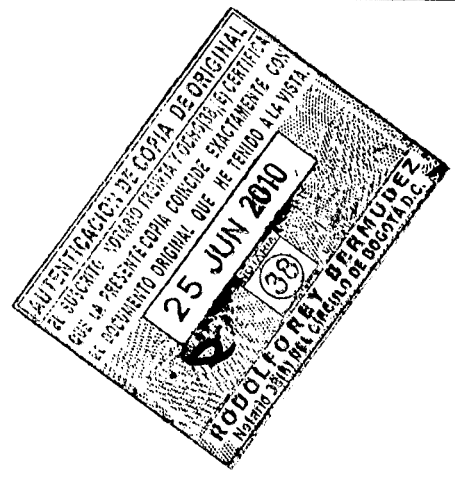


Prior Tempore Potior Jure

REGISTRADOR:

José Angel García - Valdecasas Butrón

Arandas, 6 bajo



6 208



SR. REGISTRADOR MERCANTIL DE LA PROVINCIA DE GRANADA

PEDRO CASAMITNAJA LEONART, mayor de edad, con D.N.I., nº : 21.382.647-F, en nombre y representación de PULEVA BIOTECH, S.A., con domicilio social en Granada, Camino de Purchil, nº 66 y C.I.F.: A: 1818550111, comparezco y como mejor proceda, DIGO:

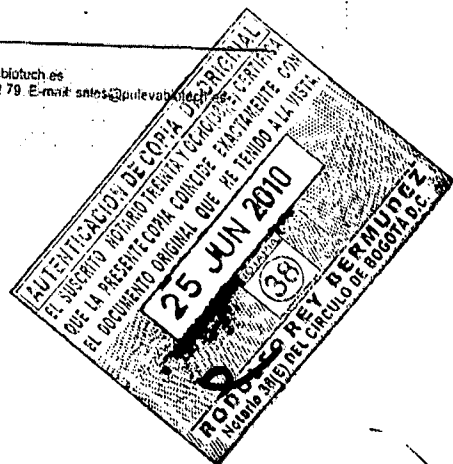
Que por medio del presente escrito vengo a solicitar de este Registro Mercantil tenga a bien expedir certificación acreditativa de la existencia de PULEVA BIOTECH, S.A., así como de sus apoderados y representantes legales, todo ello para surtir efectos en el Estado de Colombia, en un asunto relativo a propiedad industrial.

En su virtud,

SOLICITO al Sr. Registrador Mercantil de Granada, tenga por presentado este escrito, se sirva admitirlo y expedir la certificación interesada en el cuerpo del mismo:

Granada, a 22 de abril de 2010.

Puleva Biotech, S.A.
Camino de Purchil, 66, 18004 GRANADA (España) - Teléfono: +34 958 24 01 52, Fax: +34 958 24 01 60. E-mail: info@pulevabiotech.es
Oficina Comercial: C/ González Ovejuna, 18, 6º PI. 28031 MADRID (España) - Teléfono: +34 91 380 29 73, Fax: +34 91 380 22 79. E-mail: sales@pulevabiotech.es
Inscrita en el Registro Mercantil de Granada: F. 164, L.O. H. GR-17202. Fecha 12-09-2000. CIF A: 1818550111.



7

EL REGISTRADOR MERCANTIL DE GRANADA Y SU PROVINCIA QUE SUSCRIBE, tras examinar los Libros del Archivo y la base de datos informatizada existente en este Registro Mercantil, de GRANADA con referencia a la Sociedad Solicitada;



CERTIFICA: Que los datos relativos a esta Sociedad, que continúa vigente en este Registro con personalidad Jurídica son los siguientes:

DENOMINACIÓN: PULEVA BIOTECH SA

CIF: A18550111

Ultimos datos de inscripción en el Registro Mercantil :

Hoja GR-17202 Tomo 1333 Folio 115 Inscripción N.Margin-72

ADMINISTRADORES Y CARGOS

Nombre: BARBER BENEDITO, BERTA
CIF: 25378509X
Cargo: Consejero
Fecha Nombramiento: 02/06/2008
Duración: 02/06/2012
Inscripción: 64

Nombre: DE LEON MOLINARI, JOSE MARIA
CIF: 28440106P
Cargo: Consejero
Fecha Nombramiento: 02/06/2008
Duración: 02/06/2012
Inscripción: 64

Nombre: HERNANDEZ CALLEJAS, ANTONIO
CIF: 28354382M
Cargo: Consejero
Fecha Nombramiento: 02/06/2008
Duración: 02/06/2012
Inscripción: 64

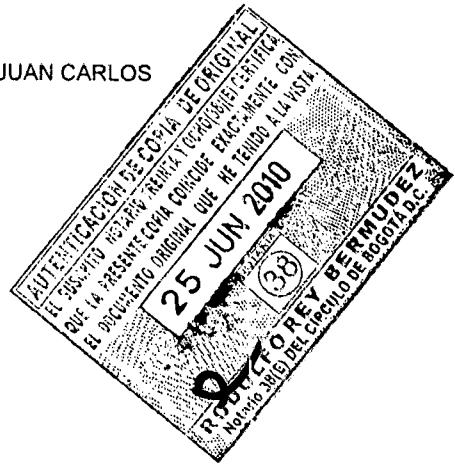
Nombre: JIMENEZ LOPEZ, GREGORIO VICENTE
CIF: 27201413A
Cargo: Consejero
Fecha Nombramiento: 02/06/2008
Duración: 02/06/2012
Inscripción: 64

Nombre: ROLDAN AGUILAR, LAUREANO
CIF: 30478459D
Cargo: Consejero
Fecha Nombramiento: 02/06/2008
Duración: 02/06/2012
Inscripción: 64

Nombre: GOMEZ DE BAEZA TINTURE, PEDRO
CIF: 50404900D
Cargo: Consejero
Fecha Nombramiento: 02/06/2008
Duración: 02/06/2012
Inscripción: 64

Nombre: DE GREGORIO SANTOS, JUAN CARLOS
CIF: 5380044E
Cargo: Consejero

REGISTRO MERCANTIL DE GRANADA



210



Pag. 2

Fecha Nombramiento: 02/06/2008
Duración: 02/06/2012
Inscripción: 64

Nombre: ZABIA DE LA MATA, JUAN
CIF: 07221364P
Cargo: Consejero
Fecha Nombramiento: 02/06/2008
Duración: 02/06/2012
Inscripción: 64

Nombre: HERNANDEZ CALLEJAS, FELIX
CIF: 28654345W
Cargo: Consejero
Fecha Nombramiento: 02/06/2008
Duración: 02/06/2012
Inscripción: 64

Nombre: MARTINEZ ROTLLAN, JORDI
CIF: 43705093X
Cargo: Consejero
Fecha Nombramiento: 02/06/2008
Duración: 02/06/2012
Inscripción: 64

Nombre: CARCELLER ARCE DEMETRIO
CIF: 5378980Q
Cargo: Consejero
Fecha Nombramiento: 27/04/2009
Duración: 27/04/2013
Inscripción: 70

Nombre: DEL PINO Y CALVO SOTELO, LEOPOLDO
CIF: 00395197B
Cargo: Consejero
Fecha Nombramiento: 27/04/2009
Duración: 27/04/2013
Inscripción: 70

Nombre: JIMENEZ LOPEZ, GREGORIO VICENTE
CIF: 27201413A
Cargo: Presidente
Fecha Nombramiento: 02/06/2008
Duración: 02/06/2012
Inscripción: 64

Nombre: MORENO GARCERAN, ARTURO
CIF: 50417847F
Cargo: Presidente de la Comisión de Auditoría y Retribuciones
Fecha Nombramiento: 20/05/2004
Duración: 20/05/2008
Inscripción: 37

REGISTRO MERCANTIL DE GRANADA



9-211



Pag. 3

Nombre: MORENO GARCERAN,ARTURO
CIF: 50417847F
Cargo: Miembro de la Comisión de Auditoría y Retribuciones
Fecha Nombramiento: 20/05/2004
Duración: 20/05/2008
Inscripción: 37

Nombre: ROLDAN AGUILAR,LAUREANO
CIF: 30478459D
Cargo: Miembro de la Comisión de Auditoría y Retribuciones
Fecha Nombramiento: 20/05/2004
Duración: 20/05/2008
Inscripción: 37

Nombre: GOMEZ DE BAEZA TINTURE,PEDRO
CIF: 50404900D
Cargo: Miembro de la Comisión de Auditoría y Retribuciones
Fecha Nombramiento: 20/05/2004
Duración: 20/05/2008
Inscripción: 37

Nombre: PEREZ ALVAREZ, MIGUEL ANGEL
CIF: 50837214S
Cargo: Secretario no consejero
Fecha Nombramiento: 24/05/2005
Inscripción: 43

Nombre: PEREZ ALVAREZ, MIGUEL ANGEL
CIF: 50837214S
Cargo: Secretario Comité Auditoria
Fecha Nombramiento: 24/05/2005
Inscripción: 43

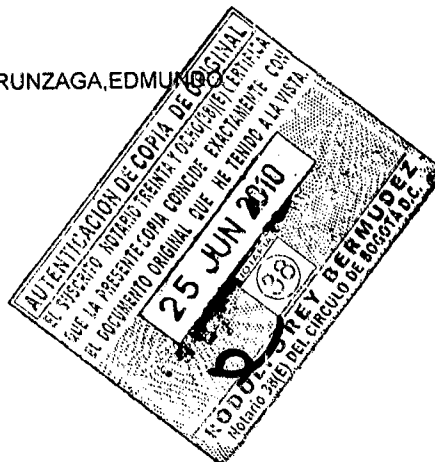
Nombre: SERVICIO DE COMPENSACION Y LIQUIDACION DE VALORES SA
CIF: A80075542
Cargo: Entidad Encargada Registro Contable
Fecha Nombramiento: 08/06/2001
Representante: GOMEZ SANCHA,IGNACIO
Inscripción: 9

APODERADOS

Nombre: PEREZ ALVAREZ, MIGUEL ANGEL
CIF: 50837214S
Cargo: Apoderado
Fecha Nombramiento: 24/05/2005
Duración: Indefinida
Inscripción: 44

Nombre: RODRIGUEZ UNZURRUNZAGA,EDMUNDO
CIF: 31172959R

REGISTRO MERCANTIL DE GRANADA



18 212



Pag. 4

Cargo: Apoderado
Fecha Nombramiento: 24/05/2005
Duración: Indefinida
Inscripción: 44

Nombre: ROSET MONROS, JOSE MARIA
CIF: 5265134C
Cargo: Apoderado
Fecha Nombramiento: 28/07/2008
Duración: Indefinida
Inscripción: 67

Nombre: CASAMITJANA LLEONART, PEDRO
CIF: 21382647F
Cargo: Apoderado Solidario
Fecha Nombramiento: 16/11/2000
Duración: Indefinida
Inscripción: 3

Nombre: BASTERRA AYESA, MARIA DEL CARMEN
CIF: 24126495R
Cargo: Apoderado Solidario
Fecha Nombramiento: 16/11/2000
Duración: Indefinida
Inscripción: 3

Nombre: HUERTAS DE LA CAMARA, LORETO
CIF: 74657932R
Cargo: Apoderado Solidario
Fecha Nombramiento: 19/12/2006
Duración: Indefinida
Inscripción: 53

Nombre: MARTIN OCAÑA, GABRIEL
CIF: 24169737A
Cargo: Apoderado Solidario
Fecha Nombramiento: 19/12/2006
Duración: Indefinida
Inscripción: 53

Nombre: PEREZ ALVAREZ, MIGUEL ANGEL
CIF: 50837214S
Cargo: Apoderado Solidario
Fecha Nombramiento: 19/12/2006
Duración: Indefinida
Inscripción: 53

Nombre: DE LA MORENA CEREZO, YOLANDA
CIF: 51373491R
Cargo: Apoderado Solidario
Fecha Nombramiento: 19/12/2006
Duración: Indefinida
Inscripción: 53



REGISTRO MERCANTIL DE GRANADA

213



Pag. 5

REGISTRO MERCANTIL DE GRANADA

Nombre: PEREZ CAMPO, LUIS JAVIER
CIF: 35452957K
Cargo: Apoderado Mancom. y solidario
Fecha Nombramiento: 24/05/2005
Duración: Indefinida
Inscripción: 44

Nombre: ROSET MONROS, JOSE MARIA
CIF: 5265134C
Cargo: Apoderado Mancom. y solidario
Fecha Nombramiento: 26/02/2008
Duración: Indefinida
Inscripción: 57

Nombre: ALVAREZ GUARDIA, MARIA DEL MAR
CIF: 25972457Y
Cargo: Apoderado Mancom. y solidario
Fecha Nombramiento: 28/04/2008
Duración: Indefinida
Inscripción: 58

Nombre: OCAÑA PORTO, EDUARDO
CIF: 35950516K
Cargo: Apoderado Mancom. y solidario
Fecha Nombramiento: 28/04/2008
Duración: Indefinida
Inscripción: 58

Nombre: PEREZ ALVAREZ, MIGUEL ANGEL
CIF: 50837214S
Cargo: Apoderado Mancom. y solidario
Fecha Nombramiento: 28/04/2008
Duración: Indefinida
Inscripción: 59

Nombre: DE LA MORENA CEREZO, YOLANDA
CIF: 51373491R
Cargo: Apoderado Mancom. y solidario
Fecha Nombramiento: 28/04/2008
Duración: Indefinida
Inscripción: 59

Nombre: MARTIN OCAÑA, GABRIEL
CIF: 24169737A
Cargo: Apoderado Mancom. y solidario
Fecha Nombramiento: 24/05/2005
Duración: Indefinida
Inscripción: 44

Nombre: CASAMITJANA LLEONAR, PEDRO
CIF: 21382647F
Cargo: Apoderado Solidario
Fecha Nombramiento: 19/12/2006



RC 1214



Pag. 6

Duración: Indefinida
Inscripción: 53

Nombre: BASTERRA AYESA, MARIA DEL CARMEN
CIF: 24126495R
Cargo: Apoderado Solidario
Fecha Nombramiento: 19/12/2006
Duración: Indefinida
Inscripción: 53

Nombre: MARTIN OCAÑA, GABRIEL
CIF: 24169737A
Cargo: Apoderado Solidario
Fecha Nombramiento: 23/03/2004
Duración: Indefinida
Inscripción: 52

Nombre: CASAMITJANA LLEONART, PEDRO
CIF: 21382647F
Cargo: Apoderado Solidario
Fecha Nombramiento: 23/03/2004
Duración: Indefinida
Inscripción: 52

Nombre: BASTERRA AYESA, MARIA DEL CARMEN
CIF: 24126495R
Cargo: Apoderado Solidario
Fecha Nombramiento: 23/03/2004
Duración: Indefinida
Inscripción: 52

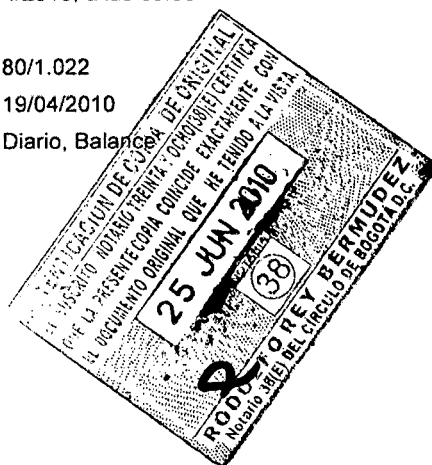
Nombre: JIMENEZ LOPEZ, GREGORIO VICENTE
CIF: 27201413A
Cargo: Apoderado Mancom. y solidario
Fecha Nombramiento: 24/05/2005
Duración: Indefinida
Inscripción: 44

Así resulta de los asientos del Registro, existiendo los siguientes documentos pendientes de despacho referentes a esta sociedad:

DIARIO DE LIBROS

Datos actualizados el 27/04/2010, a las 09:00

Asiento: 80/1.022
Fecha Presentación: 19/04/2010
Libros presentados: Diario, Balance



REGISTRO MERCANTIL DE GRANADA

13 215



Pag. 7

Expedido la presente sellada y rubricada en GRANADA, a 27 de Abril de 2010.

ADVERTENCIAS

Queda prohibida la incorporación de los datos que constan en la presente información registral a ficheros o bases de datos informáticas para la consulta individualizada de personas físicas o jurídicas, incluso expresando la fuente de procedencia (Instrucción de la D.G.R.N. 17/02/98).

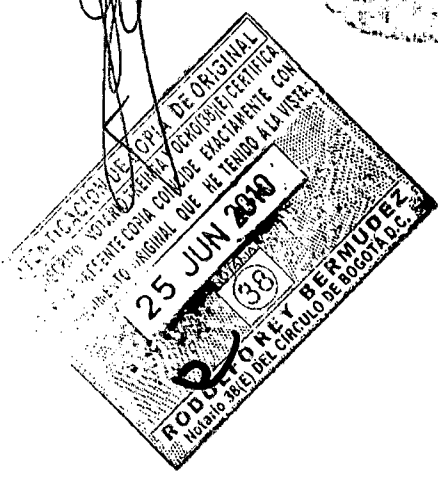
A los efectos de la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de carácter personal queda informado de que:

- 1.- Conforme a lo dispuesto en las cláusulas informativas incluidas en el modelo de solicitud los datos personales expresados en el presente documento han sido incorporados a los libros de este Registro y a los ficheros que se llevan en base a dichos libros, cuyo responsable es el Registrador.
- 2.- En cuanto resulte compatible con la legislación específica del Registro, se reconoce a los interesados los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición establecidos en la Ley Orgánica citada pudiendo ejercitarlos dirigiendo un escrito a la dirección del Registro.

Julio Soler García
DECANO-PRESIDENTE EN FUNCIONES DEL COLEGIO
DE REGISTRADORES DE LA PROPIEDAD Y
MERCANTILES DE ESPAÑA

Hago constar: Que legitimo la firma que
antecede de Don *Jose Angel Garcia Valdecasas Bulhon*

Bulhon
Registrador Mercantil de *Granada*
por ser, al parecer, la suya
Madrid, a *doce de Mayo de 2010*



REGISTRO MERCANTIL DE GRANADA

APOSTILLE
Convention de La Haye du 5 octobre 1961.

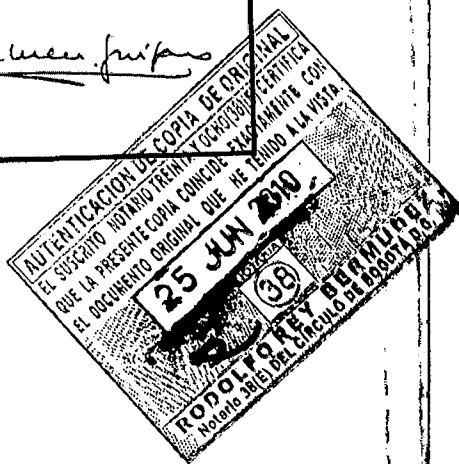
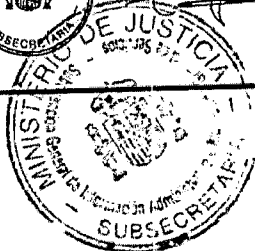
1. País España
El presente documento público
2. Ha sido firmado por Julio Soler García
3. Actuando en calidad de Decano Presidente
4. Se ha sellado/timbrado con Coleg. Reg. Prop. y Merc. De España

Certificado

5. En Madrid
6. El 13 de mayo de 2010
7. Por M^a Carmen Guijarro González. Funcionario Autorizado de Legalizaciones. Ministerio de Justicia.
8. Con el número 15702
9. Sello/timbre
10. Firma



Carmen Guijarro González



217

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

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

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

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

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

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

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

A

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

18 220

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

221
19

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.

222
20

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,

223
24

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

224
ZZ

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

225
23

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

24

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

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

15 Estos 68 aislados seleccionados se caracterizaron adicionalmente tanto fenotípica (API CH50, 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 20 adicionalmente a través del procedimiento de selección descrito en esta invención con el fin de obtener posibles candidatos probióticos que puedan proteger frente a la mastitis.

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

30

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

28

- *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:

- *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

22

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
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-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
Celobiosaz	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
Melicitosa	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
D-Rafinosa	5	0	5	5	5	5	0	5	5	0	0
Anidron	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucoigero	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-Ulucosa	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
D-Tripafosa	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-Fructosa	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

230
28

	7263	7264	7260	7262	7265	7266	7413	7412	7409	7411	7410
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

5

Se ha sugerido que el mecanismo principal usado por las sustancias probióticas está controlando el equilibrio entre las bacterias útiles y perjudiciales es el intestino. Cuando se reduce el número de bacterias útiles, las bacterias oportunistas

10 podrían crecer excesivamente y alterar el bienestar del huésped o incluso inducir una infección. La mayoría de los organismos bacterianos han adquirido características o mecanismos que reducen las capacidades de crecimiento de otros microorganismos que cohabitan con ellos y así, permitir su crecimiento

15 selectivo. La reducción de pH a través de la producción de ácido por bacterias del ácido láctico es uno de tales mecanismos. Además, algunas bacterias del ácido láctico producen también componentes de péptidos bioactivos y otros metabolitos que inhiben de manera selectiva el crecimiento de otras bacterias,

20 levaduras u hongos. Este es el caso de reuterina (un aldehído) o bacteriocinas (péptidos, tales como nisina o pediocina PA-1).

Se evaluaron las cepas probióticas de esta invención para determinar su capacidad para producir metabolitos bactericidas usando un ensayo de difusión en pocillos de agar. Se prepararon

25 placas de agar TSA que contenían 10⁶ ufc/ml de diferente cepa de bacterias patógenas y se sometieron a ensayo tal como se indicó previamente en el ejemplo 3b para *S. aureus*. Los resultados obtenidos se describieron en la tabla III.

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

231
28

	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

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

31

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

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

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

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

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

TACACGATATGAACAGNTTACCTCTCATACGGTGNTTCTTCTTTAACAACAGAGCTTTA
 CGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCCATTGTG
 GAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTGTGG
 CCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAGGCCGTTACCCACCAA
 CAAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAGCGT
 TGTTCATGCGAACAACGNTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTGTCCCCC
 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
 CTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTG
 CTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCTCTCA
 GGTCGGCTATGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCG
 CGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGCGGTTTCG
 ATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTTCTGATGGGCAGGTTA
 CCCACGTGTTACTCACCCGTTTCGCCACTCCTCTTTTTTCCGGTGAGCAAGCTCCGGTGG
 AAAAGAAGCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAG
 GT

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

TTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCA
 CTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCC
 TCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCTCTCAGGTGCG
 GCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCYCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGA
 CCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGT
 TATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCAC
 GTGTTACTACCCAGTTTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCAATCAA
 TACCAGAGTTCGTTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAG

Figura 1B*Figuras modificadas*

34

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

CTATCATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGG
 AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTG
 GAAACAGGTGCTAATAACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGC
 TTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGC
 TCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
 ACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGT
 CTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTA
 GAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCA
 CGGCTAACTACGTGCCCAGCA

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

GGGTGGGGNGANCAGAACATGAAATGAACAGTTTACATCTCACCTCGCTGNTTCTTCTCCT
 CTAACAACAGAGCTTTTACGACTCCGAAGGACCTTCTTCACATCACGCGGCGTNTGCTC
 CATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGG
 CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGATTTCGGCTACGTATCATCACC
 TTGGTAGGCCGTTACCCACCAACTAGTTAATACGCCGCGGGTCCATCTAAAAGCGATA
 GNAGAACCATCTTTCATCTAAGGATCATGCGATCCTTAGAGATATACGGNATTAGCACC
 TGTTCCTCAAGTGTTATCCCCTTCTTTTAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCC
 GCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTCGGTGTAAGAAAGTTTCGTTTCGACTT
 GCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTNATGAGCCAGGATCAAACCTCTA

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

GCNTGGGNGAACGGTCACTGCGGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACA
 GAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGC
 CCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTTC
 CATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTAC
 CTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTT
 CAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTT
 ATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCACTGGTG
 ATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACTTGC
 ATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGNCAGGATCNAAACTCTAA

Figura 1C

239

38

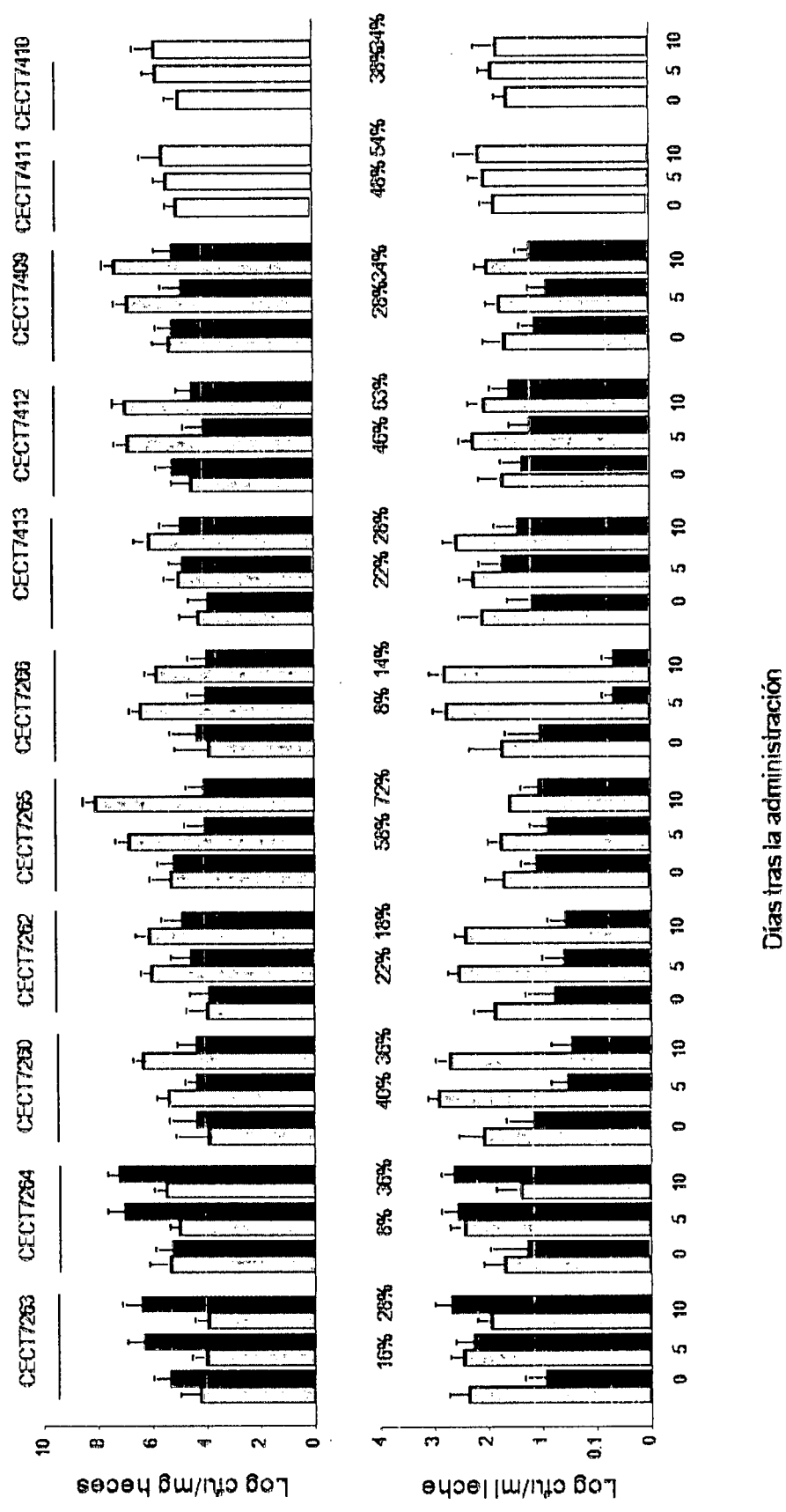


Figura 2

Figuras modificadas

238
36

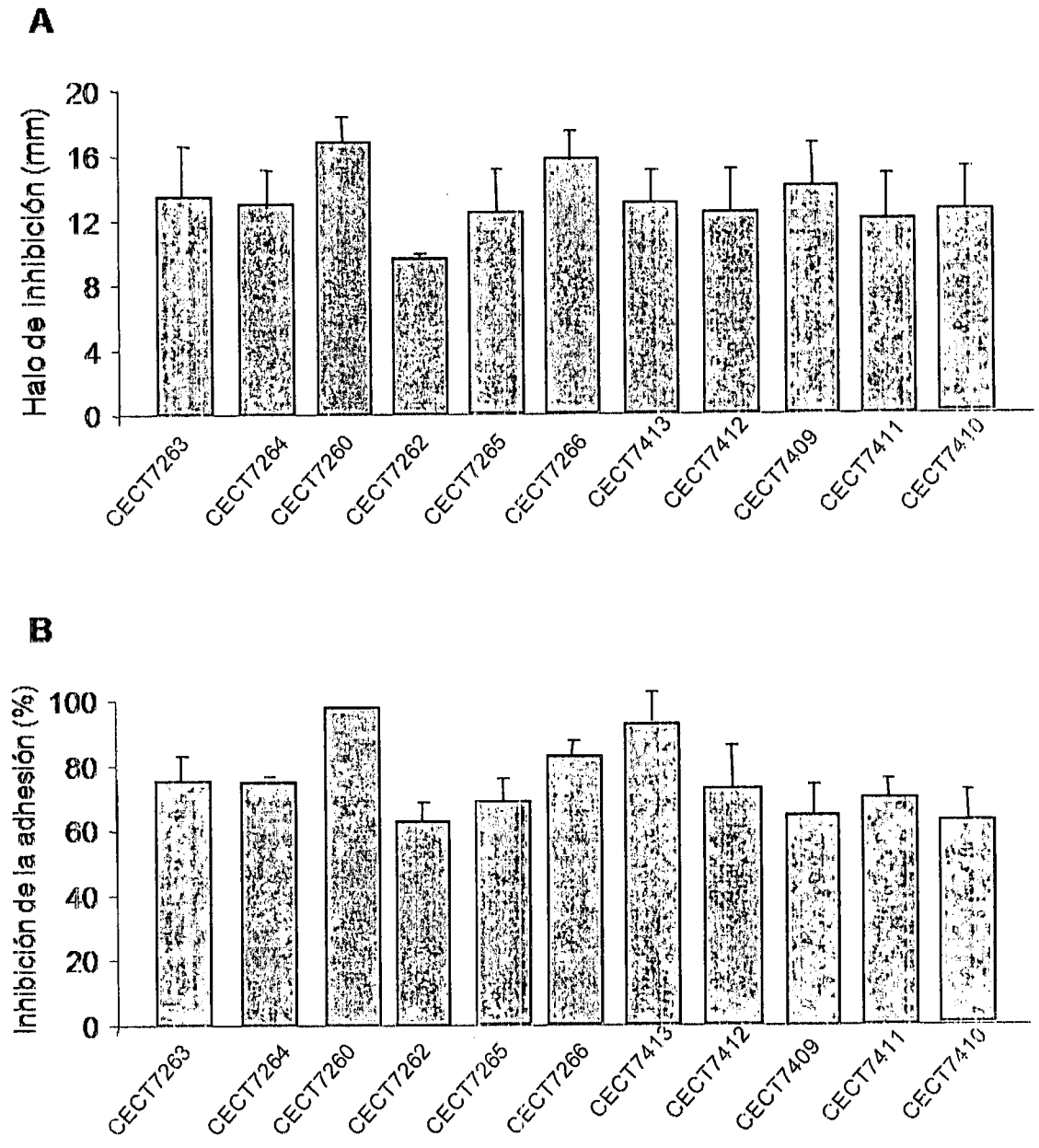
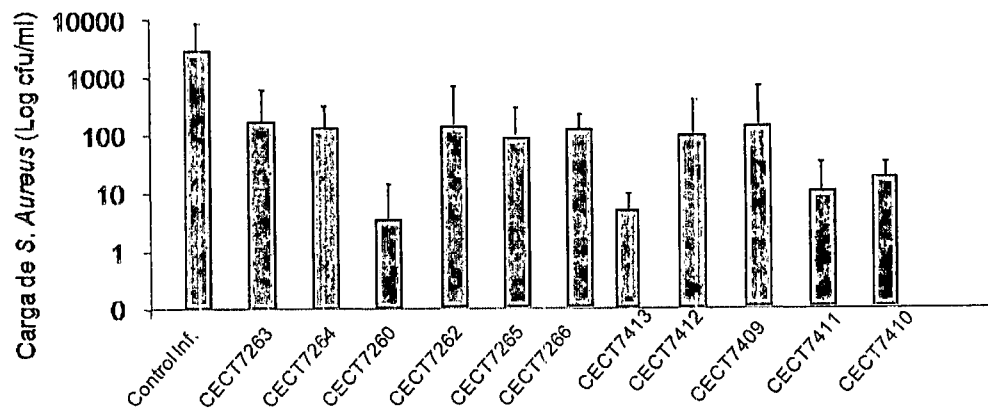


Figura 3

Figuras modificadas

A



B

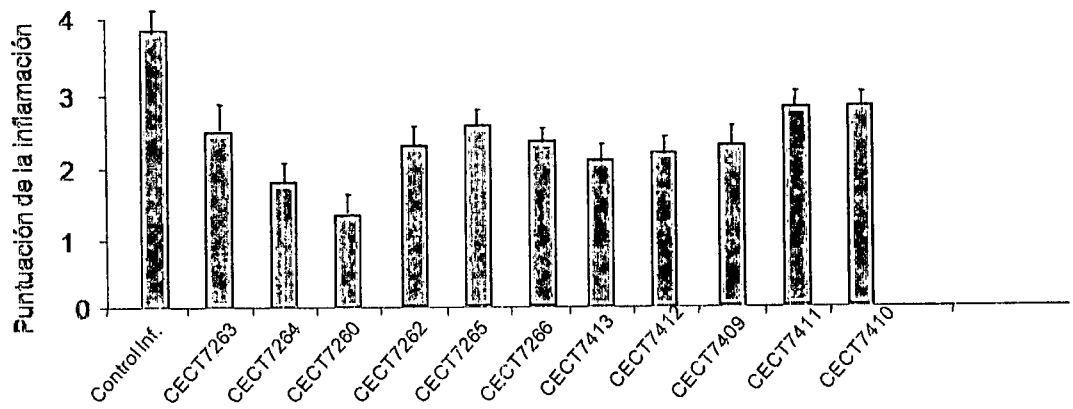


Figura 4

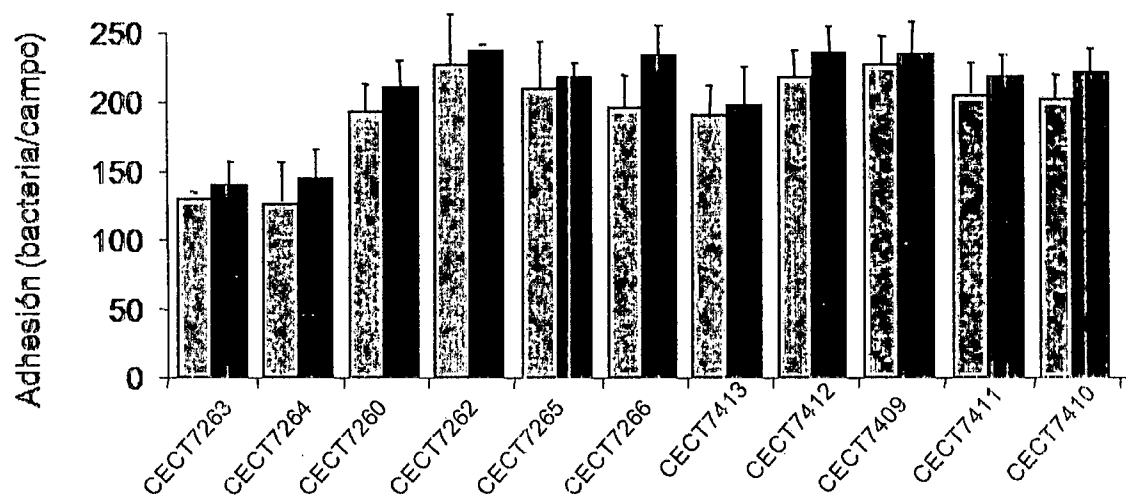


Figura 5

Figuras modificadas

241
389

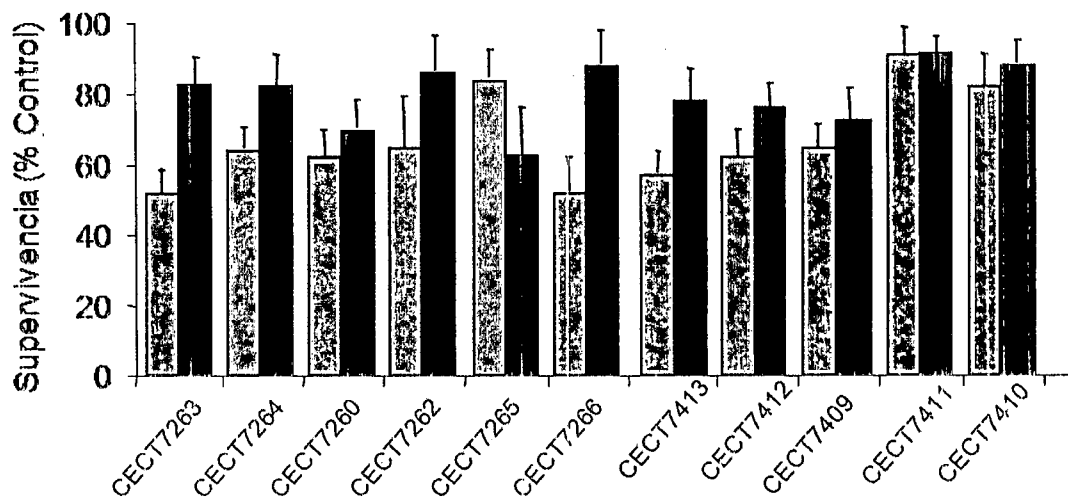
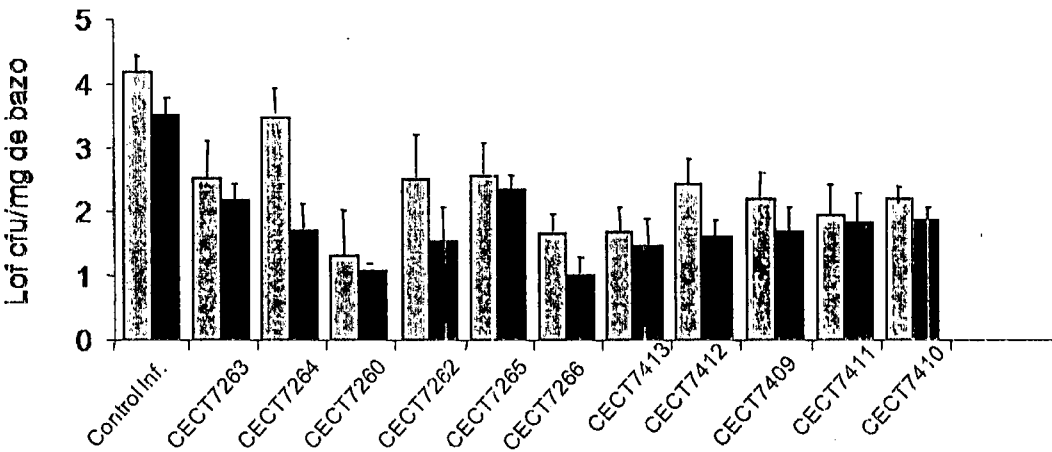


Figura 6

Figuras modificadas

242
C/O

A



B

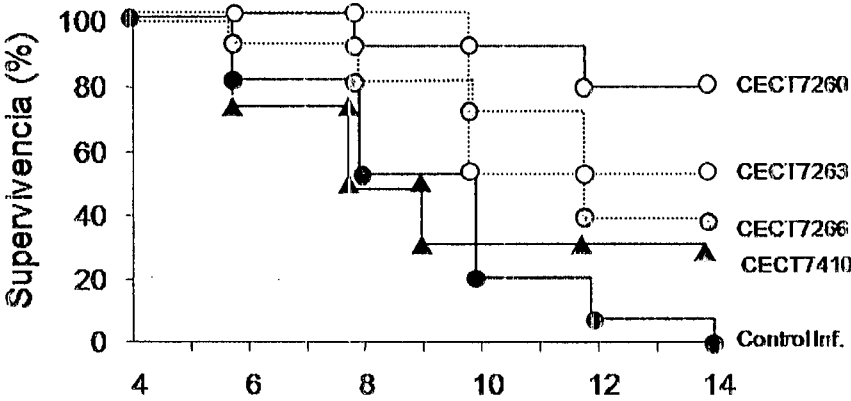
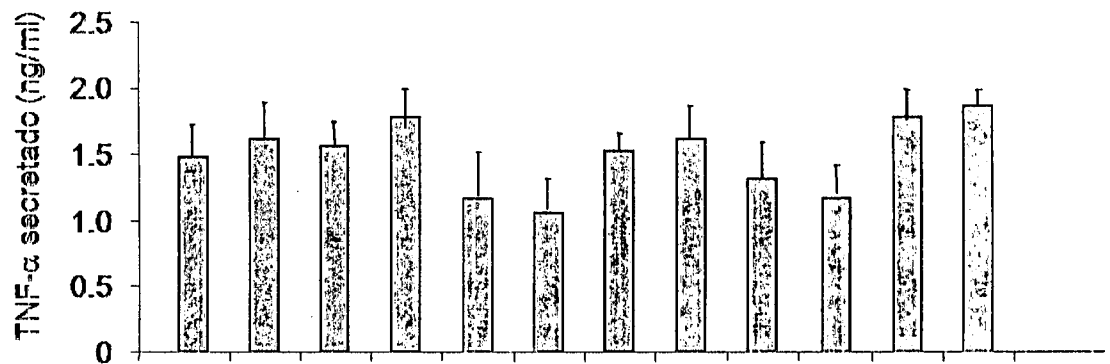


Figura 7

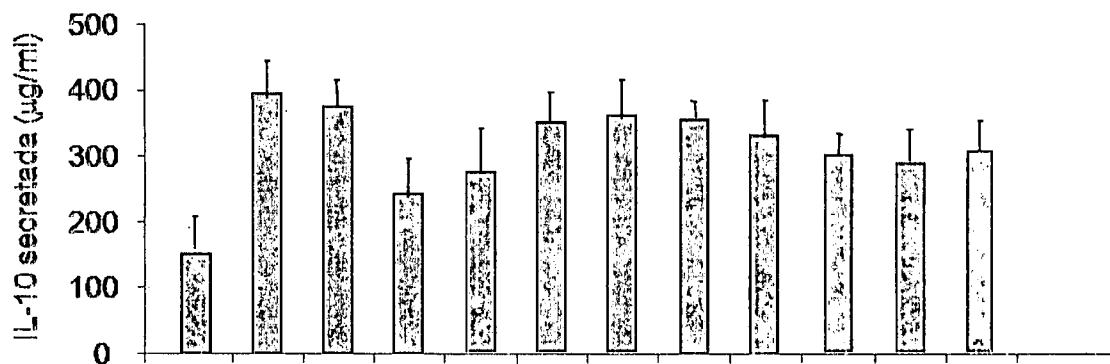
Figuras modificadas

4 243

A



B



C

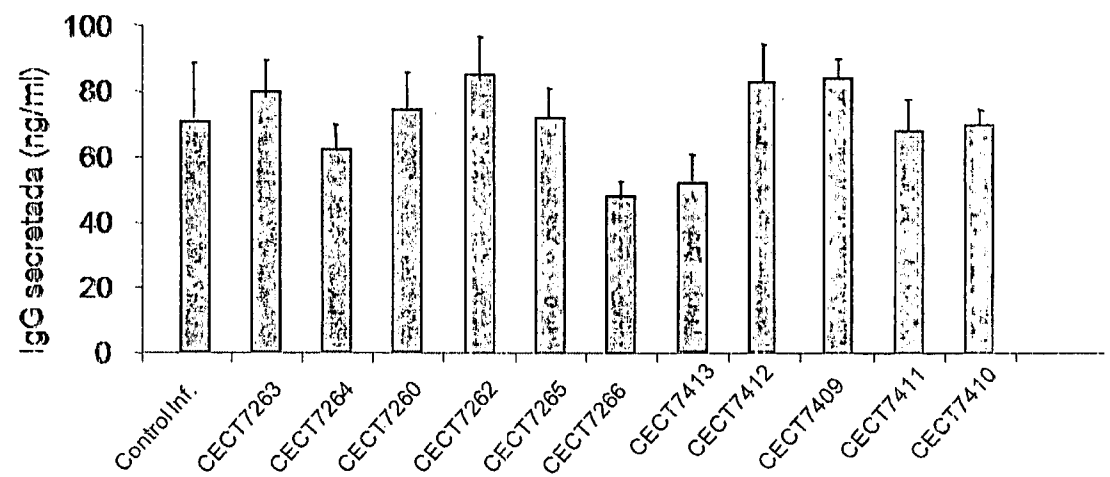


Figura 8

Figuras modificadas

244
47

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 es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(8)

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

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

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

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

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

Lista de secuencias modificada

43

<220>

<221> misc_feature

<222> (131)..(131)

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

<220>

<221> misc_feature

<222> (147)..(147)

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

<400> 1

tcgngtnnga agnacaataa acacntaagt gccttgctcc ctaacaaaag aggtttacaa 60

cccgaaggc ctccatccct cagcgggcgt cgctgcatca ggcttgcgcc cattgatgca 120

atattcccca ntgctgcctc ccgatangag tctggggcgt atctcagtcc caatgtggcc 180

ggtcgcccctc tcaggccggc taccogtoga agccatgggtg ggccgttacc ccgccatcaa 240

gctgatagga cgcgacccca tcccatgccg caaaggcttt cccaacacac catgcggtgt 300

gatggagcat ccggcattac caccogtttc caggagctat tccggtgcat ggggcaggtc 360

ggtcacgcat tactcaccog ttcgccactc tcaccaccag gcaaagcccg atggatcccg 420

ttcgacttgc atgtgttaag cagcgcgcca 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 es a, c, g, o t

Lista de secuencias modificada

44f

<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

249
45

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

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

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

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

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

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

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

<400> 2
tncgcganga agaaataaaaa caaagtgcct tgctccctaa caaaagaggt ttacaacccg 60

aangcctcca tncctcacgn ggngtcncat gcatcaggct tgcgcccatt gtgnaatatt 120

ccccactgct gcctcccgta ngagtctggg ccgtatctna ntcccaatgt ggccggtcgc 180

Lista de secuencias modificada

248
46

cctctcaggc cggctacccg tcgaagccat ggtgggccgt taccgccca 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 es a, c, g, o t

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

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (510)..(510)
<223> n es 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 atgggcgctg tctcagtcctc attgtggccg 180
 atcagtctct caactcggct atgcatcatc gccttggtag gccgttaccc caccaacaag 240
 ctaatgcacc gcaggtccat ccagaagtga tagcgagaag ccattcttita agcgttggtc 300
 atgcgaacaa cgntgttatg cggatttagc atctglttcc aaatgttgtc ccccgcttct 360
 gggcaggtta cctacgtgtt actcaccctg ccgccactcg ttggcgacca aaatcaatca 420
 ggtgcaagca ccatcaatca attgggcaa cgcgttcgac ttgcatgtat taggcacacc 480
 gccggcggtc 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

250
48

<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 gatcagttct tcaactcggc tatgcatcat cgccttggtg agccggttacc 240

ttaccaacta gctaattgcac cgcagggtcca tcccagagtg atagccaaag ccattctttca 300

aacaaaagcc atgtggcttt tgttggttatg cggtattagc atctgtttcc aaatgttatc 360

ccccgctccg gggcagggtta cctacgtggt actcaccogt ccgccactca ctgggtgatcc 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*

251
45

<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 acggtcactg cggaacagtt actctcacgc acgttcttct ccaacaacag 60

agctttacga gccgaaaccc ttcttcactc acgcggtggt gctccatcag gcttgcgccc 120

attgtggaag attccctact gctgcctccc gtaggagtat ggaccgtgtc tcagttccat 180

tgtggccgat cagtctctca actcggctat gcacatcgc cttggtaagc cgttacctta , 240

ccaactagct aatgcaccgc aggtccatcc cagagtgata gccaaagcca tctttcaaac 300

aaaagccatg tggcttttgt tggtatgcgg tattagcatc tgtttccaaa tggtatcccc 360

cgctccgggg caggttacct acgtgttact caccggtccg ccaactcactg gtgatccatc 420

gtcaatcagg tgcaagcacc atcaatcagt tgggccagtg cgtacgactt gcatgtatta 480

ggcacaccgc cggcgttcat cctgagncag gatcnaaact ctaa 524

Lista de secuencias modificada

252

<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
 ggctgggaa nccggtcata cctggaacag gttacctctc agatatgggtt cttctttaac 60
 aacagagttt tacgagccga aacccttctt cactcacgcg gcgttgctcc atcagacttt 120
 cgtccattgt ggaagattcc ctactgctgc ctcccgtagg agtttgggcc gtgtctcagt 180
 cccaatgtgg cggattacco tctcaggctc gctacgtatc attgccatgg tgagccgtta 240
 cctcaccatc tagctaatac gccgcgggac catccaaaag tgatagccga agccatcttt 300
 caaactcgga ccatgcggtc caagttgtta tgcggtatta gcatctgttt ccagggtgta 360
 tccccgctt ctgggcaggt ttcccacgtg ttactcacca gttcgccact cactcaaag 420
 taattcatga tgcaagcacc aatcattacc agagttcgtt cgacttgcac gtattaggca 480
 cgccgccagc gttcgtcctg agacaggatc aaaactota 519

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

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

Lista de secuencias modificada

213
JO

gcctcccgtg ggagtttggg ccgtgtctca gtcccaatgt ggccgatcac cctctcaggt 180
 cggctatgca tcgtcgcctt ggtgagccgt tacctcacca actagctaata gcaccgcggg 240
 tccatccatc agcgacaccc gaaagcgcct ttcaaataca aaccatgcgg ttctgattgt 300
 tatacgggat tagcacctgt ttccaagtgt tatcccttcc tgatgggcag gttaccacag 360
 tgttactcac ccgttcgcca ctctcttttt tccggtggag caagctccgg tggaaaaaga 420
 agcgttcgac ttgcatgtat taggcacgcc gccagcgttc gtcctgagcc aggt 474

<210> 8

<211> 469

<212> ADN

<213> Lactobacillus plantarum CECT 7412

<400> 8

ttactctcag atatgttctt cttaacaac agagttttac gagccgaaac cttctttcac 60
 tcacgcggcg ttgctccatc agactttcgt ccattgtgga agattcccta ctgctgcctc 120
 ccgtaggagt ttgggcccgtg tctcagtcac aatgtggccg attaccctct caggtcggct 180
 acgtatcatt gccatggtga gccgttaccy caccatctag ctaatacgcc gcgggaccat 240
 ccaaaagtga tagccgaagc catctttcaa gtcggacca tgcggtccaa gttgttatgc 300
 ggtattagca tctgtttcca ggtgttatcc ccgctttctg ggcaggtttc ccacgtgtta 360
 ctcaccagtt cgccactcac tcaaagttaa atcatgatgc aagcaccaat caataccaga 420
 gttcgttcga cttgcatgta ttaggcacgc cgccagcgtt cgtcctgag 469

<210> 9

<211> 493

<212> ADN

<213> Enterococcus faecalis CECT 7411

Lista de secuencias modificada

SF

<400> 9
 ctatcatgca agtcgaacgc ttcttttctc ccgagtgcctt gcactcaatt ggaaagagga 60
 gtggcgggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctacccatc agagggggat 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
 tacgtgcca 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

255

<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
gggtgggng ancagaacat gaaatgaaca gtttacatct cacctcgctg nttcttctc 60

taacaacaga gcttttacga ctccgaagga ctttcttcac atcacgcggc gnttgctcca 120

tcagacttgc gtccattgtg gaagattccc tactgctgcc tcccgtagga gtttgggccg 180

tgtctcagtc ccaatgtggc cgatcaacct ctgagattcg gctacgtatc atcaccttgg 240

taggccgtta cccacccaac tagttaatac gccgcgggtc catctaaaag cgatagnaga 300

accatctttc atctaaggat catgcgatcc ttagagatat acggnattag cacctgtttc 360

caagtgttat ccccttcttt taggcaggtt acccacgtgt tactcaccgc tccgccactc 420

aacttcttac ggtgaatgca agcattcggt gtaagaaagt ttcgttcgac ttgcatgtat 480

taggcacgcc gccagcggtc gtnatgagcc aggatcaaac tcta 524

<210> 11

Lista de secuencias modificada

256
87

<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 actcggctat gcatcatcgc cttggtaagc cgttacctta 240
 ccaactagct aatgcaccgc aggtccatcc cagagtata gccaaagcca tctttcaaac 300
 aaaagccatg tggcttttgt tggtatgcgg tattagcatc tgtttccaaa tggtatcccc 360
 cgctccgggg caggttacct acgtgttact caccgcgccg ccaactcactg gtgatccatc 420
 gtcaatcagg tgcaagcacc atcaatcagt tgggccagtg cgtacgactt gcatgtatta 480

Lista de secuencias modificada

257
S3

ggcacaccgc cggcgttcat cctgagncag gatchaaact 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)

258

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. **54259**
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)).

**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	<u>-</u>
	No: Claims	<u>1-17</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-17</u>
	No: Claims	<u>-</u>

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**

International application No.
PCT/EP2008/056768

261

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. I applies, the listing and/or table(s) related thereto, which form part of the basis of the report, may be marked "superseded."

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

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 mucosas. 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).

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

66 265

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 mucosae. 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

67-26

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

62 269

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

63-268

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

64

8

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.

AMENDED SHEET

- *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

271

66

- *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	7208	7413	7412	7402	7411	7410
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	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	0	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	0	0
D Methyl-xyloside	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Galactose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Glucose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Fructose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Mannose	1	0	0	0	0	0	0	0	0	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	0	0	0	0	0	0	0	0
Sorbitol	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D Methyl-D-mannoside	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D Methyl-D-glucoside	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N Acetylglucosamine	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amygdaline	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arbutine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Esculine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salicine	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cellobiose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Maltose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lactose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Melibiose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Saccharose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trehalose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5
Inuline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Maltotriose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Raffinose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amidon	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glycogene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Xylitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D Gentobiose	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Turanose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Lyxose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Tagatose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Fucose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Fucose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Ambitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Ambitol	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

10

Example 3: Selective screening of the strains

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

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
Ampicillin	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

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 :
- 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 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.
- 5 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.
- 10 8- A composition, pharmaceutical product, feed or nutritional product as defined in claim 7 which is in a frozen, lyophilized or dried form.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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)

TACACGATATGAACAGNTTACCTCTCATACGGTGNTTCTTCTTTAACAACAGAGCTTT
ACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCCATTG
TGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTG
TGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAGGCCGTTACCCCA
CCAACAAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTA
AGCGTTGTTTCATGCGAACAACGNTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTG
TCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCGTTGGCG
ACCAAATCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAATTGGGCCAACGCGTTTCGACTTGC
ATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAANTCTAA

Lactobacillus reuteri (CECT under Accession N° 7266)

ACCGNGGGNNAACGACACTGCGNGNACAGNTTACTCTCACGCACGNTTCTTCTCCAAC
AACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCT
TGCGCCCATTTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCT
CAGTTCCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAG
CCGTTACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAG
CCATCTTTCAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTT
CCAAATGTTATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCA
CTCACTGGTGATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGC
GTACGACTTGCATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAANT
CTAA

Enterococcus hirae (CECT under Accession N° 7410)

GACAGTTACTCTCATCCTTGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTT
CTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTG
CTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCTCTCA
GGTCGGCTATGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCACCG
CGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGCGGTTTCG
ATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTGATGGGCAGGTTA
CCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCACTCCTCTTTTTCCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGG
AAAAAGAAGCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAG
GT

Lactobacillus plantarum (CECT under Accession N° 7412)

TTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCA
CTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCG
GCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCYCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGA
CCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGT
TATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCAC
GTGTTACTCACAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCATCAA
TACCAGAGTTCGTTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAG

Figure 1B

AMENDED SHEET

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

CTATCATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGG
AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTG
GAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGC
TTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGC
TCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGT
CTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTA
GAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACCTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCCAGCA

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

GGGTGGGNGANCAGAACATGAAATGAACAGTTTACATCTCACCTCGCTGNTTCTTCCT
CTAACAACAGAGCTTTTACGACTCCGAAGGACCTTCTTCACATCACGCGCGTNTGCTC
CATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGG
CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGATTCGGCTACGTATCATCACC
TTGGTAGGCCGTTACCCACCAACTAGTTAATACGCCGCGGGTCCATCTAAAAGCGATA
GNAGAACCATCTTTTCATCTAAGGATCATGCGATCCTTAGAGATATACGGNATTAGCACC
TGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTTTTAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCC
GCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTCGGTGTAAGAAAGTTTCGTTGCACTT
GCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTNATGAGCCAGGATCAAACCTCTA

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

GCNTGGGNGAACGGTCACTGCGGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACA
GAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGC
CCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTTC
CATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGAAGCCGTTAC
CTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTT
CAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTT
ATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCACTGGTG
ATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACTTGC
ATGTATTAGGCACACCGCCGGCGTTCATCCTGAGNCAGGATCNAACTCTAA

Figure 1C

279

74

5/11

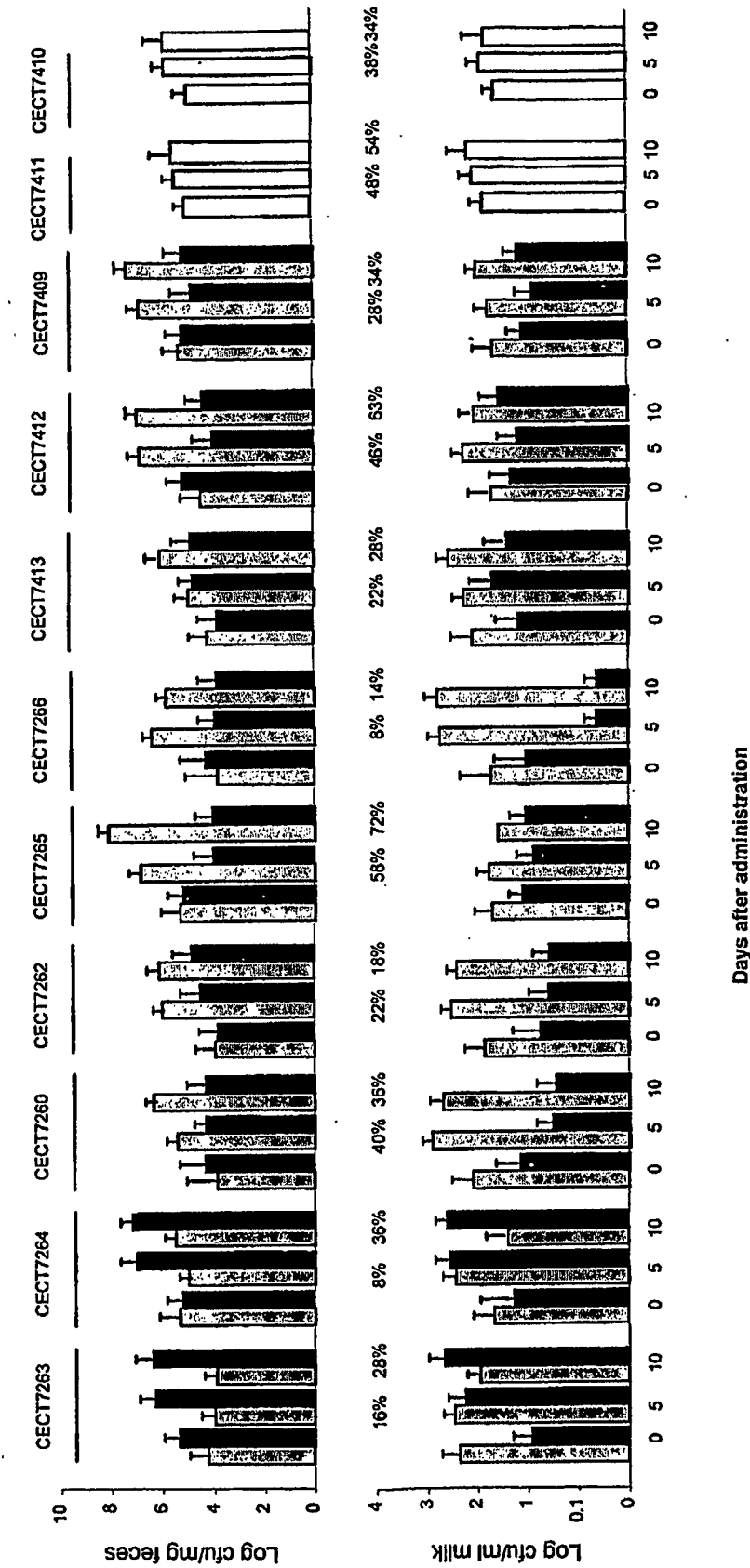


Figure 2

280

6/11

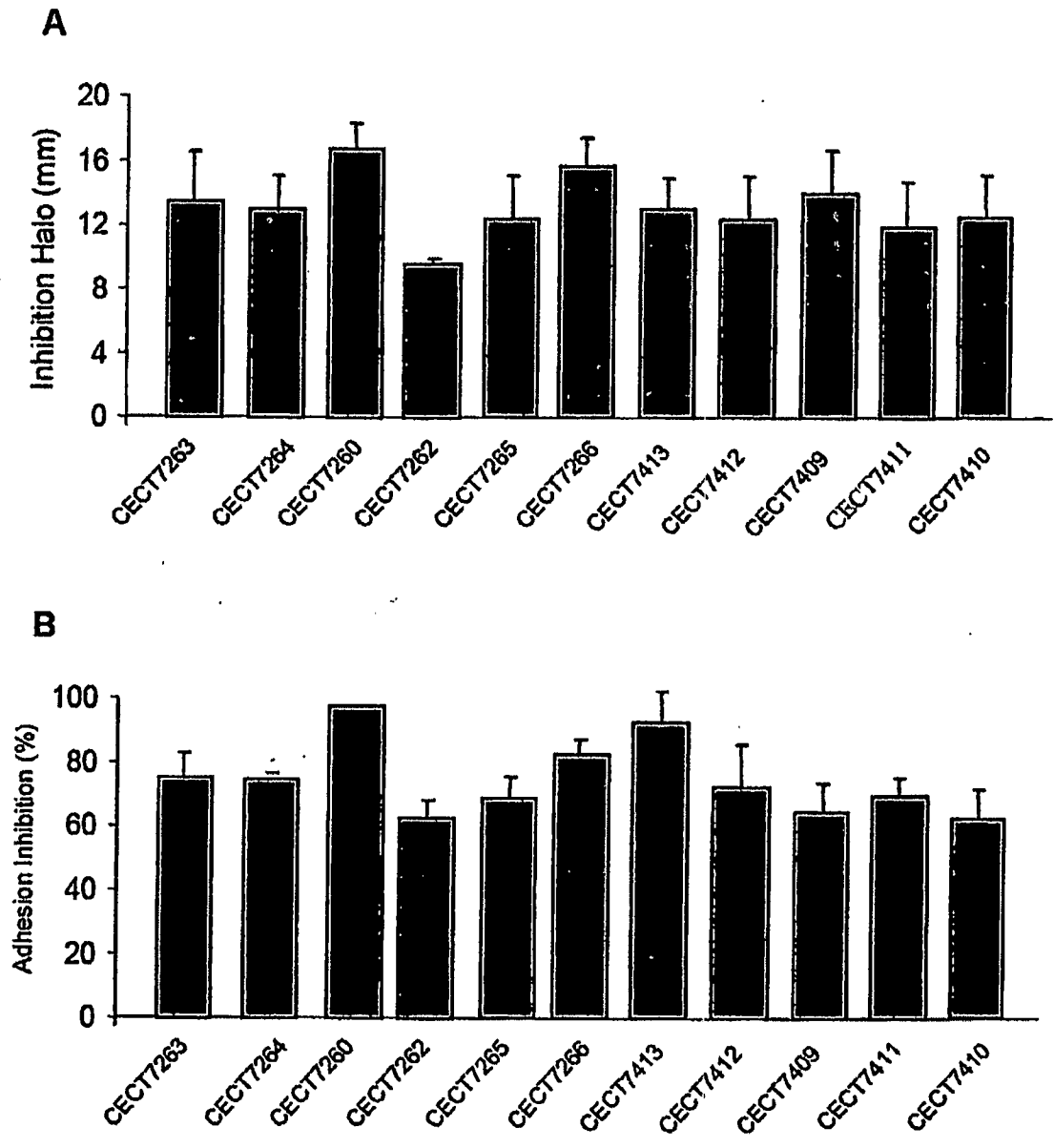


Figure 3

7/11

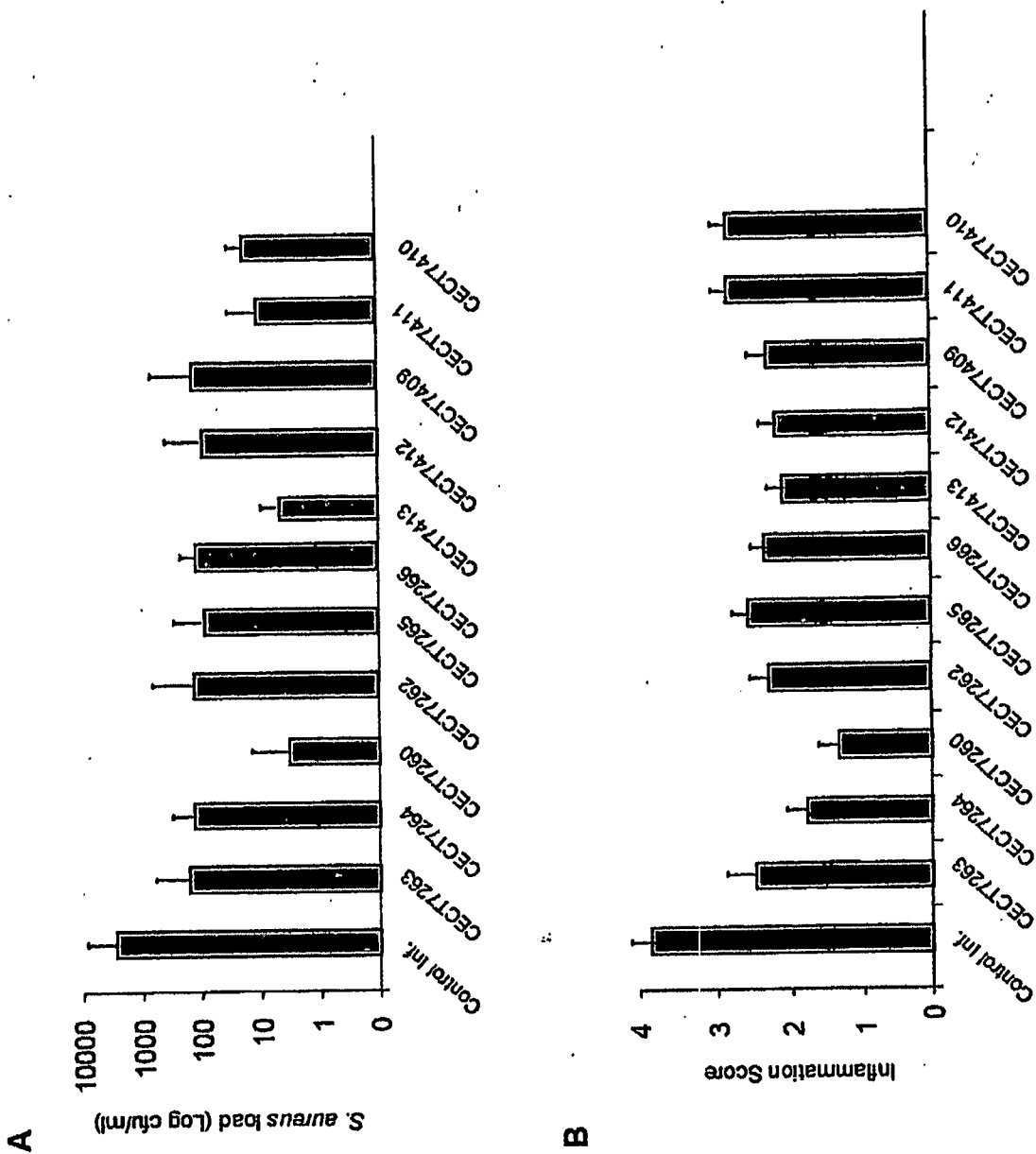


Figure 4

FX

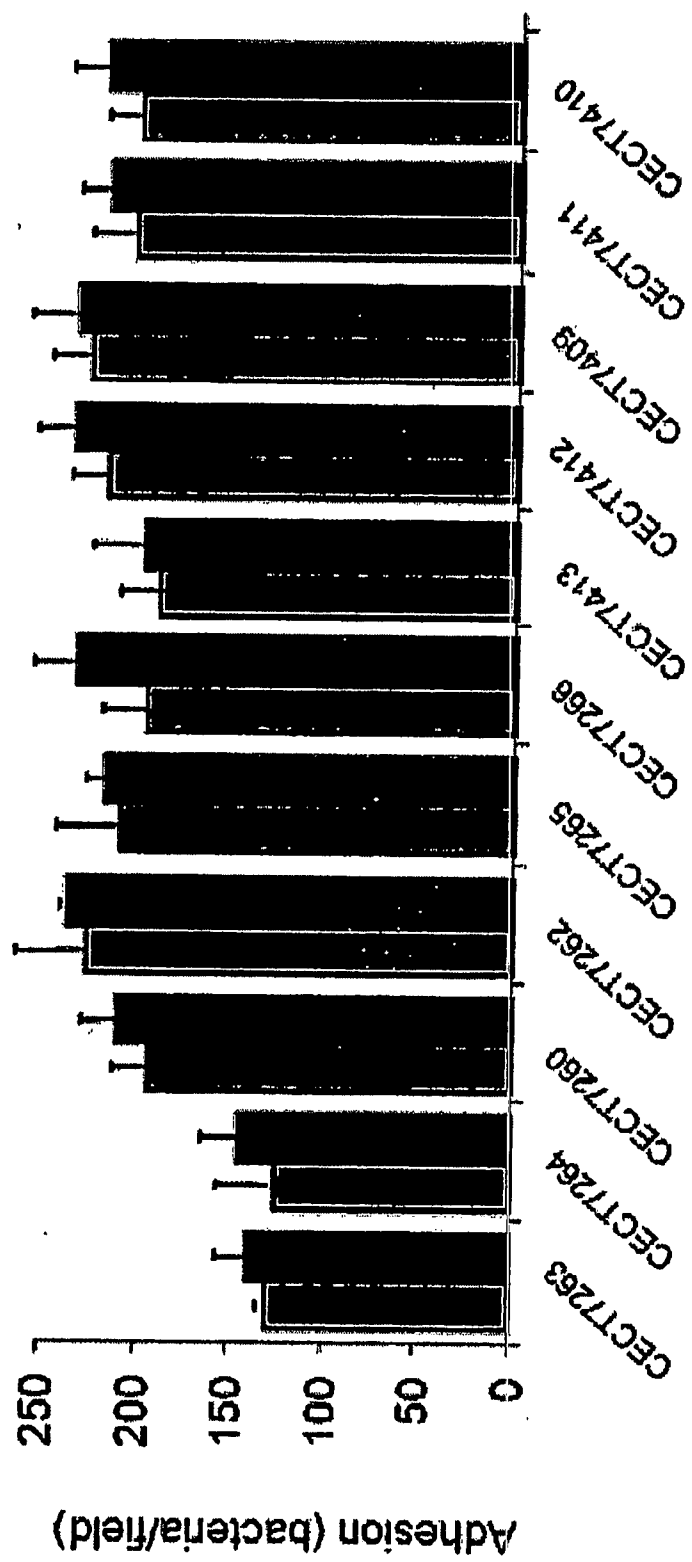


Figure 5

78

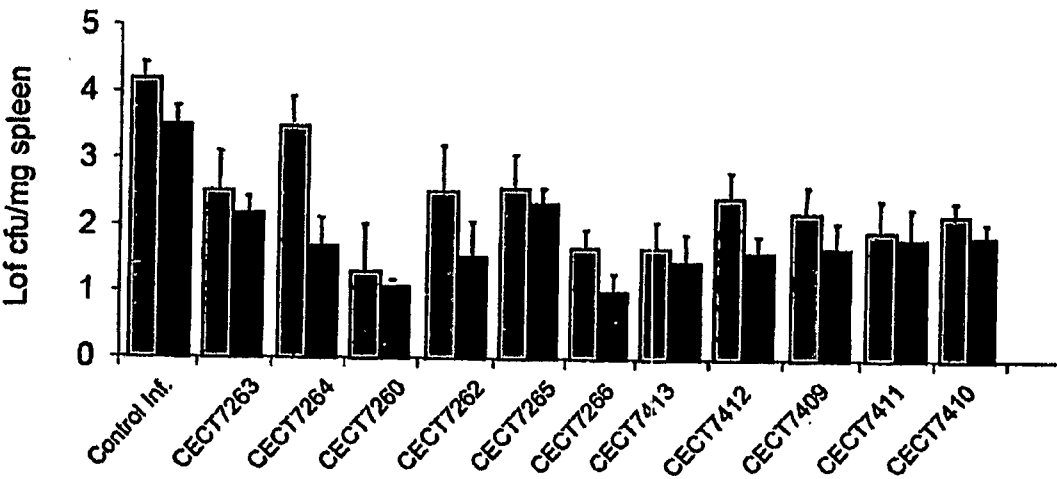
9/11



Figure 6

74

A



B

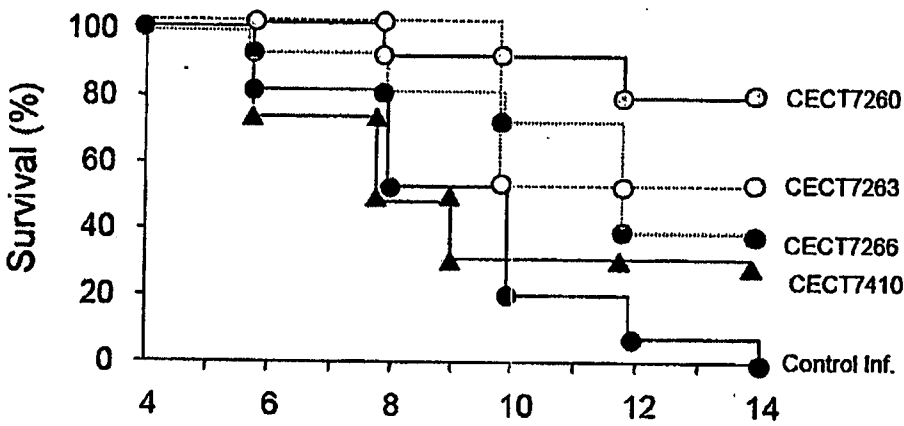


Figure 7

11/11

283
80

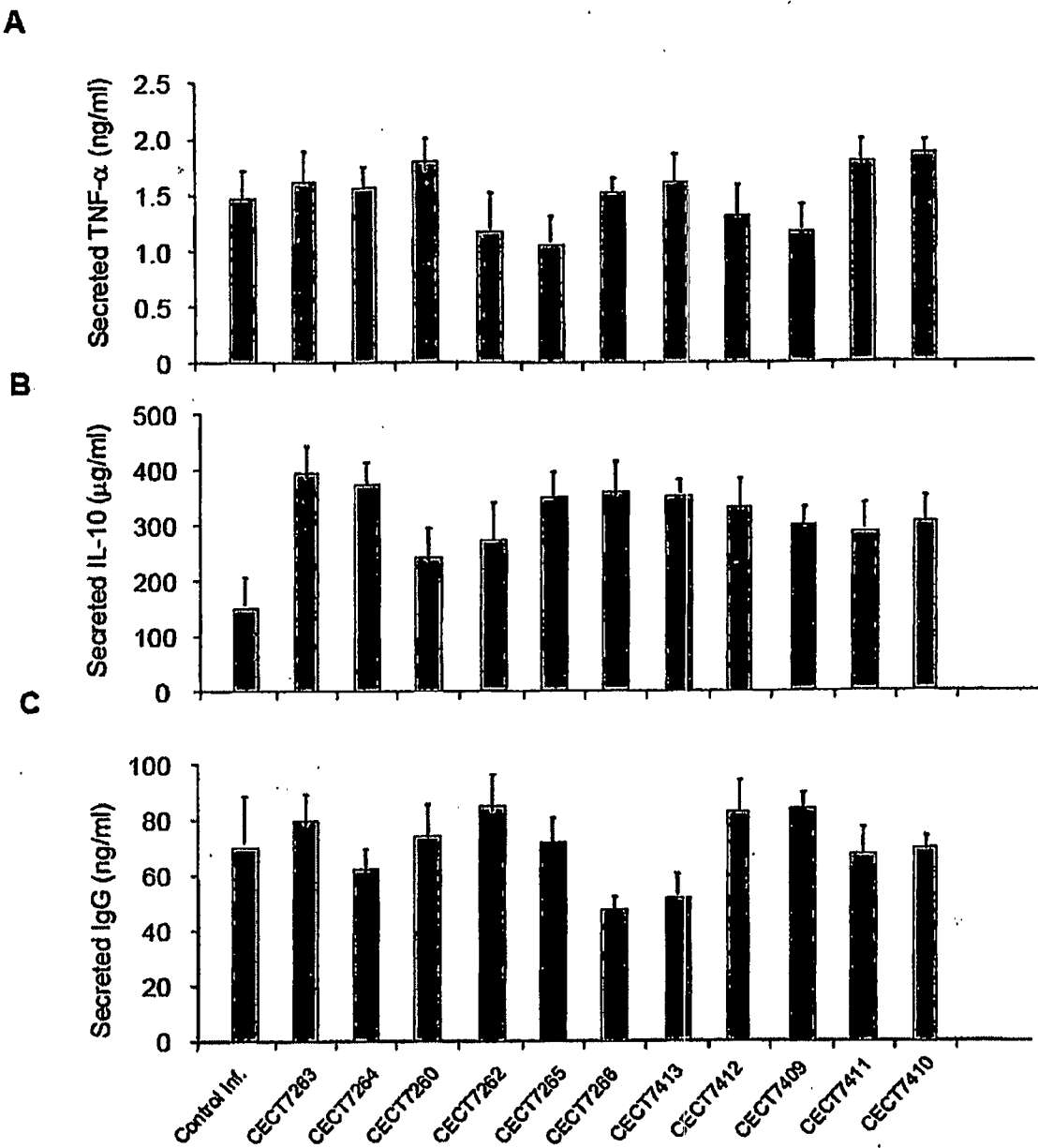


Figure 8

118
1967

286

GA 1

OLARTE RAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

ASSIGNMENT

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

organized under the laws of

Domiciled in

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

CESION

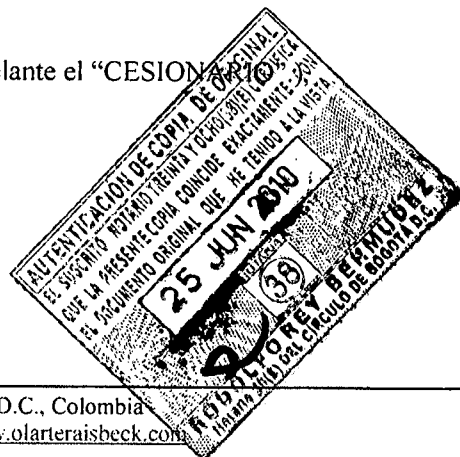
MARTÍN JIMÉNEZ, Rocío ✓
OLIVARES MARTÍN, Mónica ✓
JIMÉNEZ QUINTANA, Esther Antonia ✓
MARÍN MARTÍNEZ, María Luisa ✓
SIERRA ÁVILA, Saleta ✓
MALDONADO BARRAGÁN, Antonio ✓
MARTÍN MERINO, Virginia ✓
BLANCH MARTELL, Francesc ✓
TORRE LLOVERAS, Celina ✓
LARA VILLOSLADA, Federico ✓
ARROYO RODRÍGUEZ, Rebeca ✓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

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

organizada bajo las leyes de **ESPAÑA**

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

(de ahora en adelante el "CESIONARIO")



OLARTE RAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

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

289
87

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

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

So far as the Republic of Colombia is concerned.

en lo que concierne a la República de Colombia.

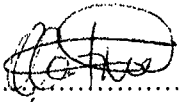
Place, date

Lugar, fecha

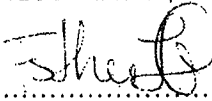
Assignor(s) (Signature)

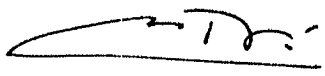
Cedente(s) (Firma)

Assignee(s) (Signature)

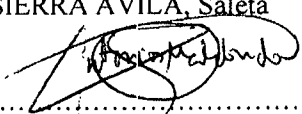

MARTÍN JIMÉNEZ, Rocio

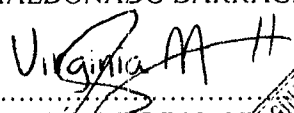
OLIVARES MARTÍN, Mónica

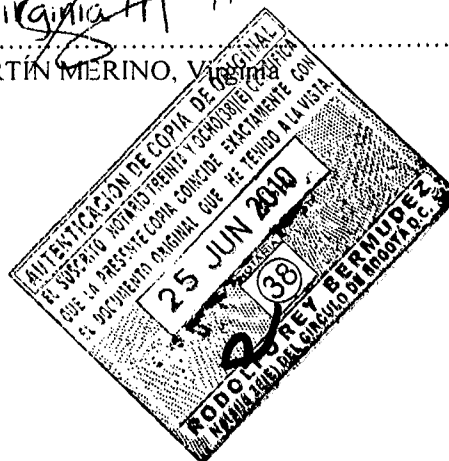

JIMÉNEZ QUINTANA, Esther Antonia


MARÍN MARTÍNEZ, María Luisa

SIERRA ÁVILA, Saleta


MALDONADO BARRAGÁN, Antonio


MARTÍN MERINO, Virginia A. H.

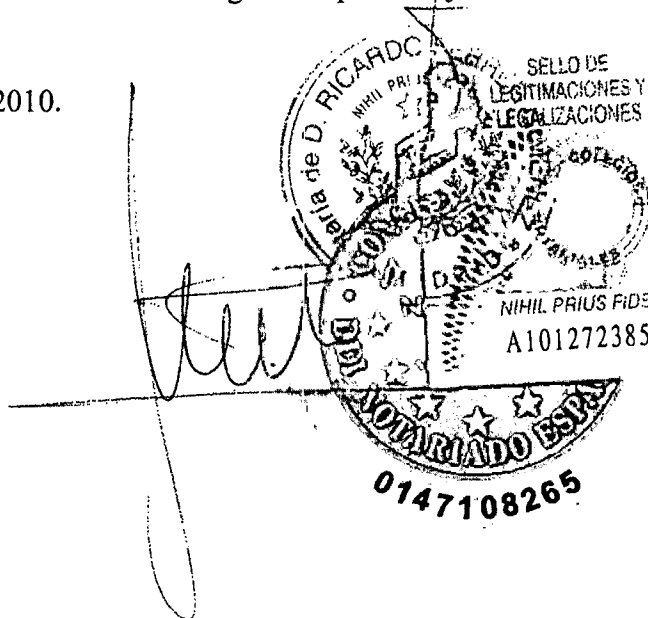


LEGITIMACION

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

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

En Madrid, a 22 de Junio de 2010.

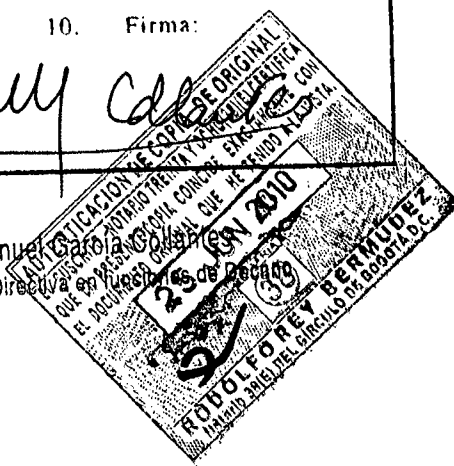


Apostille (o legalización única)
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)
(Real Decreto 2433/1978, de 2 de octubre)

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



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



OLARTE RAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

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

289
84
todos mis (nuestros) derechos, título e interés sobre mi (nuestra) invención tal como describe en:

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

So far as the Republic of Colombia is concerned.

en lo que concierne a la República de Colombia.

Barcelona, 6/4/10
Place, date

Lugar, fecha

Assignor(s) (Signature)

Cedente(s) (Firma)

Assignee(s) (Signature)

MARTÍN JIMÉNEZ, Rocío

OLIVARES MARTÍN, Mónica

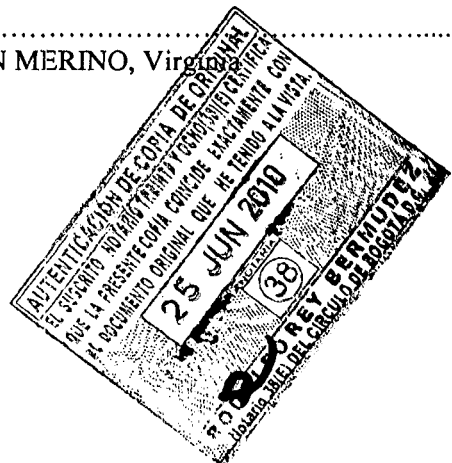
JIMÉNEZ QUINTANA, Esther Antonia

MARÍN MARTÍNEZ, María Luisa

SIERRA ÁVILA, Saleta

MALDONADO BARRAGÁN, Antonio

MARTÍN MERINO, Virginia



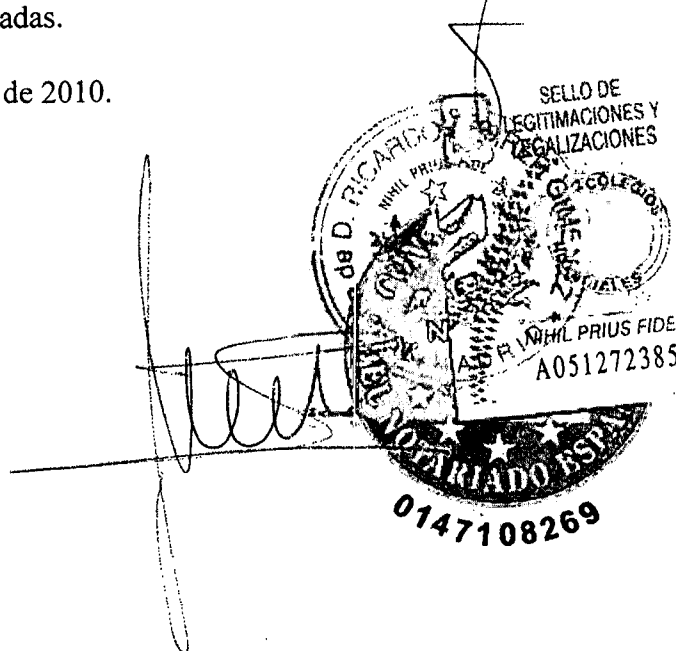
68

LEGITIMACION

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

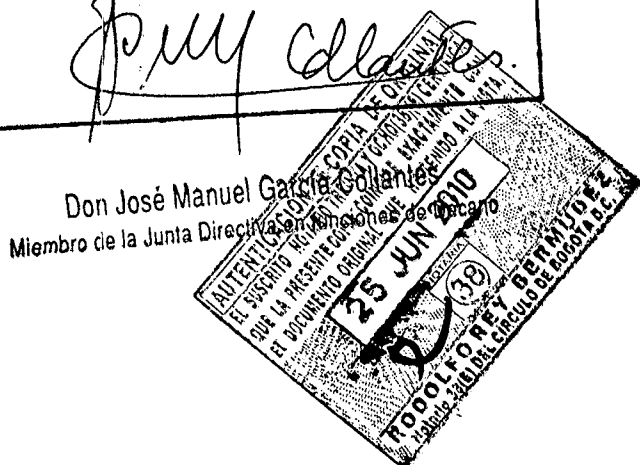
DOY FE: De que las firmas y rúbricas que antecede de DOÑA MONICA MARIA OLIVARES MARTIN con D.N.I número, 24248548-Q, y DOÑA MARIA SALETA SIERRA AVILA con D.N.I número, 44264101-A, las considero legítimas por cotejo con otras firmas originales legitimadas.

En Madrid, a 22 de Junio de 2010.



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

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



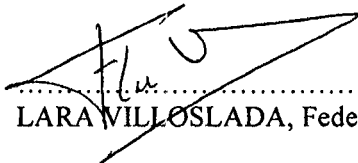
291

86

OLARTE RAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

.....
BLANCH MARTELL, Francesc

.....
TORRE LLOVERAS, Celina


.....
LARA VILLOSLADA, Federico

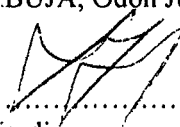
.....
ARROYO RODRÍGUEZ, Rebeca

.....
BOZA PUERTA, Julio

.....
JIMÉNEZ LÓPEZ, Jesús

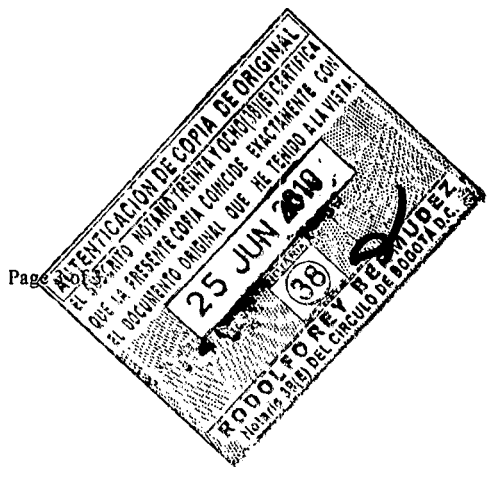
.....
FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, Leónides

.....
SOBRINO ABUJA, Odón Julián


.....
XAUS PEI, Jordi

.....
RODRÍGUEZ GÓMEZ, Juan Miguel

.....
DELGADO PALACIO, Susana



292

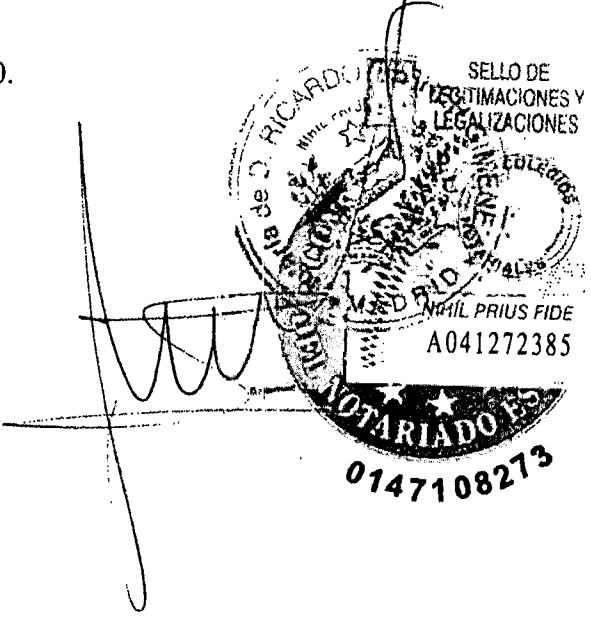
87

LEGITIMACION

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

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

En Madrid, a 22 de Junio de 2010.



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

1. Pais: España
El presente documento público

2. Ha sido firmado por D. Ricardo Ferrer Gimenez

3. Actuando en calidad de NOTARIO

4. Se halla sellado/timbrado con el de su Notaría

5. En Madrid 6. El 22 JUN. 2010

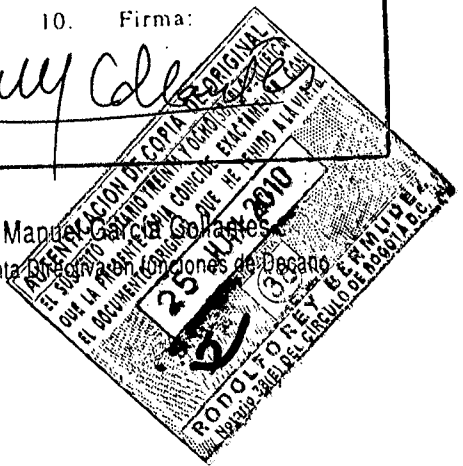
Por el Decano del Colegio Notarial de Madrid

Con el número 34784

Sello/timbre: 10. Firma: [Signature]



Don José Manuel García Gollantes
Miembro de la Junta de Gobierno del Ilustre Colegio de esta Capital



293

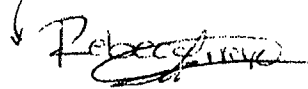
08

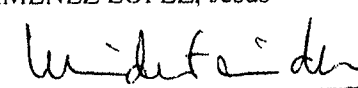
OLARTE RAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

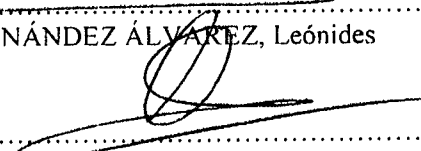
.....
BLANCH MARTELL, Francesc

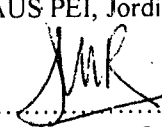
.....
TORRE LLOVERAS, Celina

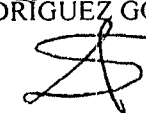
.....
LARA VILLOSLADA, Federico

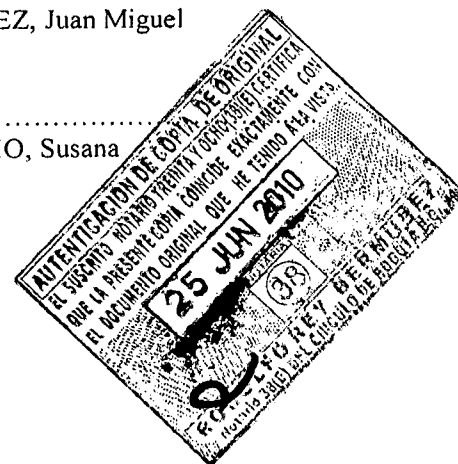
.....
ARROYO RODRÍGUEZ, Rebeca
↓ 
.....
BOZA PUERTA, Julio

.....
JIMÉNEZ LÓPEZ, Jesús

.....
FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, Leónides

.....

SOBRINO ABUJA, Odón Julián

.....
XAUS PEI, Jordi

.....
RODRÍGUEZ GÓMEZ, Juan Miguel

.....

DELGADO PALACIO, Susana



294

88

LEGITIMACION

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

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

En Madrid, a 22 de Junio de 2010.

[Handwritten signature of Ricardo Ferrer Gimenez]

SELO DE LEGITIMACIONES Y EGALIZACIONES
NIHIL PRIUS FIDE
A031272385
NOTARIADO ESPA
0147108277

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

1. Pais: España
El presente documento público

2. Ha sido firmado por D. Ricardo Ferrer Gimenez

3. Actuando en calidad de NOTARIO

4. Se halla sellado/timbado con el de su Notaría

5. En Madrid 6. El 22 JUN. 2010

Por el Decano del Colegio Notarial de Madrid
Con el número 34783

Sello/timbre: 10. Firma: *[Handwritten signature]*

FE PÚ.
NOTA
VEINTE CENTIMOS
CONSEJO
NOTA
EUROPEO
NOTARIADO ESPA
0156892498

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

AUTENTICACION DE COPIA DE ORIGINAL
PRESENTE CON EL ORIGINAL QUE SE LE ENVIÓ
REPOSICION DE COPIA DE ORIGINAL
22 JUN 2010

295

90

OLARTE RAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

.....
BLANCH MARTELL, Francesc

.....
TORRE LLOVERAS, Celina

.....
LARA VILLOSLADA, Federico

.....
ARROYO RODRÍGUEZ, Rebeca

.....
BOZA PUERTA, Julio

.....
JIMÉNEZ LÓPEZ, Jesús

.....
FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, Leónides

.....
SOBRINO ABUJA, Odón Julián

.....
XAUS PEI, Jordi

.....
RODRÍGUEZ GÓMEZ, Juan Miguel

.....
DELGADO PALACIO, Susana



OT.

LEGITIMACION

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

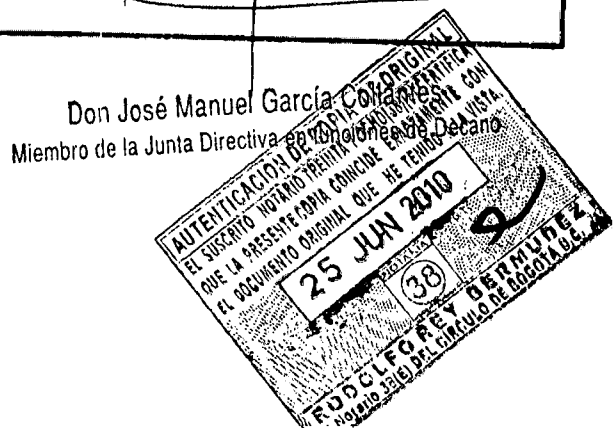
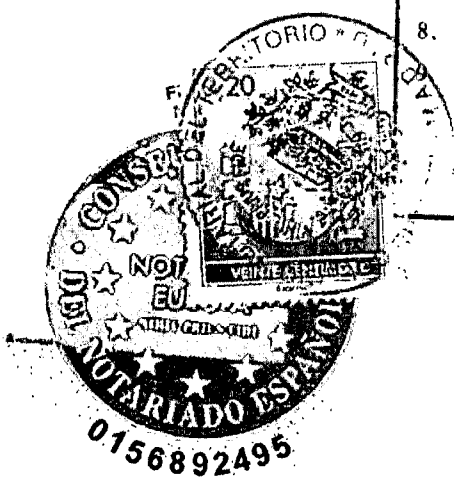
DOY FE: De que la firma y rúbrica que antecede, DON JULIO JOSE BOZA PUERTA con Pasaporte Español número, AD935725, la considero legítima por cotejo con otra firma original legitimada.

En Madrid a 22 de Junio de 2010



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

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



297
AL

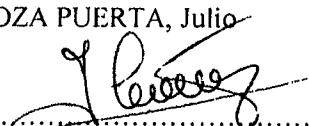
.....
BLANCH MARTELL, Francesc

.....
TORRE LLOVERAS, Celina

.....
LARA VILLOSLADA, Federico

.....
ARROYO RODRÍGUEZ, Rebeca

.....
BOZA PUERTA, Julio


.....
JIMÉNEZ LÓPEZ, Jesús

.....
FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, Leónides

.....
SOBRINO ABUJA, Odón Julián

.....
XAUS PEI, Jordi

.....
RODRÍGUEZ GÓMEZ, Juan Miguel

.....
DELGADO PALACIO, Luciana



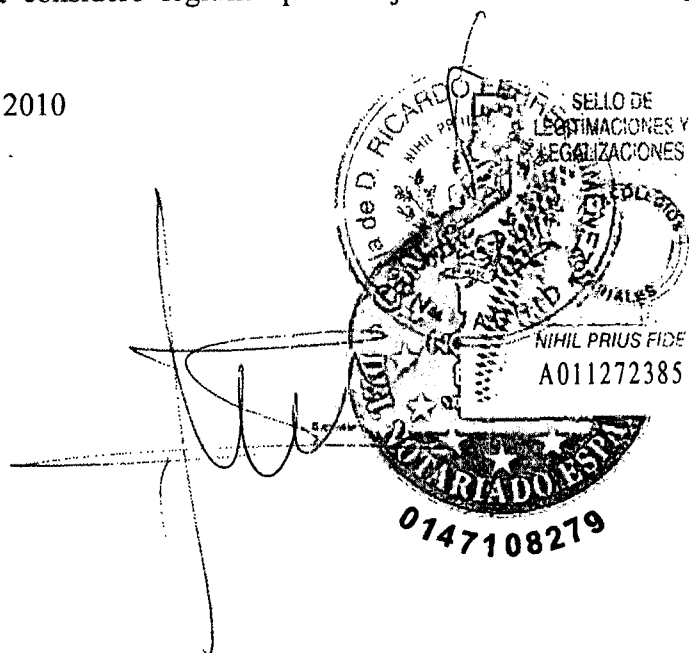
CB.

LEGITIMACION

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

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

En Madrid a 22 de Junio de 2010



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

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



Don José Manuel García...
Miembro de la Junta Directiva...



AP 1
17967

299
CH

OLARTE RAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

ASSIGNMENT

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

organized under the laws of

Domiciled in

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

CESION

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

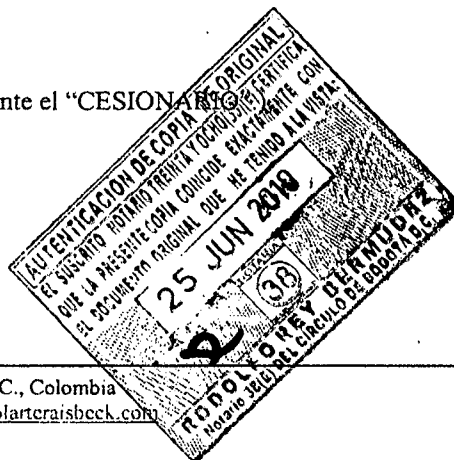
por medio de la presente y a cambio del pago de una contraprestación económica de — \$1 —, cedo (cedemos) a **PULEVA BIOTECH, S.A.**

organizada bajo las leyes de ESPAÑA

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

(de ahora en adelante el "CESIONARIO")

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



300
C/S

OLARTE RAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

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

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

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

So far as the Republic of Colombia is concerned.

en lo que concierne a la República de Colombia.

Place, date

Sant Juan del Valle, 22 -5-2010
Lugar, fecha

Assignor(s) (Signature)

Cedente(s) (Firma)

Assignee(s) (Signature)

.....
MARTÍN JIMÉNEZ, Rocío

.....
OLIVARES MARTÍN, Mónica

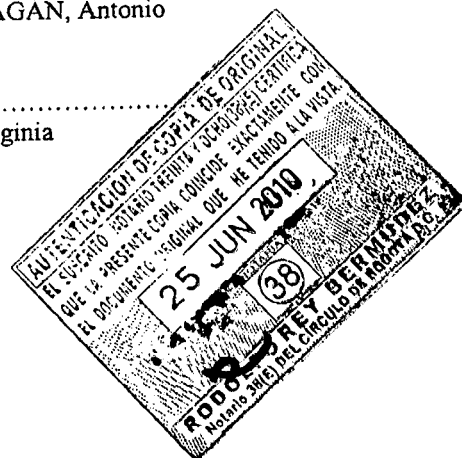
.....
JIMÉNEZ QUINTANA, Esther Antonia

.....
MARÍN MARTÍNEZ, María Luisa

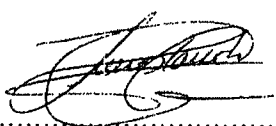
.....
SIERRA ÁVILA, Saleta

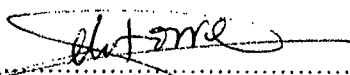
.....
MALDONADO BARRAGÁN, Antonio

.....
MARTÍN MERINO, Virginia



OLARTE RAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

301
at

.....
BLANCH MARTELL, Francesc


.....
TORRE LLOVERAS, Celina

.....
LARA VILLOSLADA, Federico

.....
ARROYO RODRÍGUEZ, Rebeca

.....
BOZA PUERTA, Julio

.....
JIMÉNEZ LÓPEZ, Jesús

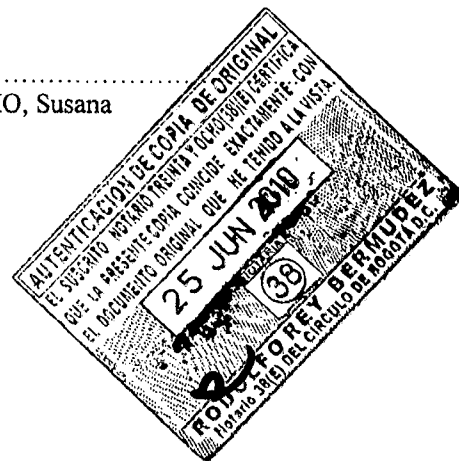
.....
FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, Leónides

.....
SOBRINO ABUJA, Odón Julián

.....
XAUS PEI, Jordi

.....
RODRÍGUEZ GÓMEZ, Juan Miguel

.....
DELGADO PALACIO, Susana



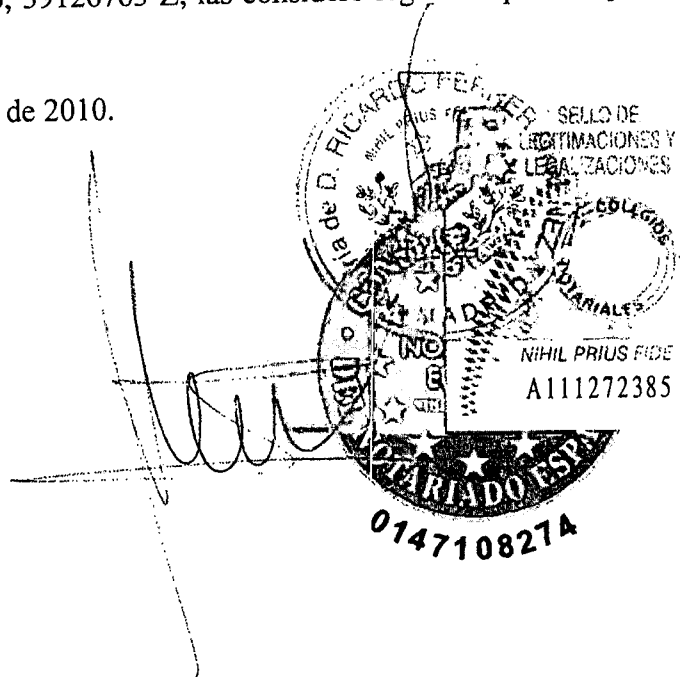
97

LEGITIMACION

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

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

En Madrid, a 22 de Junio de 2010.



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

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



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

