

LLOREDA & CIA. S. A.

ABOGADOS

BOGOTA - COLOMBIA
OFICINA FUNDADA EN 1941
APARTADO AEREO 12304
TEL: 57-1-3264270 57-1-6069700
FAX: 57-1-3264271 57-1-6069701
CABLES: LLOREDACAMACHO
CALLE 72 No. 5-83 5º. PISO
www.lloredacamacho.com
jlcco@lloredacamacho.com

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 02-108185-00009-0000

Fecha: 2007-10-26 18:18:03 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE IYII Eva: 379 FASE NACIONAL II
Act 444 RESPUESTA PEQUE Folios: 93

Re: P1.-SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.-Solicitud de Patente de
Invención Fase Nacional PCT para "NUEVOS PROBIOTICOS PARA
APLICACIONES DE ALIMENTO DE MASCOTAS".-Clase C12N 1/20.-
Expediente número 02-108. 185.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 3 de Agosto de 2007.

2. Con el fin de dar respuesta a las objeciones expuestas por el señor Examinador en su Concepto Técnico No. **1195** bajo los acápites de (i) Claridad de la Solicitud, (ii) No es una Invención, (iii) Excepción a la Patentabilidad, (iv) Reivindicaciones relativas a un uso o a un uso distinto y (v) Nivel Inventivo, me permito presentar las siguientes modificaciones y argumentos técnicos, por medio de los cuales no solo se superan dichas objeciones, sino que además se demuestra en forma contundente la patentabilidad de la presente solicitud.

3. **Claridad:**

En respuesta a las diversas objeciones presentadas por el señor Examinador en su Concepto Técnico No. **1195** en relación con la claridad de la descripción y las reivindicaciones de la invención bajo estudio, me permito manifestar que es deseo del solicitante presentar un nuevo texto de la solicitud, el cual ha sido modificado de conformidad con dichas observaciones, con el fin de definir en forma más clara y precisa el objeto de la invención, así como también con el propósito de limitar el alcance de la misma y de hacerla perfectamente distinguible de las enseñanzas del estado de la técnica.

3.1 Claridad del Capítulo Descriptivo:

De conformidad con lo anterior, me permito señalar las siguientes modificaciones dentro del texto de la descripción, las cuales corresponden a correcciones de carácter tipográfico debido a errores involuntarios cometidos en el momento de la traducción y preparación del texto de la solicitud en español, permitiendo así una mayor y mejor comprensión de la misma:

- (i) Se ha reemplazado el término incorrecto "prebiótica" por el término correcto **"probiótica"** en las líneas 13 y 19 de la página 8, la línea 17 de la página 15, y la línea 26 de la página 28 de la descripción;
- (ii) Se ha reemplazado el término incorrecto "inactividad" por el término correcto **"inactivada"** en la línea 11 de la página 14 de la descripción;
- (iii) Se ha reemplazado el término incorrecto "probiótico" por el término correcto **"prebiótico"** en la línea 29 de la página 18 y la línea 2 de la página 19 de la descripción;
- (iv) Se ha reemplazado la expresión incorrecta "El pH promedio pH 3.4" por la expresión correcta **"El pH promedio fue de pH 3.4"** en la línea 8 de la página 29 de la descripción;
- (v) Se ha reemplazado la expresión incorrecta "se introdujo un nitrógeno" por la expresión correcta **"se introdujo nitrógeno"** en la línea 5 de la página 34 de la descripción;
- (vi) Se ha reemplazado la expresión incorrecta "Esta solución luego transfiere" por la expresión correcta **"Esta solución luego se transfiere"** en las líneas 25 y 26 de la página 42 de la descripción;
- (vii) Se ha reemplazado el término incorrecto "kenterobacteriacea" por el término correcto **"enterobacteriacea"** en la línea 21 de la página 52 de la descripción;
- (viii) Se han reemplazado las expresiones incorrectas "potencial de especialmente de" y "de la manera en que" por las expresiones correctas **"potencial de especialmente"** y **"de tal manera que"** en las líneas 2 y 16, respectivamente, de la página 56 de la descripción;

- (ix) Se han reemplazado las expresiones incorrectas "Parckard", "laproliferación" y "enla" por las expresiones correctas **"Packard"**, **"la proliferación"** y **"en la"** en las líneas 6, 9 y 13, respectivamente, de la página 59 de la descripción;
- (x) Se han reemplazado las expresiones incorrectas "Esto tiende en las cepas candidatas potenciales de selección" y "anti-cáncder" por las expresiones correctas **"Esto tiende a la selección de cepas candidatas potenciales"** y **"anti-cáncer"** en las líneas 5 a 6 y 7, respectivamente, de la página 60 de la descripción;
- (xi) Se han reemplazado las expresiones incorrectas "para amplificadores de citosina canina" y "los resultados expresan comunidades arbitrarias" por las expresiones correctas **"para la amplificación de citosina canina"** y **"los resultados se expresan como unidades arbitrarias"** en las líneas 4 y 13 a 14, respectivamente, de la página 56 de la descripción. Adicionalmente, en la misma página, se han eliminado las frases "densidades de píxeles de cada banda de producto de PCR" y "bacterias se diluyeron en el medio RPMI" de las líneas 16 a 17 y 23 a 24, respectivamente, ya que dichas expresiones se encuentran repetidas dentro del texto;
- (xii) Se han reemplazado las expresiones incorrectas "que tienen menos caspa", "Estos alimentados en la dieta "D"", "Estas características se encuentran que no difieren" y "manera substancialmente a todo lo largo" por las expresiones correctas **"que tienen notablemente menos caspa"**, **"Aquellos alimentados en la dieta "B""**, **"Se encuentra que estas características no difieren"** y **"manera substancialmente homogénea a todo lo largo"** en las líneas 8, 9 a 10, 12 a 13 y 29, respectivamente, de la página 64 de la descripción;
- (xiii) Se han reemplazado las expresiones incorrectas "En las lecturas del" y "que substituyen el resto" por las expresiones correctas **"Las lecturas del"** y **"que constituyen el resto"** en las líneas 1 y 19, respectivamente, de la página 67 de la descripción; y
- (xiv) Se han reemplazado las expresiones incorrectas "Enterococcus SF68", "se utilizan a 125°C", "Como un complemento prebiótico" y "el empaque adicional en la forma de sobrecitos con cepas de las siguientes especies de

lactobacilos se proporcionan" por las expresiones correctas "***Enterococcus faecium* SF68**", "**se esterilizan a 125°C**", "**Como un complemento probiótico**" y "**se proporciona un empaque adicional en la forma de sobrecitos con cepas de las siguientes especies de lactobacilos**" en las líneas 2, 25, 26 y 28 a 30, respectivamente, de la página 68 de la descripción.

Ahora bien, en su Concepto Técnico el señor Examinador señala que en la descripción "**No se evidencia claramente el desarrollo realizado, dejando indeterminadas las características técnicas del invento, en especial en lo que se refiere a las composiciones desarrolladas.**"

Según el artículo 29 de la Decisión 486 **para la caracterización y diferenciación de microorganismos** debe realizarse un depósito en un **Organismo Internacional reconocido**; **los depósitos en colecciones privadas no subsanan este requisito. Por lo tanto los microorganismos reclamados** (reivindicaciones 1-6 y dependientes) **no están soportados enteramente en la descripción**" (resaltado fuera de texto).

Sobre este particular, me permito manifestar que a partir de una lectura cuidadosa del texto de la descripción, la persona versada en la materia sí puede comprender claramente cuales son las características técnicas del invento, esto es, cuales son las cepas aisladas, identificadas, caracterizadas y diferenciadas por el solicitante, toda vez que las mismas han sido depositadas efectivamente ante un Organismo Internacional de Depósito reconocido conforme al Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes, tal como se expone de la línea 31, página 10, a la línea 10 de la página 11, en donde se establece lo siguiente:

"Las siguientes cepas *Lactobacillus reuteri* NCC2581, *Lactobacillus rhamnosus* NCC2583, *Lactobacillus reuteri* NCC2592, *Lactobacillus reuteri* NCC2603, *Lactobacillus reuteri* NCC2613 y *Lactobacillus acidophilus* NCC2628 **se depositaron a manera de ejemplo bajo el tratado de Budapest, en la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos, 25 rue du docteur Roux, 75724, París, Francia, el 19 de abril del 2000, bajo las siguientes referencias CNCM I-2448, CNCM I-2449, CNCM I-2450, CNCM I-2451, CNCM I-2452 y CNCM I-2453, respectivamente**" (resaltado fuera de texto).

Por lo tanto, teniendo en cuenta las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio, las cuales se detallarán más adelante, es completamente claro que las nuevas reivindicaciones de producto 1 y 8, relacionadas con los microorganismos

anteriormente mencionados, tienen pleno sustento en la descripción y han sido perfectamente caracterizados y diferenciados mediante el depósito hecho ante una entidad reconocida como lo es la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos de París.

Adicionalmente, me permito señalar que el desarrollo realizado en la presente solicitud ha sido expuesto en forma suficiente y completa dentro del texto de la descripción, particularmente en lo relacionado con la identidad y características de las cepas reveladas, el método de selección de las mismas, las composiciones que las contienen y los métodos de producción de dichas composiciones, tal como ha sido enseñado mediante los ejemplos que hacen parte del texto presentado, toda vez que se han señalado las condiciones para la selección de las cepas que hacen parte de la composición alimenticia reclamada, así como también se han descrito los componentes adicionales que pueden estar contenidos en dichas composiciones.

De igual manera, en los ejemplos se han proporcionado datos acerca de la evaluación de las composiciones alimenticias para mascotas objeto de la invención frente a diferentes condiciones presentes en perro y gatos, demostrando así efectividad de las mismas en relación con dietas basadas en composiciones comerciales convencionales, tal como se ha revelado en los ejemplos 3 a 13 de la descripción.

Finalmente, y en conexión con lo anterior, en la descripción de la solicitud también se ha aportado la información necesaria acerca de la naturaleza y componentes de la composición alimenticia revelada en la invención, tal como se puede apreciar en las páginas 14 a 20 de la memoria descriptiva, en las que se hace referencia de una manera más que suficiente de las características técnicas que poseen las composiciones para mascotas enseñadas por el solicitante, información que adicionalmente se ve complementada con los ejemplos ya mencionados acerca de la selección de las cepas bacterianas a ser introducidas en tales composiciones y los productos alimenticios suministrados a perros y gatos (ejemplos 11, 12, 13 y 14).

Por todo lo anterior, me permito manifestar al señor Examinador que la descripción de la presente solicitud cumple efectivamente con los requisitos señalados en el artículo 28 de la Decisión 486, toda vez que la divulgación realizada por el solicitante ha sido suficientemente clara y completa para su comprensión y ejecución por parte de una persona versada en la materia técnica, quien sabría como llevar a cabo la invención a partir de las enseñanzas contenidas en dicho texto.

3.2 Claridad del Capítulo Reivindicatorio:

Por otra parte, me permito dirigir la atención del señor Examinador al hecho de que **debidamente autorizado por mi representado**, se ha reemplazado el capítulo reivindicatorio actualmente presentado por un nuevo capítulo compuesto por **8 reivindicaciones**, en el que las nuevas reivindicaciones 1 a 7 corresponden a las reivindicaciones 1 a 4 y 8 a 10 del capítulo reivindicatorio concedido para la Patente Europea No. **EP 1 290 136** equivalente a la presente solicitud (de la cual me permito anexar copia de la carátula y las reivindicaciones) y en el que la nueva reivindicación 8 corresponde a una combinación de la materia contenida en las reivindicaciones 17 y 22 a 24 originalmente presentadas.

De manera particular, me permito señalar que la nueva reivindicación 1, correspondiente a la reivindicación 1 concedida por la Oficina de Patentes Europea y dirigida a la protección de ciertas cepas específicas de bacterias del ácido láctico, tiene pleno sustento dentro de la descripción de la solicitud, toda vez que tal como ya fue mencionado, estas cepas fueron debidamente caracterizadas y diferenciadas mediante el depósito realizado ante una entidad reconocida por el tratado de Budapest, como lo es la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos de París (ver páginas 10 y 11 de la descripción de la presente solicitud).

Adicionalmente, me permito señalar que el sustento para este nuevo capítulo reivindicatorio se encuentra a lo largo de la descripción, especialmente en los ejemplos de las páginas 25 a 41, en el que se describen los criterios de selección de las cepas bacterianas objeto de la presente invención, tanto para los métodos de obtención de las cepas como de preparación de las composiciones alimenticias que las incluyen.

Por otra parte, resulta pertinente resaltar que dentro de este nuevo juego de reivindicaciones se han subsanado las faltas relacionadas con la redacción de las reivindicaciones, se han definido los métodos mediante las etapas necesarias y las composiciones por los elementos esenciales que las constituyen.

Ahora bien, de conformidad con las anteriores modificaciones, es claro que mediante la cancelación de algunas expresiones poco claras y la forma como se ha presentado ahora tanto el texto de la descripción como el nuevo capítulo reivindicatorio, se han superado plenamente todas las observaciones que al respecto se han presentado por parte del señor Examinador en su Concepto Técnico No. **1195**, ya que se ha definido el objeto de la invención de manera tal que resulta completamente claro para una persona versada en la materia interesada en las enseñanzas de la solicitud, así como también resulta claro hasta donde llega el alcance de la misma.

Finalmente, me permito resaltar que dichas modificaciones **no amplían de ninguna forma** el alcance de la solicitud tal como fue originalmente presentada, ya que las mismas se presentan con el fin de dar respuesta a las objeciones del señor Examinador y constituyen en sí mismas una limitación de la materia como se presentó inicialmente ante ese Despacho.

4. **No es una invención:**

Respecto a la objeción realizada por el Señor Examinador, dirigida a que las reivindicaciones 1 a 6 de la presente solicitud de patente no pueden ser consideradas como invención de acuerdo con el artículo 15 literal a)-f) de la Decisión 486 teniendo en cuenta que: *"bajo la legislación colombiana el todo o parte de microorganismos vivos tal como se encuentran en la naturaleza no se considera una invención, las cepas bacterianas aisladas (reivindicaciones 1-6 y dependientes), tal como se reclaman, no se consideran materia susceptible de patente.*

De tratarse de cepas desarrolladas en el laboratorio deben poder diferenciarse de las naturales. De no ser así, las cepas que correspondan con las silvestres deberán excluirse"

De la manera más respetuosa me permito afirmar que difiero de la objeción hecha a este respecto por el Señor Examinador, por cuanto dicha objeción va en directa violación de las normas Andinas y Tratados Internacionales suscritos por Colombia en materia de Propiedad Industrial.

Lo anterior, teniendo en cuenta que la norma aplicable en materia de propiedad industrial en Colombia es la Decisión 486 y ésta en su artículo 15 dispone: "No se consideran invenciones:

- (a) *los descubrimientos, las teorías científicas y los métodos matemáticos.*
- (b) *los procesos biológicos naturales, el material biológico existente **el todo o parte de seres vivos tal como se encuentran en la naturaleza** o aquel que pueda ser aislado, inclusive genoma o germoplasma de cualquier ser vivo natural;*
- (c) *las obras literarias y artísticas o cualquier otra protegida por el derecho de autor;*
- (d) *los planes, reglas y métodos para el ejercicio de actividades intelectuales, juegos o actividades económico-comerciales;*

- (e) *los programas de ordenadores o el soporte lógico, como tales; y,*
- (f) *las formas de presentar información". (Negrilla nuestra)*

Este Despacho erróneamente considera que la materia objeto de protección por parte de esta solicitud está comprendida en el numeral b) de la norma arriba citada y por lo tanto no acepta su protección. Sin embargo, este Despacho no ha tenido en cuenta que esta misma **Decisión 486** en su parte final, esto es en la **Disposición Transitoria Segunda** dispone:

"Los microorganismos serán patentables hasta tanto se adopten medidas distintas resultantes del examen previsto en el apartado b) del artículo 27, numeral 3 del ADPIC" (Negrilla nuestra).

En este sentido es importante señalar adicionalmente, que el acuerdo ADPIC el cual fue ratificado en Colombia mediante Ley 172 de 1994, actualmente vigente en nuestro país, en su **artículo 27, apartado b del numeral 3** dispone que: "Los Miembros podrán excluir asimismo de la patentabilidad:

- (a) *los métodos de diagnóstico, terapéuticos y quirúrgicos para el tratamiento de personas o animales;*
- (b) *las plantas y los animales excepto los microorganismos, y los procedimientos esencialmente biológicos para la producción de plantas o animales, que no sean procedimientos no biológicos o microbiológicos. Sin embargo, los Miembros otorgarán protección a todas las obtenciones vegetales mediante patentes, mediante un sistema eficaz sui generis o mediante una combinación de aquéllas y éste. Las disposiciones del presente apartado serán objeto de examen cuatro años después de la entrada en vigor del Acuerdo sobre la OMC.. (Negrilla nuestra)*

Por lo tanto de acuerdo con la disposición arriba transcrita de los ADPIC, y a la vez la referencia hecha a la disposición transitoria segunda de la Decisión 486, es completamente claro que la legislación colombiana sí **permite la patentabilidad de los microorganismos** sin consideraciones adicionales específicas en cuanto a que los microorganismos deban ser modificados o no, lo cual constituye una aclaración al artículo 15 numeral b) donde se hace referencia de manera general a seres vivos tal como se encuentran en la naturaleza, y en consecuencia excluyendo por lo tanto de esta prohibición a los microorganismos, considerándolos **susceptibles de protección mediante patentes.**

Ahora bien, habiendo aclarado el hecho de que los microorganismos si son susceptibles de protección mediante patente, de acuerdo con lo señalado en el acuerdo de los ADPIC, al cual hace referencia la disposición Transitoria Segunda de la Decisión 486, me permito llamar adicionalmente la atención de ese Despacho a lo que se señala en el Manual Andino en relación con el tema de los microorganismos.

El mencionado Manual Andino de Patentes establece lo siguiente: "**El patentamiento de microorganismos es una excepción a la prohibición de patentabilidad de material biológico. En consecuencia, su patentabilidad está sujeta a la Segunda Disposición Transitoria de la D. 486**"¹. (Negrilla nuestra).

Si el Manual Andino de Patentes el cual ha sido elaborado por la Secretaría General de la Comunidad Andina, tomando como base la normativa andina vigente, la jurisprudencia del Tribunal Andino de Justicia, y la práctica de las distintas Oficinas de los países involucrados; y además está dirigido especialmente a armonizar los conceptos de patentabilidad y señalar la correcta interpretación de los mismos bajo la visión de las normas comunitarias expuestas en la Decisión 486 de la Comunidad Andina, establece que frente a la prohibición de patentar material biológico hay una excepción y es **el patentamiento de microorganismos**, no existe discusión de que dicha materia es perfectamente patentable en la Comunidad Andina y adicionalmente, que ninguna de estas disposiciones exige la modificación del microorganismo para poder ser materia susceptible de protección mediante patente.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, no se entiende como este Despacho de manera arbitraria objeta la patentabilidad de un microorganismo, cuando normas superiores como lo es el acuerdo ADIPC y la decisión 486 son claras en permitir su protección.

En consecuencia es claro que la materia protegida por la nueva reivindicación 1 si es susceptible de protección mediante patente, y por lo tanto se le solicita a este Despacho, proceder a conceder el privilegio de patente solicitado.

5. **Excepciones a la patentabilidad:**

Bajo este acápite, el señor Examinador ha manifestado que "En las reivindicaciones 26 a 31 se reclaman métodos de diagnóstico o tratamiento" los cuales, de conformidad con el artículo 20 de la Decisión 486, no son patentables.

Sobre este particular, me permito dirigir la atención del señor Examinador al hecho de que mediante las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio, se han

¹ COMUNIDAD ANDINA, Secretaría General, "Manual Andino de Patentes", Noviembre de 2003, Lima, Perú, página 52.

eliminado las reivindicaciones dirigidas a métodos de tratamiento o diagnóstico, superando así plenamente cualquier objeción al respecto.

6. Reivindicaciones relativas a un uso o a un uso distinto:

De conformidad con lo expuesto en el Concepto Técnico No. **1195** "las reivindicaciones 7 - 16 reclaman el uso de microorganismos aislados en formulación de composiciones para alimentación y tratamiento de mascotas", los cuales según los artículos 14 y 21 de la Decisión Andina 486, no corresponden a materia susceptible de ser patentada.

En relación con lo anterior, me permito señalar que de acuerdo con las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio de la presente solicitud, las reivindicaciones dirigidas a un uso también han sido eliminadas, dando así respuesta definitiva a las objeciones que sobre este particular fueron formuladas por el señor Examinador.

7. Antecedentes técnicos:

La presente invención se refiere a nuevas bacterias de ácido láctico que se han aislado y seleccionado por su potencial probiótico, así como también a los métodos para su selección, a las composiciones de alimento para mascotas que contienen dichas cepas y los métodos para la fabricación de tales composiciones.

En la actualidad, se ha reconocido que el bienestar de los animales domésticos se relaciona estrechamente con la alimentación, por lo que las composiciones alimenticias para mascotas, además de proporcionar valor nutritivo, influyen en el equilibrio de la microflora intestinal y pueden conducir o prevenir trastornos gastrointestinales.

En relación con lo anterior, se ha determinado que los constituyentes de la microflora gastrointestinal de perros y gatos está compuesta, principalmente, por *Bacteroides sp.*, *Clostridium sp.*, *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.* y levaduras, en donde el número y composición de esta flora endógena tiende a ser más bien estable, aunque la edad y en un menor grado el alimento, pueden modificarla.

También se ha determinado que factores como la acidez gástrica, bilis, peristalsis intestinal e inmunidad local son importantes en la regulación de la flora bacteriana en el intestino delgado de los seres humanos y otros mamíferos, y que frecuentemente, los trastornos gastrointestinales de felinos y caninos se relacionan con el sobrecrecimiento bacteriano y la producción de enterotoxinas producidas por bacterias patógenas.

Por lo tanto, durante los últimos años la investigación se ha enfocado en algunas cepas valiosas de ácido láctico y su uso potencial como agentes probióticos, esto es, preparaciones microbianas viables que promueven la salud de los mamíferos al conservar la microflora natural en el intestino. Se piensa que los probióticos se unen a la mucosa intestinal, colonizando el tracto intestinal e impidiendo de esta forma la unión de microorganismo peligrosos al mismo. Sin embargo, un prerrequisito para su acción reside en el hecho de que tienen que alcanzar la mucosa del intestino de una forma apropiada y viable y especialmente, que no se destruyan por la influencia del bajo pH que prevalece en el estómago.

Ahora bien, no obstante el hecho de que documentos como la patente US 5,968,569 describi la inclusión de un microorganismo probiótico en un cereal de alimento para mascota, es completamente claro que la identificación de cepas bacterianas capaces de acción probiótica constituye uno de los objetivos principales en este campo de investigación, toda vez que existe la necesidad de proporcionar nuevas cepas que se adapten particularmente a las necesidades de las mascotas, de manera tal que se puedan seleccionar precisamente por sus altas propiedades probióticas benéficas para los animales domésticos, con el fin de ser incorporadas en composiciones alimenticias para las mascotas.

En este sentido, la presente invención surge como una respuesta altamente efectiva a estas necesidades, toda vez que ni en el documento de patente anteriormente mencionado, ni en el estado de la técnica conocido, se proporciona información respecto a las cepas bacterianas de ácido láctico propuestas específicamente por el solicitante para la salud de las mascotas, por lo que el presente desarrollo representa una novedosa e inventiva alternativa en el campo de las composiciones alimenticias con actividad probiótica benéfica para los animales domésticos, toda vez que combinados con el alimento, estos microorganismos ejercen de manera particular sus efectos benéficos probióticos en el buen sabor, digestión y salud del intestino, función inmunitaria y condiciones sanitarias, estas últimas por medio de la contribución a una reducción del volumen fecal y al menos una desodorización parcial de las heces caninas, contribuyendo así al avance tecnológico en el campo de los productos alimenticios para mascotas.

8. Nivel Inventivo:

Tal como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se relaciona con novedosas cepas de bacterias de ácido láctico con actividad probiótica, los métodos para su selección, las composiciones alimenticias que contienen dichos microorganismos y los métodos de fabricación de tales composiciones, cuyo objetivo es tener "un impacto benéfico particular en los patógenos intestinales tal como las cepas *Salmonella*

typhimurium, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* u otras Enterobacteriaceae patogénicas que colonizan mascotas o parásitos tales como helmintos (*Toxocara spp.*), protozoarios (*Cryptosporidium spp*, *Giardia spp.*, *Pentatrichomonas hominis*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, ...) o levaduras" (línea 26 de la página 7 a línea 2 de la página 8 de la descripción de la solicitud).

En este sentido, se puede afirmar que el problema de la presente invención es proporcionar un producto alimenticio que comprenda un microorganismo, que tenga una alta actividad probiótica en mascotas y que sea capaz de sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal de una mascota que lo ingiera. La solución a este problema se soluciona con las cepas bacterianas reclamadas de acuerdo con la nueva reivindicación 1, las cuales eran completamente desconocidas en el estado de la técnica, y con las que se pueden elaborar las composiciones alimenticias probióticas nutricionalmente balanceadas reveladas, las cuales son efectivas en la provisión de un efecto profiláctico cuando se alimenta a una mascota con tal composición como una comida completa.

Antes de analizar la altura inventiva de la presente solicitud frente a la referencia US 5,968,569 (D1), citada por el señor Examinador como el estado de la técnica más cercano, me permito señalar que dicho documento ya había sido considerado por el solicitante dentro de los antecedentes técnicos expuestos en la descripción de la presente invención, al igual que en los antecedentes de la patente Europea correspondiente con la solicitud bajo estudio y concedida bajo el número EP 1 290 136. A pesar de que este antecedente fue mencionado dentro de la descripción de la presente solicitud, el examinador Europeo concedió la patente con las modificaciones que se están realizando con el presente escrito a la solicitud de la referencia, al considerar que no afecta el nivel inventivo de la presente invención.

Ahora bien, en su Concepto Técnico el señor Examinador establece que las reivindicaciones 17 a 25 de la presente invención carecen de nivel inventivo porque, en forma general, "el concepto de incluir probióticos en alimentos y suplementos para mejorar la salud de animales es materia de dominio público" y ya en forma particular, porque el documento citado "divulga una composición probiótica que utiliza cepas de los géneros *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* y *Enterococcus spp.* y una matriz o carrier farmacéuticamente aceptable en diferentes presentaciones", por lo que "de acuerdo al estado de la técnica, siendo el problema y la solución planteada en la solicitud en estudio ampliamente conocidos y teniendo en cuenta que el ajuste de componentes y la elección de formas de presentación son actividades cotidianas para un técnico versado en la materia, el desarrollo de una composición para los objetos reclamados se constituye como evidentemente derivado del estado de la técnica".

En relación con los puntos anteriormente expuestos, me permito inicialmente señalar que como resultado de las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio, la materia objeto de las reivindicaciones 17 a 25 ha sido reemplazada por la composición alimenticia reclamada mediante la nueva reivindicación 8, en la cual se han definido los componentes específicos de la composición reclamada de forma tal que la misma no puede resultar obvia o evidente a partir de las enseñanzas del estado de la técnica.

Más importante aún, me permito resaltar que frente a la materia de las nuevas reivindicaciones 1 a 7 restantes, el documento D1 es completamente silencioso, toda vez que no describe la cepas bacterianas reveladas por el solicitante y mucho menos, los métodos para su aislamiento y para la producción de las composiciones alimenticias que las contengan, por lo que dicha referencia no constituye un elemento relevante capaz de desvirtuar la altura inventiva de la presente solicitud, toda vez que no podría conducir **en forma obvia o evidente** a una persona versada en la materia al desarrollo expuesto en la invención bajo estudio, requisito indispensable para poder afirmar una supuesta falta al artículo 16 de la Decisión 486.

En efecto, el solicitante se permite llamar la atención del señor Examinador al hecho de que, tal como fue expuesto en los antecedentes técnicos consignados en la descripción de la presente solicitud, si bien el documento D1 hace referencia a la inclusión de un microorganismo probiótico en un cereal de alimento para mascotas, esta referencia carece de cualquier información respecto a las cepas propuestas específicamente mediante la invención en discusión, por lo que resultaría imposible para la persona versada en la materia no solo llegar a tales cepas desconocidas, sino además establecer en forma evidente que tienen actividad probiótica, pueden funcionar en el ambiente gastrointestinal adecuado, se pueden incorporar en una composición alimenticia y ejercen un efecto profiláctico benéfico para la salud de los animales domésticos.

Adicionalmente, en relación con la materia reclamada mediante las nuevas reivindicaciones 2 a 7, es completamente claro que la referencia citada no puede afectar el requisito de nivel inventivo de la presente invención, puesto que allí se están protegiendo los métodos de obtención de las novedosas cepas reveladas por primera vez en esta solicitud y para la producción de las composiciones que contienen tales cepas, todos objetos que no podían ser mencionados por un documento como D1, el cual no presenta la especificidad ni la selectividad frente a las cepas bacterianas de ácido láctico tal como sí sucede con la presente invención, razón más que suficiente para poder afirmar que la persona versada en la materia no encontraría ninguna sugerencia para desarrollar los métodos en mención.

Por otra parte, el señor Examinador ha establecido que las composiciones de la invención carecen de nivel inventivo porque "el concepto de incluir probióticos en alimentos y suplementos para mejorar la salud de animales es materia de dominio público".

Sobre este particular, me permito señalar como primera medida que el objeto de la invención no es la inclusión de probióticos *per se* en alimentos como al parecer considera el señor Examinador, ya que de la lectura de las reivindicaciones, es claro que el objeto para el cual se pretende protección, corresponde a las novedosas cepas bacterianas de ácido láctico, los métodos para su obtención y para la producción de composiciones alimenticias que las contengan, así como tales composiciones, es decir, productos y métodos tangibles que simplemente incorporan un concepto ya conocido en el estado de la técnica, pero que no puede restarle altura inventiva a un desarrollo que no solo presenta efectos técnicos benéficos, sino que además corresponde a un resultado completamente sorprendente e inesperado para una persona versada en la materia, quien al desconocer la existencia de las cepas ya mencionadas, carece absolutamente de cualquier sugerencia, clave o pista para poder al menos imaginar tales microorganismos y mucho menos sus características probióticas.

En este sentido, me permito realizar una comparación de carácter meramente ilustrativo con lo que sucede en otro campo de la tecnología, como lo son las composiciones farmacéuticas. En efecto, es ampliamente conocido el concepto de incluir un principio activo novedoso dentro de una composición farmacéutica para que dicho principio sea útil, **y no por ello la composición carece de altura inventiva**, puesto que es el propio principio farmacéutico hasta ese momento desconocido, el que hace que la composición no sea obvia o evidente, puesto que no se puede predicar obviedad en la formulación de un principio activo cuando éste no era conocido en el estado de la técnica.

En gracia de discusión, en el presente caso ocurre algo similar, toda vez que el "principio activo" de la composición alimenticia reivindicada corresponde a las cepas bacterianas de ácido láctico **reveladas por primera vez mediante la presente solicitud**, por lo que su inclusión dentro de una composición con características probióticas no puede resultar evidente para una persona versada en la materia que **desconoce completamente la existencia de tal "principio activo"**.

Ahora bien, en relación con la referencia D1, me permito dirigir la atención del señor Examinador al hecho de que este documento de patente, tal como el mismo señor Examinador reconoce, revela la inclusión de "cepas de los géneros *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* y *Enterococcus spp.*", lo que en otras palabras significa que la falta de especificidad de esta referencia haría imposible pensar que, para la persona versada en la materia que toma como base tal documento, resulta obvio el desarrollo de una

composición que contiene específicamente las cepas particulares de *Lactobacillus reuteri* NCC2581 (CNCM I-2448), *Lactobacillus rhamnosus* NCC2583 (CNCM I-2449), *Lactobacillus reuteri* NCC2592 (CNCM I-2450), *Lactobacillus reuteri* NCC2603 (CNCM I-2451), *Lactobacillus reuteri* NCC2613 (CNCM I-2452) y *Lactobacillus acidophilus* NCC2628 (CNCM I-2453), máxime cuando las mismas ni siquiera han sido enseñadas en el estado de la técnica.

Por todo lo anterior, se ha demostrado en forma contundente que la presente solicitud **sí posee el nivel inventivo requerido** frente a las enseñanzas del documento citado como estado de la técnica más cercano, toda vez que para una persona versada en la materia, que tomara como base la materia descrita en tal referencia, resultaría imposible desarrollar un producto alimenticio de características probióticas como el enseñado por el solicitante, dado que tal como se ha señalado anteriormente, este documento no revela ni sugiere la existencia de las **cepas bacterianas de ácido láctico específicas** reveladas por primera vez mediante la presente solicitud, ni proporciona información técnica que pudiera ser considerada como relevante para permitir una derivación evidente u obvia de la misma, tal como lo exige la legislación Andina para considerar que una solicitud de patente no cumple con el requisito de altura inventiva.

De conformidad con lo anterior, se ha demostrado que la materia objeto de las nuevas reivindicaciones, tal como han sido modificadas y presentadas junto con este memorial, **sí cumple con el requisito de nivel inventivo** requerido y, por tanto, es merecedora del privilegio de patente solicitado.

9. Anexo me permito presentar:

- (i) Recibo número 07-83.536, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de las modificaciones mencionadas;
- (ii) Copia del texto completo de la descripción y del capítulo reivindicatorio ahora modificados, que reemplaza al texto de la solicitud originalmente presentado y actualmente estudiado, en la cual se han realizado las modificaciones anteriormente mencionadas; y
- (iii) Copia informal de la carátula y las reivindicaciones de la patente **EP 1 290 136**, correspondiente a la solicitud Europea concedida equivalente a la presente invención.

NUEVOS PROBIÓTICOS PARA APLICACIONES DE ALIMENTO DE
MASCOTAS

5 La presente invención se refiere a nuevas
bacterias de ácido láctico y de manera más particular
a microorganismos de los géneros *Lactobacillus*,
Bifidobacterium y *Streptococcus* (*Enterococcus*) que se
han aislado y seleccionado por su potencial
10 probiótico. La presente invención también se refiere
a su uso en la preparación de composiciones de
alimento para mascotas, propuestas para mejorar la
salud de las mascotas y a composiciones que contienen
la misma. También se proporcionan métodos para
15 mantener o mejorar la salud de las mascotas a través
de la alimentación a una mascota de estos
microorganismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 El bienestar de los animales domésticos se
relaciona estrechamente a su alimentación. La
alimentación correcta debe dar por resultado una
mascota en forma y saludable. Además de proporcionar
valor nutritivo, la composición alimenticia influye
25 en el equilibrio de la microflora intestinal y puede
conducir o prevenir trastornos gastrointestinales.
Por lo tanto, el conocimiento con respecto a los
procesos de digestión y el tracto gastrointestinal de
los animales saludables es integral al entendimiento
30 de una práctica alimenticia factible. Como
carnívoros, los gatos y perros se caracterizan por

tracto digestivo corto y una rápida velocidad de flujo del bolo alimenticio.

Entre los constituyentes de la microflora gastrointestinal de gatos y perros, se pueden
5 recuperar *Bacteroides* sp., *Clostridium* sp.,
Enterobacteriaceae, *Bifidobacterium* sp.,
Lactobacillus sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus*
sp. y levaduras.

El número y composición de esta flora
10 endógena tiende a ser más bien estable, aunque la
edad y en un menor grado, el alimento pueden
modificarla. La acidez gástrica, bilis, peristalsis
intestinal e inmunidad local son factores que se
consideran importantes en la regulación de la flora
15 bacteriana en el intestino delgado de los seres
humanos y varios otros mamíferos.

Frecuentemente, los trastornos
gastrointestinales de felinos y caninos se enlazan al
sobrecrecimiento bacteriano y la producción de
20 enterotoxinas producidas por bacterias patógenas.

Durante los últimos años, la investigación
se ha enfocado en algunas cepas valiosas de bacterias
de ácido láctico y su uso potencial como agentes
probióticos. Los probióticos se consideran que son
25 preparaciones microbianas viables que promueven la
salud de los mamíferos al conservar la microflora
natural en el intestino. Los probióticos se piensa
que se unen a la mucosa intestinal, colonizan el
tracto intestinal y de este modo impiden la unión de
30 microorganismos peligrosos al mismo. Un prerrequisito
para su acción reside en que tienen que alcanzar la

mucosa del intestino de una forma apropiada y viable y especialmente que no se destruyan por la influencia del bajo pH que prevalece en el estómago. En particular, la fisiología del tracto digestivo de perros y gatos difiere de los humanos. Por ejemplo, el pH promedio en el estómago es de aproximadamente 3.4 para perros y 4.2 para gatos.

Aunque la US 5,968,569 describe la inclusión de un microorganismo probiótico en un cereal de alimento para mascota, ni ésta, ni la técnica anterior restante, disponible proporciona información con respecto a las cepas propuestas específicamente para la salud de las mascotas.

En consecuencia, existe una necesidad por proporcionar nuevas cepas bacterianas que se adapten particularmente para mascotas y que se hayan seleccionado por sus altas propiedades probióticas benéficas para la salud de mascotas e incorporen estas cepas en una composición de alimento para mascotas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un nuevo microorganismo probiótico de bacterias de ácido láctico, seleccionado por su capacidad para sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal de una mascota y para ejercer una actividad probiótica benéfica en la salud de la mascota.

La cepa prebiótica se puede seleccionar de lactobacilos, bifidobacterias o enterococos.

La cepa probiótica se puede seleccionar a partir del grupo que consiste de *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum* y *Bifidobacterium spp.*

En una modalidad preferida, la cepa probiótica se selecciona del grupo que consiste de *Lactobacillus reuteri* (NCC2581; CNCM I-2448), *Lactobacillus reuteri* (NCC2592; CNCM I-2592); CNCM I-2450), *Lactobacillus rhamnosus* (NCC2583; CNCM I-2449), *Lactobacillus reuteri* (NCC2603; CNCM I-2451), *Lactobacillus reuteri* (NCC2613; CNCM I-2452), *Lactobacillus acidophilus* (NCC2628; CNCM I-2453), o *Bifidobacterium adolescentis* (por ejemplo NCC2627), o *Bifidobacterium sp.* NCC2657 o *enterococcus faecium* SP68 (NCIMB 10415).

La nueva cepa bacteriana se puede usar en cualquier cantidad desde aproximadamente $1.0E+04$ a aproximadamente $1.0E+12$ cfu/animal y de manera preferente $1.0E+05$ a aproximadamente $1.0E+11$ cfu/animal y día, de manera más preferente de $1.0E+07$ a $1.0E+10$ cfu/animal y día.

En un aspecto, la invención se refiere al uso de la cepa bacteriana como se describe anteriormente y/o su sobrenadante de cultivo y/o sus metabolitos, para la preparación de una composición propuesta para el tratamiento y/o profilaxis de

trastornos asociados para la colonización del tracto intestinal de mascotas por microorganismos patogénicos. A menos que se indique de otro modo claramente en el contexto, la referencia "cepa" se debe entender que incluye su sobrenadante de cultivo y/o un metabolismo de la misma.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de la cepa bacteriana como se describe anteriormente y/o su sobrenadante de cultivo y/o un metabolito del mismo, para la preparación de una composición propuesta para regular la respuesta inmunitaria de mascotas. Por el término "regular" la respuesta inmunitaria, se quiere decir que las cepas bacterianas descritas anteriormente y/o su sobrenadante de cultivo y/o sus metabolitos tienen la capacidad para estimular ya sea ciertas funciones inmunitarias que son importantes a la salud de la mascota o para modular otras funciones inmunitarias que se podrían implicar potencialmente en los trastornos inmunitarios, tal como inflamación, alergia, etc. La estimulación o modulación de estas funciones inmunitarias se puede lograr al usar diferentes combinaciones de las cepas bacterianas descritas anteriormente y/o su sobrenadante de cultivo y/o sus metabolitos.

La invención proporciona adicionalmente un método para mantener o mejorar la salud del tracto gastrointestinal, la piel y/o el sistema de pelaje o el sistema inmunitario de una mascota que comprende el paso de alimentar una mascota con una composición de alimento para mascotas que contiene al menos una

cepa aislada como se describe anteriormente.

Además, la invención proporciona un método para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos asociados con la colonización del tracto gastrointestinal de mascotas por microorganismos patogénicos, que comprende el paso de alimento para mascotas que contiene al menos una cepa aislada de acuerdo con la presente invención.

La invención también proporciona un método para regular la respuesta inmunitaria en mascotas, que comprende el paso de alimentar una mascota con una composición de alimento para mascotas que contiene al menos una cepa aislada de acuerdo con la presente invención.

La invención también proporciona un método para mejorar o reducir los efectos del envejecimiento en una mascota, que comprende el paso de alimentar una mascota con una composición que contiene al menos una cepa aislada de acuerdo con la presente invención.

Estos microorganismos seleccionados tienen un impacto benéfico particular en mascotas en su tracto gastrointestinal, o en su piel y/o revestimiento, o su sistema inmunitario y en los efectos del envejecimiento.

Tienen un impacto benéfico particular en los patógenos intestinales tal como las cepas *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* u otras Enterobacteriaceae patogénicas que colonizan mascotas o parásitos tal como helmintos (*Toxocara spp.*) protozoarios (*Cryptosporidium spp.*

comprende una composición de alimento para mascotas, nutricionalmente balanceada. Esta composición contiene de manera preferente una cantidad suficiente de la cepa aislada, sobrenadante de cultivo y/o un
5 metabolito de la misma, para ser efectiva en la provisión del efecto profiláctico cuando la composición se alimenta a una mascota como una comida completa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 Dentro de la siguiente descripción, la abreviación cfu ("unidades de formación de colonias") designa el número de células bacterianas como se revela por las cuentas micriobológicas de placas de agar.

15 Además, "NCC" designa Colección de Cultivos Nestlé (Nestlé Research Center, Vers-chez-les-Blanc, Lausana, Suiza).

Con respecto al primer objeto de la presente invención, 20 lactobacilos y 18
20 bifidobacterias aisladas de heces de perros y gatos, se detectaron y seleccionaron con respecto a sus parámetros tecnológicos y fisiológicos.

Un primer examen para las aplicaciones probióticas potenciales se realizó in vitro (ver
25 Ejemplos 1 y 2): las características de crecimiento, tolerancia a la acidez gástrica a diferentes pH y diferentes concentraciones de sales virales presentes en el duodeno probablemente se van a encontrar en gatos y perros.

30 Adicionalmente, la buena supervivencia de las células liofilizadas en dos diferentes medios

crioprotectores se demostró claramente a 4°C y 20°C como se indica por la prueba acelerada de almacenamiento.

Estas cepas se pueden caracterizar por
5 tiempos cortos de generación, altas cuentas (más de 1.0E+08 cfu/ml) durante su fase estacionaria y estabilidad en altos números a 8 y 24 horas post-inoculación, estabilidad a liofilización seguido ya sea por condiciones de almacenamiento, resistencia a
10 concentraciones fisiológicas de bilis encontradas en el duodeno (2% de bilis) y su baja inhibición cuando crecen en la presencia de hasta 4% de bilis. Adicionalmente, los resultados de los análisis de ADN se tomaron en cuenta para seleccionar bacterias
15 representativas de la diversidad investigada.

Las cepas propuestas para la salud de perros y gatos pueden crecer hasta al menos 1.0E+06 cfu/ml en la presencia de hasta 2.0% de sales biliares. Las cepas también pueden crecer hasta al
20 menos 1.0E+06 cfu/ml después de aproximadamente 2 horas a un intervalo de pH de aproximadamente 3.4 a aproximadamente 4.2.

Las cepas bacterianas de acuerdo con la invención se pueden seleccionar a partir del grupo
25 que consiste de *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium*
30 *sp.*

Las siguientes cepas *Lactobacillus reuteri*

NCC2581, *Lactobacillus rhamnosus* NCC2583, *Lactobacillus reuteri* NCC2592, *Lactobacillus reuteri* NCC2603, *Lactobacillus reuteri* NCC2613 y *Lactobacillus acidophilus* NCC2628 se depositaron a manera de ejemplo bajo el tratado de Budapest, en la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos, 25 rue du docteur, Roux, 75724, París, Francia, el 19 de abril del 2000, bajo las siguientes referencias CNCM I-2448, CNCM I-2449, CNCM I-2450, CNCM I-2451, CNCM I-2452 y CNCM I-2453, respectivamente. Todas las restricciones en cuanto a la disponibilidad de estos depósitos se reintegrarán en la primera publicación de esta solicitud u otra solicitud que reivindique el beneficio de prioridad de esta solicitud.

15 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

Lactobacillus reuteri CNCM I-2448

- Microorganismo gram-positivo, no móvil, no espurulento
- 20 - Varillas pequeñas más o menos cortas y gruesas
- Microorganismo microaerófilo con metabolismo heterofermentable, producción de ácido L(+) y D(-) láctico
- Catalasa (-), producción de CO₂ de glucosa, hidrólisis de arginina = producción de NH₃
- 25 - Crecimiento con NaCl al 5% y 10%
- Fermentación de azúcares: L-arabinosa, galactosa, D-glucosa, lactosa, sacarosa, D-rafinosa.

30 *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-2449

- Microorganismo gram-positivo, no móvil, no

contiene al menos una cepa probiótica que contiene los rasgos anteriores, asociada con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

5 Se puede administrar a la mascota como un complemento de su dieta normal o como un componente de un alimento para mascota nutricionalmente completo, al menos una cepa bacteriana que tiene los rasgos anteriores y/o su sobrenadante de cultivo o una fracción de la misma y/o sus metabolitos.

10 La composición de alimento para mascotas, nutricionalmente completa de acuerdo con la invención puede estar en la forma de polvo, seco o en un producto de alimento para mascotas, húmedo, molido o auto-estable. Estos alimentos para mascotas se pueden
15 producir por maneras conocidas en la técnica con la condición que donde se desee la actividad de microorganismo, se tome cuidado para asegurar la supervivencia del microorganismo. Aparte de las cepas bacterianas y/o su medio fermentado, estos alimentos
20 para mascotas pueden incluir cualquiera de una fuente de almidón, una fuente de proteína y una fuente de lípidos.

Las fuentes de almidón adecuadas son por ejemplo, granos y legumbres, tal como maíz, arroz,
25 trigo, cebada, avena, soya y mezclas de éstas.

Las fuentes de proteína adecuada se pueden seleccionar de cualquier fuente de proteína animal o vegetal adecuada; por ejemplo carne y comida, carne de aves de corral, carne de pescado, concentrado de
30 proteína de soya, proteínas lácteas, gluten y similares. Para animales de varios años, se prefiere

que esta fuente de proteína contenga una proteína de alta calidad.

Las fuentes adecuadas de lípidos incluyen comidas, grasas animales y grasas vegetales.

5 La elección de las fuentes de almidón, proteína y lípido se determinarán ampliamente por las necesidades nutricionales del animal, consideraciones de buen sabor y el tipo de producto aplicado. Para mascotas con varios años, el alimento para mascotas
10 contiene de manera preferente, proporcionalmente menos grasa que los alimentos para mascotas jóvenes. Adicionalmente, las fuentes de almidón pueden incluir uno o más de arroz, cebada, trigo y maíz.

 Adicionalmente, también se pueden
15 incorporar conforme se desee en el alimento para mascotas, varios ingredientes diferentes, por ejemplo, azúcar, sal, especies, agentes de sazón, vitaminas, minerales, agentes saborizantes, grasas y similares.

20 Para los alimentos secos para mascotas, un proceso adecuado es la cocción por extrusión, aunque se puede usar el horneado y otros procesos adecuados. Cuando se cuece por extrusión, el alimento seco para mascotas usualmente se proporciona en la forma de un
25 producto molido. Si se usa un carbohidrato prebiótico, el prebiótico se puede mezclar con los otros ingredientes del alimento seco para mascotas antes del procesamiento. En la solicitud de Patente Europea No. 0850569, se describe un proceso adecuado;
30 la descripción de la cual se incorpora por referencia. Si se usa un microorganismo probiótico y

preferentemente menos de 10% en peso. Por ejemplo,
5 el prebiótico puede comprender de aproximadamente
0.1% a aproximadamente 5% en peso del alimento para
mascotas. Para los alimentos para mascotas, que
usan achicoria como el prebiótico, la achicoria se
puede incluir para comprender desde aproximadamente
10 0.5% a aproximadamente 10% en peso de la mezcla
alimenticia, de manera más preferente de
aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en peso.

Los alimentos para mascotas pueden contener
otros agentes activos tal como ácidos grasos de
15 cadena larga. Los ácidos grasos de cadena larga,
adecuados incluyen ácido alfa-linoleico, ácido
gamma-linoleico, ácido linoleico, ácido
eicosapentanoico, y ácido docosahecanoico. Los
aceites de pescado son una fuente adecuada de ácidos
20 eicosapentanoico y ácido docosahecanoico. El aceite
de borraja, aceite de semilla de grosella negra, y
el aceite de primavera vespertina son fuentes
adecuadas de ácido gamma-linoleico. Los aceites de
cártamo, aceites de girasol, aceites de maíz y
25 aceites de soya son fuentes adecuadas de ácido
linoleico.

Si es necesario, los alimentos para mascotas se
complementan con minerales y proteínas de modo que
son nutricionalmente completos.

30 Adicionalmente, si se desea, la cepa bacteriana
se puede encapsular; por ejemplo en una matriz de
azúcar, matriz de grasa o matriz de polisacárido.
También se puede revestir como se describe en EP 862
863.

35 La nueva cepa probiótica se usa de manera

preferente de modo que el alimento para mascotas contiene de manera preferente cerca $1.0E+04$ a aproximadamente $1.0E+10$ células del microorganismo probiótico por gramo del alimento para mascotas; de manera más preferente cerca de $1.0E+06$ a aproximadamente $1.0E+08$ células del microorganismo probiótico por gramo. El alimento para mascotas puede contener aproximadamente 0.005% a aproximadamente 10 % en peso de la mezcla del microorganismo probiótico.

10 Contiene de manera preferente cerca de 0.02% a aproximadamente 6 % en peso y de manera más preferente cerca de 1 % a aproximadamente 6 % en peso.

La cantidad del alimento para mascotas que se va a consumir por la mascota para obtener un efecto benéfico dependerá del tamaño de la mascota, el tipo de mascota y la edad de la mascota. Sin embargo, una cantidad del alimento para mascotas para proporcionar una cantidad diaria de aproximadamente $1.0E+03$ - $1.0E+14$ cfu de al menos una cepa de bacteria de ácido láctico y/o el medio de fermentación equivalente, usualmente serán adecuados. De manera preferente, se administran cerca de $1.0E+09$ a $1.0E+11$ cfu/día para perros y $1.0E+07$ a $1.0E+10$ cfu/día para gatos.

25

La composición de acuerdo con la invención tiene una alta actividad probiótica y/o se encuentra que es particularmente efectiva para mejorar y/o mantener la función digestiva saludable en mascotas, y mejorar y mantener el tracto gastrointestinal, piel y/o pelaje, y/o sistema inmunitario, salud de las

30

195
mascotas. Esta composición tiene un impacto benéfico en los efectos del envejecimiento en gatos y perros.

La presente invención no se limita en el alcance por las modalidades específicas descritas en la presente. Los ejemplos se persiguen por una breve descripción de las Figuras.

FIGURAS

Figura 1: Proliferación de linfocitos de células mononucleares de la sangre periférica, canina (PMBC) en la estimulación con mitógenos o ésteres de forbol. Las PMBC de perros alimentados durante 4 semanas con (barras negras) o sin (barras blancas) *L. acidophilus* NCC2628 se estimularon con diferentes mitógenos a dosis (μ /ml) indicadas en la gráfica. Los mitógenos con PHA (Fitohemaglutina), conA (concanavalina A), PWM (mitógeno de hierba) y éster de forbol son PMA/iono (miristato-acetato de forbol e ionomomicina). $*=P<0.05$, prueba t de Student.

Figura 2: Citocinas producidas por leucocitos caninos estimulados con diferentes cepas de probióticos. Los leucocitos de perros adultos normales se estimularon con diferentes cepas de lactobacilos aisladas de mascotas durante 18 horas. Los cultivos de control contuvieron medio solo (control negativo) o un aislado de lactobacilo humano ST11 (control positivo). La identificación de las citocinas se hizo por TR-PCR. Su cuantificación se realizó al explorar los agarogeles teñidos con bromuro de etidio y determinar el píxel relativo de cada banda usando el programa NIH Image. Los resultados se expresan como las medias de dos

API-50CH y Rapid-ID32A (BioMérieux) para lactobacilos y bifidobacterias, respectivamente. Se congelaron y se depositaron cepas puras a -80°C en la colección de cultivos Nestec (NCC).

5 Todas las bacterias se cultivaron en un medio de caldo para los ensayos. Una muestra de cada cepa reactivada se almacenó a -80°C en 1 ml de crioprotector (40% de glicerol + 60% de LL). Los cultivos se mantuvieron al subcultivar en una base
10 semanal un inóculo al 1% en 10 ml de medio de cultivo e incubación anaeróbica a 37°C. Se cultivaron los lactobacilos en MRS durante 18 horas. Las bifidobacterias se cultivaron ya sea en MRS + 0.05 % (p/v) clorhidrato de L-cisteína (MRS-C) durante 32
15 horas o en BHI + 0.05% de clorhidrato de L-cisteína (BHI-C) durante 48 horas iniciando con un inóculo al 5%.

 Todos los cultivos se almacenaron a +4°C entre las diferentes transferencias. En general se
20 obtuvo la anaerobiosis usando un sistema anaeróbico de hidrógeno-dióxido de carbono (GasPak, Becton Dickinson, USA). Las bifidobacterias se mantuvieron siempre en estas jarras durante su periodo de almacenamiento.

25 Ejemplo 2: Selección de cepas bacterianas

 Este examen *in vitro* se basó en las características de producción para una aplicación industrial de células viables, su capacidad para sobrevivir la inhibición o condiciones
30 gastrointestinales perjudiciales y su diversidad genómica. La diversidad de la cepa o similitud

genómica de estas cepas no caracterizadas se tomó en cuenta, usando RAPD y ribotipificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Crecimiento Bacteriano

5 Las cepas que son capaces de producir rápidamente un alto número de células tienen que ser identificadas. Su ciclo de crecimiento bacteriano se puede caracterizar por una fase de retraso corto, un tiempo de regeneración corto, altas cuentas máximas y una fase estacionaria larga. Por lo tanto, se compararon cepas al considerar tres variables: la duración de su fase de retraso, su tiempo de generación (en horas) y sus cuentas máximas, que correspondieron a las características más importantes.

Para lactobacilos:

Se inocularon 200 ml de caldo MRS preincubado a 37°C con 1% de su cultivo fresco. Se recolectaron muestras de un ml a cada hora después de la inoculación durante ocho horas. Se tomó una muestra final después de 24 horas. Un ml de cada muestra se diluyó en serie 10 veces en TS para enumeración. Se cultivaron los cultivos en agar MRS (técnica de puesta en placa por derrame), anaeróbicamente, 37°C, durante 48 horas. Todas las placas con los números de colonia entre 30 y 350 se registraron como unidades formadoras de colonia (cfu) por ml de cultivo y por lo tanto se tomaron en consideración para enumeraciones.

Para bifidobacterias en (MRS-C):

En ensayos preliminares, todas las cepas se

Para lactobacterias				
Substrato	Composición		PH	Referencias
MRS	MRS sin azúcar (Difco)	35 g.l ⁻¹	6.5	De Man adn al. (1960)
	Glucosa	20 g.l ⁻¹		
	Agua destilada	1,000ml		

Para bifidobacterias				
Sustrato	Composición		PH	Referencias
MRS-C	MRS sin azúcar (Difco)	35 g.l ⁻¹	6.0	Pacher and Kneifel (1996)
	Glucosa	20 g.l ⁻¹		
	L-cisteína-HCl (Fluka)	0.5g.l ⁻¹		
	Agua destilada	1,000ml		
TPYG (Extracto de tripticasa- peptona- levadura)	Trypticasa (BBL)	50 g.l ⁻¹	7.0	
	Peptona (Difco)	5 g.l ⁻¹		
	Extracto de levadura	20 g.l ⁻¹		
	(Difco)	4 g.l ⁻¹		
	Glucosa (Merck)	1 g.l ⁻¹		
	L-cisteína-HCl (Fluka)	1 g.l ⁻¹		
	Agua destilada	1,000ml		

Se obtuvieron medios sólidos por la adición de agar Difco Bacto (15 g.l⁻¹). Los medios se sometieron a autoclave a 121°C durante 15 minutos. Los medios líquidos para las bifidobacterias ya sea se almacenaron bajo condiciones anaeróbicas o se desgasificaron antes de la utilización.

Resistencia a pH gástrico y bilis

Cuando se ingirieron, los microorganismos han sobrevivido al estómago y las condiciones del duodeno para ser capaces de ejercer una actividad

reconstituida de mascota se determinó.

Se consideraron dos cuentas viables significativamente diferentes cuando la desviación de su $\log_{10}$ estaba por arriba de 0.25. Cada cepa se caracterizó por dos variables:

- la concentración máxima de sal biliar probada donde no se encontró diferencia significativa con el control.
- la velocidad de la disminución en la viabilidad cuando se incrementa la concentración biliar en el medio de crecimiento.

Las cepas caracterizadas por una pérdida superior a un $\log_{10}$ de sus cuentas viables cuando la concentración biliar aumenta en pasos de 1% se considero sensible a la bilis. Una reducción superior a un $\log_{10}$ entre células cultivadas en la presencia de 0 y 2% de bilis, y un $\log_{10}$ por ciento adicional de bilis (por arriba de 2%) se consideró aceptable. Adicionalmente, se deben detectar solo cepas que produzcan más de $1.0E+06$ cfu/ml cuando se cultivan en la presencia de hasta 2% de sales biliares, a fin de producir un efecto en el tracto gastrointestinal.

La bilis reconstituida en mascota a partir de gatos o perros se preparó como se indica en la Tabla 4, y se esterilizó por filtración antes del uso. En un primer ensayo, se cultivaron lactobacilos anaeróbicamente durante 24 horas en calco MRS a 37°C y se transfirieron en el caldo MRS fresco más bilis de mascota, reconstituida, estéril, al 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2, 4% durante 18 horas adicionales. Las muestras se diluyeron en serie 10 veces en TS para

enumeración. Las diluciones $1.0E-03$ y $1.0E-05$ se colocaron en placas de agar MRS, usando un WASP («Whitley Automatic Spiral Plater»; Don Whitley Scientific Limited, Inglaterra). Cuando se secaron, las placas se invirtieron e incubaron 48 horas a 37°C en jarras anaeróbicas. Floch y al. (1972) definieron una inhibición como significativa cuando al menos 2 logs en la prueba comparada con el tubo de control cultivado se redujeron. En base a esto, todos los lactobacilos sensibles a las concentraciones biliares en el primer ensayo y los dos lactobacilos resistentes a la bilis al 4% se probaron similarmente en la presencia de bilis al 0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4%. La segunda prueba se enfocó a una capacidad de repetición y se estabilizó si el número de bacterias viables disminuyó dramáticamente con el incremento de la concentración biliar.

Por otra parte, se señala que estas cepas son resistentes a la bilis durante este periodo de 18 horas. Se establecieron curvas de crecimiento en la presencia de sales biliares para determinar si la fase de retraso y la velocidad de crecimiento se afectaron o no. Los ensayos se emprendieron con lactobacilos cultivados en caldo MRS complementario con bilis reconstituida de mascota, al 1%, de acuerdo al protocolo descrito para la medición de crecimiento anterior.

Las bifidobacterias se subcultivaron y crecieron 32 horas/ 37°C /anaeróbicamente, usando caldo MRS-C con bilis reconstituida de mascota al 0, 1, 2, 3 y 4%. Se aplicó el mismo método de numeración a

- (método de colocación en placa por derrame) y se distribuyeron en frascos (0.5 ml por ampolleta).
- 5 Las muestras se congelaron a -196°C en nitrógeno líquido y se secaron al vacío durante 18 horas. Después de la liofilización, se introdujo nitrógeno a través de la válvula de admisión de aire del liofilizador y se sellaron todas las ampolletas.
- 10 Todos los frascos se almacenaron a $+4^{\circ}\text{C}$ y $+20^{\circ}\text{C}$ durante seis meses. El número de células viables por ampolleta (para cada medio de bacterias y suspensión) se determinó mensualmente.

15 RESULTADOS

- En la estructura de la selección de probióticos potenciales para gatos y perros, los resultados de este examen *in vitro* para 20 lactobacilos y 18 bifidobacterias, en base a sus potenciales de
- 20 crecimiento, resistencia a la liofilización con almacenamiento subsecuente, resistencia al pH gástrico y concentraciones biliares encontradas en el tracto gastrointestinal de gatos y perros se presentan en la Tabla 5.

- 25 Los 20 lactobacilos se clasificaron con respecto a los criterios que se pueden cumplir en el estudio corriente. Cuatro cepas mostraron tener buenos resultados con respecto a sus características de crecimiento, resistencia al pH gástrico,
- 30 resistencia a bilis y su supervivencia durante el almacenamiento después de la liofilización: *L. reuteri* NCC2581 (CNCM I-2448), *L. reuteri* NCC2592 (CNCM I-2450), *L. reuteri* NCC2603 (CNCM I-2451), y *L. reuteri* NCC2613 (CNCM I-2452). Se cumplieron las

NCC2581 y NCC2592 tienen patrones muy cercanos, así como NCC2603 y NCC2613, indicando de esta manera una probable relación cercana. La cepa NCC2581 tiene muy buenas características de su crecimiento y NCC2603
5 tiene una mejor resistencia a la bilis que la NCC2613.

Los resultados con respecto a las ocho bifidobacterias aisladas de las heces de gato permitida una selección en función de sus
10 características de crecimiento, su resistencia al pH gástrico y su sensibilidad a la bilis. La cepa NCC2623 no tiene ninguna de las características deseadas y por lo tanto no se recomendará para estudios adicionales. Por otra parte, la cepa NCC2627
15 cumplió con todos los criterios:

- su tiempo de generación fue menor que una hora cuando creció en MRS-C
- la fase de retraso fue tan corta como para los lactobacilos
- 20 • las cuentas fueron altas y estables durante la fase estacionaria del ciclo de crecimiento
- la cepa fue resistente a una concentración extrema de bilis que se va a encontrar probablemente en el tracto gastrointestinal de gatos
25 y perros (2%)
- no hay inhibición significativa en la presencia de hasta 4% de bilis en el medio
- la cepa mostró tolerar el pH 2.6 durante al menos 10 minutos y puede permanecer a niveles
30 mayores de $1.0 \cdot 1.0E+06$ CFU/ml
- las cepas fueron resistentes a un pH

gástrico promedio durante al menos dos horas.

La cepa NCC2627 fue mucho más resistente que la NCC2623 y NCC2635, mientras que estas tres cepas tuvieron un patrón cercano por ribotipificación, indicando por lo tanto una probable relación cercana (digestión con dos enzimas de restricción: *EcoRI* y *EcoRV*).

Las diez bifidobacterias aisladas de perros mostraron solo dos diferentes patrones cuando se caracterizaron por ribotipificación. Por lo tanto, los ensayos de resistencia a bilis se llevaron a cabo solo con cuatro cepas (dos de cada grupo): NCC2657, NCC2660, NCC2671 y NCC2677. Estas cuatro cepas fueron todas resistentes a la concentración máxima de la bilis que se puede encontrar *in vivo* (2% de bilis) y las cepas NCC2660 y NCC2657 no tuvieron disminución en las cuentas viables cuando se sometieron a un valor máximo de 4% de bilis. Como consecuencia, todas las bifidobacterias aisladas de las heces de perros son más bien resistentes a altas concentraciones de bilis.

Considerando las características de crecimiento, estas diez bacterias de este modo se pueden dividir en dos grupos:

- cepas resistentes a bilis y con buenas características de crecimiento: NCC2657, NCC2651, NCC2663 y NCC2667

- cepas resistentes a bilis pero con características de crecimiento no adecuadas potencialmente para producción industrial: NCC2660, NCC2671, NCC2677, NCC2647, NCC2654 y NCC2674.

TABLA 6

Medios de dilución

Sustrato	Composición		PH
Amortiguador de fosfato	K2PO4	72 g.l ⁻¹	7.0
	KH2PO4	48 g.l ⁻¹	
	Agua destilada	1,000 ml	
Solución Ringer	NaCl	9 g.l ⁻¹	7.0
	Agua destilada	1,000 ml	
TS (Tryptona-solución salina)	NaCl	8.5 g.l ⁻¹	7.0
	Tryptona	1 g.l ⁻¹	
	Agua destilada	1,000 ml	

5 Se distribuyeron porciones de 9 ml en tubos y se sometieron autoclave a 121°C durante 15 minutos.

 Finalmente, se seleccionaron 8 de las 38 cepas para estudios adicionales (ver Ejemplo 3): tres lactobacilos aislados de gatos (NCC2581, NCC2592, 10 NCC2583, NCC2583), tres lactobacilos de perros (NCC2603, NCC2613, NCC2628), una bifidobacteria de gatos (NCC2627) y una bifidobacteria de perros (NCC2657).

 Estas cepas se caracterizan por tiempos de 15 generación cortos, altas cuentas (más de 1.0E+08 cfu/ml) durante su fase estacionaria y capacidad en altos números a 8 y 24 horas después de la inoculación, estabilizada a liofilización seguido por ya sea condiciones de almacenamiento, resistencia a 20 concentraciones extremas de bilis encontradas en el duodeno (2% de bilis) y su baja inhibición cuando crecen en presencia de hasta 4% de bilis.

Adicionalmente, los resultados de los análisis de ADN se tomaron en cuenta para seleccionar las bacterias representativas de la diversidad investigada.

Ejemplo 3: Eficacia de colonización en gatos

5 Se probaron *L. reuteri* NCC2581, *L. reuteri* NCC2592, *L. rhamnosus* NCC2583 y *bifidobacterium* sp. NCC2627 en ensayos de alimentación para evaluar su capacidad para sobrevivir el paso del tracto gastrointestinal de gatos.

10 Se sometieron 16 gatos machos y hembras tan iguales como sea posible a 3 días de adaptación con un menú Friskies Grand. El protocolo de alimentación consistió en 7 días con "Menu Friskies Grand" y 7 días de prueba con "Menu Friskies Grand" que contiene
15 una de las cepas mencionadas anteriormente: *L. reuteri* (NCC2581) (dieta A), *L. reuteri* (NCC2592) (dieta B), *L. rhamnosus* (NCC2583) (dieta C) y *Bifidobacterium* sp. (NCC2627) (dieta D). La asignación de dieta fue la siguiente:

20

Gato No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Periodo 1	A	D	C	B	D	A	A	C	B	A	B	C	B	D	C	D
Periodo 2	B	A	D	A	C	C	D	A	C	B	C	D	D	A	B	B

Estas cepas se prepararon en una cantidad suficiente y en una forma liofilizada, estable para aplicar estas ocho diferentes bacterias con respecto
25 a la supervivencia de la cepa en el tracto gastrointestinal de los animales probados. Todas las cepas se examinaron con 4 g de Trehalosa a fin de adicionar un volumen suficiente de portador para

	NCC 2581		NCC 2592		NCC 2583		NCC 2627	
	Antes	Durante	Antes	Durante	Antes	Durante	Antes	Durante
Lactobacilos	6.38	7.63	6.12	7.62	5.31	7.47	6.69	7.65
	±2.25	±1.23	±2.45	±1.58	±2.04	±1.23	±1.44	±1.45
Bifidobacterias	7.17	7.64	7.57	6.31	6.43	6.80	8.04	6.07
	±1.82	±0.42	±1.68	±2.26	±2.25	±2.19	±1.03	±2.32
Enterobacteriaceae	4.25	4.27	4.37	4.58	5.09	4.40	4.59	3.64
	±1.71	±1.20	±1.35	±1.45	±1.50	±0.63	±1.42	±0.64
Bacteroides	6.05	5.54	5.94	6.15	6.19	5.52	6.00	5.48
	±1.38	±0.49	±0.99	±0.99	±0.97	±0.46	±1.11	±0.50
C.perfrin	4.09	3.84	3.61	3.30	4.16	3.34	3.84	3.57
	±1.22	±1.00	±0.57	±0.57	±1.64	±0.11	±0.89	±0.56

5 Durante el tratamiento se observó un incremento de las cuentas fecales de lactobacilos, debido a las ingestiones de las bacterias probióticas citadas. No se observó incrementó drástico en la cuenta de enterobacteriaceae que reflejan que no hay daño en el ecosistema intestinal relacionado al uso de los probióticos relacionados.

Ejemplo 4: Eficacia de colonización en perros

10 Se probaron *L. reuteri* NCC2603, *L. reuteri* NCC2613, *L. acidophilus* NCC2628 y *bifidobacterium* sp. NCC2657 en pruebas de alimentación para evaluar su capacidad para sobrevivir el paso del tracto gastrointestinal de perros.

15 Se sometieron 10 perros, 5 hembras y 5 machos de 4 a 7 años de edad, a esta prueba específica. El protocolo de alimentación consistió en 5 días de adaptación con "Friskies Vitality" con/sin achicoria y 5 días de prueba con "Friskies Vitality"

219

con/sin achicoria y 3 días de adaptación, 5 días de prueba con "Friskies Vitality" con/sin achicoria + bacteria: *L. reuteri* NCC2603 (dieta E), *L. reuteri* NCC21613 (dieta F), *L. acidophilus* NCC2628 (dieta G) y *bifidobacterium* sp. NCC2657 (dieta H). La asignación de dieta fue como sigue:

Perro No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Periodo 1	E	E	E	E	E	F	F	F	F	F
Periodo 2	G	G	G	G	G	H	H	H	H	H

Estas cepas se prepararon en una cantidad suficiente y en una forma liofilizada, estable para aplicar estas ocho diferentes bacterias con respecto a la supervivencia de la cepa en el tracto gastrointestinal de los animales probados. Todas las cepas se mezclaron con 4 g de trihalosa a fin de adicionar un volumen suficiente de portador para mezclar las cepas preparadas con la matriz de alimentación para los animales. Las cepas bacterianas se prepararon en tubos plásticos individuales (5.0E+09 cfu/día) y se adicionaron diariamente en una parte del alimento para asegurarse que se ingieren las bacterias totales.

Se obtuvieron muestras fecales frescas para analizar los números de población bacteriana y se compararon con la línea base (sin bacterias adicionadas).

Se recolectaron heces el día 7 y 8 (línea base),

14 y 15

21 y 22 (línea base)

28 y 29

Se usa una sonda rectal estéril para obtener una muestra fecal de al menos 0.1 g. Esta muestra se pesa exactamente y se mezclan 0.1 g con 10 ml de solución fisiológica (ringer) que contiene 10% de glicerol. Esta solución luego se transfiere en tubos de 1 ml y se congelan en nitrógeno líquido. Todas las muestras se almacenan entonces a -80°C hasta el análisis. Las bacterias se cuentan en el mismo medio que se describe en el Ejemplo 3.

Resultados: Las cuentas bacterianas, expresadas en logaritmo base 10, se presentan en la Tabla 8.

TABLA 8

Cuentas de bacterias fecales en perros (media $\pm$ división estándar, n=5).

	NCC 2603		NCC 2613		NCC 2628		NCC 2657	
	Antes	Durante	Antes	Durante	Antes	Durante	Antes	Durante
Lactobacilos	5.25 ± 1.34	3.92 ± 1.05	4.00 ± 1.56	3.40 ± 0.21	7.93 ± 1.75	8.30 ± 0.99	6.47 ± 1.27	7.00 ± 1.35
Bifidobac.	7.32 ± 2.06	4.48 ± 2.64	6.09 ± 2.10	4.55 ± 2.79	7.70 ± 2.57	7.20 ± 1.88	5.72 ± 2.51	6.78 ± 2.39
Enterobac.	4.10 ± 0.89	4.62 ± 0.61	3.62 ± 0.72	4.39 ± 0.94	4.58 ± 1.54	4.04 ± 0.76	4.51 ± 1.51	4.85 ± 1.45
Bacteroides	7.82 ± 0.53	6.70 ± 1.25	6.92 ± 1.37	6.69 ± 1.19	7.88 ± 1.13	7.53 ± 0.61	7.92 ± 0.63	7.66 ± 0.86
C.perfrin	3.70 ± 0.89	3.84 ± 0.87	3.50 ± 0.45	3.30 $\pm 0.$	3.70 ± 0.62	3.30 ± 0	3.93 ± 1.25	3.70 ± 0.89

Durante el tratamiento no se observó cambio principal en las cuentas fecales de los lactobacilos, debido a las ingestiones de las bacterias probióticas seleccionadas excepto en el caso de la cepa *L. acidophilus* NCC2628. Bajo las condiciones de prueba, el efecto inhibidor en *C. perfringens* puesto que el nivel basal de *C. perfringens* fue muy bajo. No se observó incremento drástico en la cuenta de enterobacteriaceae que reflejan que no hay disturbio del ecosistema intestinal relacionado al uso de los probióticos seleccionados.

Ejemplo 5: Efecto de lactobacilos y sus metabolitos en la viabilidad de *Giardia intestinalis*

Se estudia el efecto de los sobrenadantes de filtrados de cultivo de cepas de lactobacilos aisladas de gatos y perros.

Materiales y métodos

Cepas y cultivos bacterianos: Los microorganismos que corresponden al género *Lactobacillus* fueron de la colección de cultivo Nestlé. Las bacterias se cultivaron en el medio MTYI. Los sobrenadantes que contienen metabolitos de lactobacilos se neutralizaron a pH6 y se esterilizaron por filtración.

Se realizaron controles al acidificar el medio MTY1 con ácido láctico al mismo pH que uno de los cultivos bacterianos. Posteriormente, el pH se ajustó a pH 6 con NaOH 0.1 N. El origen de la cepa bajo estudio y el pH de los sobrenadantes y controles se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9

Cepa	Origen	pH de sobrenadante	pH control
<i>L. reuteri</i> NCC2581	Gato	6.63	6.63
<i>L. rhamnosus</i> NCC2583	Gato	6.50	5.97
<i>L. reuteri</i> NCC2592	Gato	6.04	5.98
<i>L. reuteri</i> NCC2603	Perro	6.04	5.99
<i>L. reuteri</i> NCC2613	Perro	6.07	5.95
<i>L. acidophilus</i> NCC2628	Perro	6.01	5.93

Parásitos: La cepa WB de *Giardia intestinalis* (ATCC 30957) se compró a la colección americana de Cultivo de Especies (Rockville, E.U.A.). Se cultivaron trofozoitos en el medio TYI-S-33 modificado de Keister's que contiene por litro: extracto de caseína (Difco), 20g; extracto de levadura (BBL), 10g; dextrosa (Merck), 10g; bilis bovina (Difco), 0.75g; NaCl (Merck), 2g; L-cisteína.HCl (Sigma), 2g; Sal sódica de ácido ascórbico (Fluka), 0.2g; K₂HPO₄ (Merck), 0.6g; citrato de amonio férrico (Sigma), 22.8 mg; suero de bovino adulto (Sigma), 100 ml; penicilina/estreptomicina (Gibco, 1000 IU/ml), 15 ml. Se ajustó el pH a 6.9 con NaOH 5N antes de la esterilización con filtración (tamaño de poro de 0.22 µm).

Se cultivaron parásitos en matraces de cultivo de tejido de poliestireno (LUX, Miles Laboratorios, Inc., Naperville IL 60540) rellenos con 40 ml de medio de cultivo. Se realizaron los subcultivos al descargar el sobrenadante sin

225

concentración, morfina, pancreatina). El jugo del intestino delgado canino, simulado contuvo bilis canina reconstituida (0.345 g/l tauroquenodesoxicolato, Sigma, Alemania; 0.7 g/l de taurodesoxicolato, Sigma, Alemania, 3.04 g/l de taurocolato, Sigma, Alemania; 0.006 g/l de colato, Fluka, Suiza), morfina porcina (1.9 g/l Sigma, Alemania), pancreatina porcina (2.42 g/l Sigma, Alemania) y solución de electrolitos (5 g/l de NaCl, 0.6 g/l de KCl, 0.25 g/l de CaCl₂, todo de Merck, Alemania). El pH del jugo se ajustó a pH 6.5 ± 0.5 con NaOH 0.1 N.

Cepas y condiciones de cultivo

Patógenos del intestino delgado

Se seleccionaron cuatro cepas potencialmente patógenas: *S. Typhimurium* SL1344, *E. coli* ETEC 08:H9 y *E. coli* 0149:K88 (aislado patógeno canino) y un aislado clínico de *Sh. dysenteriae* (origen humano, amablemente proporcionado por el Centre Hospitalier Universitaire, Vaudoise-CUV Lausana, Suiza). Con la excepción de *S. typhimurium* SL1344 propagado en caldo Luria Bertani (Difco, E.U.A.), todo el enterobacteriaceae se cultivó en caldo de infusión de cerebro-corazón (Difco, E.U.A.) a 37°C bajo agitación (240 rpm).

Bacteria de ácido láctico

Se seleccionaron un amplio intervalo de lactobacilos de origen canino y felino que incluyen: *L. acidophilus* NCC2628 (CNCM I-2453), *L. rahmnosus* NCC2583 (CNCM I-2449), *L. reuteri* NCC2581 (CNCM I-2448), *L. reuteri* NCC2592 (CNCM I-2450) de la

colección de cultivos Nestlé (NCC, Nestlé, Suiza) y se examinaron en el modelo de intestino delgado canino para la supervivencia, actividad fisiológica y efectos inhibitorios en los patógenos del intestino delgado, mencionados con anterioridad. Los lactobacilos se cultivaron anaeróbicamente (anaerocult Oxoid, Inglaterra) en el caldo Man Rogosa Sharp (Difco, E.U.A.), a 37°C. Determinación de cuentas de células viables.

Se diluyeron muestras en amortiguador de fosfato estéril (NaH_2PO_4 , pH 7, 0.2M) y se colocaron en placa superficial de diluciones de 10 veces en placas de agar: agar MRS (Difco, E.U.A.) para lactobacilos, agar Salmonella-higella (Oxoid, Inglaterra) para *S. typhimurium* y *Sh. dysenteriae*, y agar Sorbitol-Mac-Conkey (Oxoid, Inglaterra) para *E. coli*. Se incubaron placas de agar 48 horas a 37°C de manera anaeróbica para lactobacilos, y 24 horas a 37°C para enterobacteriaceae. Para pruebas de co-cultivo, se inhibió el crecimiento de enterobacteriaceae en agar MRS por la adición de polimixina (Oxoid, Inglaterra).

Experimentos de co-cultivos entre bacterias de ácido láctico (LAB) y patógenos

Se realizaron experimentos de co-cultivo con LAB probióticas, potenciales y cepas patógenas a 37°C en 20 ml (tubos Falcon) de jugo simulado del intestino delgado, canino con diferentes fuentes de carbón (azúcar, alimento para mascota) para favorecer la actividad metabólica de los cultivos. Las LAB se inocularon a $10\text{E}+08$ cfu/ml, patógenos a $10\text{E}+02$

TABLA 13
Co-cultivo de *L. acidophilus* NCC2628 (CNCM I-2453) y
diferentes niveles de inoculación de *S. typhimurium*
SL1344

5

Patógeno	Nivel de inoculación	<i>S. typhimurium</i>
PROBIOTICO	del patógeno	SL1344
<i>L. acidophilus</i> NCC2628 (CNCM I-2453)	10E+02 cfu/ml	+++
	10E+04 cfu/ml	+++
	10E+06 cfu/ml	+++

- + Inhibición de crecimiento
- ++ Inhibición de crecimiento e inactivación parcial
- +++ Inhibición de crecimiento e inactivación completa

10 La actividad antimicrobiana de *L. acidophilus* NCC2628 (CNCM I-2453) fue suficientemente alta para inactivar completamente aún concentraciones iniciales altas de *S. typhimurium* SL1344.

Ejemplo 9: Estimulación inmunitaria in vivo en perros

15 El potencial de estimulación inmunitaria para cepas aisladas de mascotas de los probióticos se probó en una prueba clínica usando la cepa *L. acidophilus* NCC2628.

Métodos:

20 Proliferación de células mononucleares de la sangre periférica canina (PBMC) en la estimulación con diferentes mitógenos.

25 20 perros de 4 a 7 años de edad se sometieron a esta prueba. El protocolo de alimentación consistió en una semana de adaptación con "Friskies Vitality" con/sin achicoria y 4 semanas

de prueba con "Friskies Vitality" con/sin achicoria + bacterias de *L. acidophilus* de NCC2628.

Se preparó *L. acidophilus* NCC2628 en una cantidad suficiente y en una forma liofilizada, estable con respecto a la supervivencia de la cepa en el tracto gastrointestinal de los animales probado. Las bacterias se mezclaron con 4 g de trehalosa a fin de adicionar un volumen suficiente de portador para mezclar las bacterias preparadas con una matriz de alimento para los animales. Se prepararon bacterias en tubos de plástico individuales ($5.0E+09$ cfu/día) y se adicionaron diariamente en una parte del alimento para asegurarse que las bacterias totales se comerán.

Se recolectó sangre de los perros después de cuatro semanas de administración de los probióticos. La sangre se fraccionó a través de una vacuna Vacutainer® (Becton Dickinson, Mountain View, CA), se recuperaron las PBMC de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Se estimularon células con diferentes mitógenos o ésteres de formol que inducen una fuerte proliferación de células T (conavalina A (conA), fitohemaglutinina (PHA)), de células B (mitógeno de hierba (PWM)), y de todas las células (forbol-miristato-acetato/ionomicina (PMA/Iono)). Se incubaron 10^5 células por cavidad con mitógenos o los ésteres de forbol (las dosis respectivas se indican en la Figura 1) en un volumen final de 200 μ l de medio de cultivo RPMI-1640 complementado con suero de becerro vegetal al 10% y antibióticos en placas de cultivo de fondo plano de 96 cavidades (Nunc).

Se administraron células en atmósfera de CO₂ al 5% humidificada a 37°C durante 48 horas. Las células se marcaron por impulsos con 1 µCi de [³H]timidina (Amercham Pharmacia Biotech, Suiza) durante 18 horas adicionales. Las células luego se recolectaron en filtros de nitrocelulosa (Packard TopCount; Suiza) y la [³H] unida se midió con conteo con escintilación (TopCount, Packard, Suiza). Se calculó la proliferación celular como la media (cuentas por minuto (c.p.m.)) (±SD) de los triplicados.

10 Resultados:

Figura 1: Hubo un incremento claro en la proliferación celular en respuesta a todos los mitógenos en el grupo de los perros alimentados con *L. acidophilus* NCC2628 en comparación con el grupo de control. Este incremento fue significativo en cultivos estimulados con los ésteres de forbol PMA + iomicina. Estos datos muestran que las células linfoides de los perros alimentados con probióticos son más reactivas en la activación *in vitro* y sugiere que el sistema inmunitario de los perros alimentados con probióticos se ha estimulado.

20 Ejemplo 10: Modulación *in vitro* de funciones inmunitarias por cepas de lactobacilus aisladas de mascotas.

Un examen *in vitro* de las diferentes cepas de lactobacilus aisladas de mascotas, descritas anteriormente, se ajustó para determinar su potencial de modulación inmunitaria. Para este fin, se midió su capacidad para inducir las citocinas pro-

inflamatorias (IL-12, IFN γ) y/o citocinas anti-inflamatorias (IL-10, TGF- β) (Anand A.C., Adya C.M. 1999, *Trop. gastroenterol.*; 20(3):97-106; Spelberg B., Edwards J.E. Jr. 2001, *Clin. Infect. Dis.*; 32(1):76-102). Esto
5 tiende a la selección de cepas candidatas potenciales para funciones inmunitarias anti-patogénicas o anti-cáncer, fuertes así como funciones antagonísticas contra patologías intestinales caninas tal como alergia e inflamación (enfermedades inflamatorias en el intestino).
10 Se establecieron cultivos adicionales con el medio solo (Control negativo), con la cepa SF68 de *Enterococcus faecium* (NCIMB 10415, Cerbios-Pharma, Suiza) y con un aislado de lactobacilo humano ST11 (NCC2461, CNCM I-2116) (control positivo).

15 Método:

Perfiles de citosina inducidos por diferentes cepas probióticas en leucocitos caninos:

La sangre de perros adultos normales se trató 5 minutos a temperatura ambiente con amortiguador de lisis
20 ACK (150 mM de NH $_4$ Cl, 1 mM de KHCO $_3$ y 0.1 mM de Na $_2$ EDTA en H $_2$ O, pH = 7.4). Los leucocitos se lavaron dos veces con el medio RPMI (sin antibióticos y se sembraron a 2.10 ^{6} células/ml en placas de cultivo de tejido de 24 cavidades. Se adicionó 1 ml de una suspensión bacteriana
25 (descrita posteriormente) que contiene 10 ^{6} CFU a cada cavidad.

Para el tratamiento de control, se adicionó al medio solo a los leucocitos. Las muestras se incubaron 18 horas a 37°C y CO $_2$ al 5%.
30 Subsecuentemente, se recolectaron los leucocitos, se

Citocinas	Referencias
IL-12p40	Büttner, M., et al, 1998. Cytokine; 10(4):241-248
IFN γ	Büttner, M., et al, 1998. Cytokine; 10(4):241-248
TGF β 1	Gröne A., et al., 1998. Vet. Immunol. Immunopathol.; 65:11-27
IL-10	Pinelli E., et al., 1999. Vet. Immunol. Immunopathol.; 69:121-126

Resultados:

Figura 2: Los datos muestran que los perfiles de citosina inducidos por lactobacilos son dependientes de la cepa. Por ejemplo, la cepa NCC2628 indujo altos niveles de IL-10 y TGF- β , resaltando el potencial para esta cepa particular para la modulación inmunitaria de los trastornos inflamatorios tal como alergia y enfermedades inflamatorias del intestino. En contraste, la cepa NCC2583 indujo fuertes niveles de IFN γ e IL-12, que hace esta cepa un buen candidato para la actividad anti-patógena y anti-cáncer.

Ejemplo 11:

Se usaron tres alimentos secos para mascotas en el estudio. Estos se referirán como "A", "B" y "C". El alimento "A" para mascotas es un alimento para mascotas seco, nutricionalmente completo, disponible bajo la marca comercial ALPO (ALPO es una marca comercial registrada de SOCIETE DES PRODUITS NESTLE, S.A. de Suiza).

El alimento "B" para mascotas es el mismo alimento seco para mascotas, nutricionalmente

completo como el alimento "A" para mascotas, pero está complementado con una mezcla en polvo de los microorganismos probióticos seleccionados, alimentados de un sobrecito. La mezcla comprende cantidades substancialmente iguales de *L. acidophilus* NCC2628 y *Bifidobacterium sp.* NCC2657. Se rocía sobre el alimento en cada comida que se sirve, la dosis suministrada que es de aproximadamente 10^8 cfu/día.

El alimento "C" para mascotas es un alimento seco para mascotas, nutricionalmente completo que es substancialmente idéntico al alimento "A" para mascotas, pero que contiene 1.2% en peso de un sobrenadante seco de un cultivo de *Enterococcus faecium* SF68 (NCIMB 10415).

Se usan 30 perros en el estudio. Los perros se pre-alimentan durante 8 semanas usando alimento "A" para mascotas. Los perros luego se dividen en 3 grupos de 10 perros cada uno, designados grupos A, B y C y se alimentan con las dietas correspondientemente nombradas durante 8 semanas.

Los perros tienen acceso libre a agua y se alimentan una vez al día. La prevalencia de caspa en el pelaje se determina por un panel de valoración de 30 miembros al comienzo y luego de 7 semanas.

Los perros se peinan antes de la evaluación por el panel y los miembros del panel no comparan las notas durante la evaluación.

En esta evaluación, los perros se presentan a cada uno de los panelistas individuales en 20 diferentes parejas. Se pregunta a los panelistas que

indiquen en sus hojas de registro qué perro del par presentado exhibe (1) menos caspa, (2) mayor brillo de pelaje y (3) menor olor de pelaje.

- 5 La condición completa de pelaje de todos los perros es visual y táctilmente buena como se puede esperar de perros saludables, normales. Sin embargo, los perros que se alimentan con la dieta "C" se encuentran que tienen notablemente menos caspa que aquellos alimentados con la
10 dieta "A" de control. Aquellos alimentados en la dieta "B" tienen un pelaje notablemente más brillante y exhiben notablemente menos olor de pelaje que los de "A". Se encuentran que estas características no difieren significativamente de forma estadística cuando se comparan
15 con los perros en el grupo B.

Ejemplo 12:

- Se elabora una mezcla de alimentación de aproximadamente 58% en peso de maíz, aproximadamente 6% en peso de gluten de maíz, aproximadamente 23% en peso de carne y harina, sales,
20 vitaminas y minerales que constituyen el resto.

- La mezcla de alimentación se alimenta en un pre-acondicionador y se humecta. Esta mezcla se adiciona a un polvo que contiene una mezcla de las siguientes cepas de lactobacilos: *Lactobacillus rhamnosus* NCC2583 (CNCM I-2449),
25 *Lactobacillus acidophilus* NCC2628 (CNCM I-2453) y *Enterococcus faecium* SF68 (NCIMB 10415). El polvo se dispersa de una manera substancialmente homogénea a todo lo largo de la mezcla. Esta mezcla de alimentación humectada luego se alimenta en el extrusor-hornillo y se gelatiniza.

La matriz gelatinizada que deja el extrusor se fuerza a través de una boquilla y se extruye. El producto extruido se corta en piezas adecuadas para alimentar los perros, se seca aproximadamente a 110°C durante aproximadamente 20 minutos, y se enfría para formar gránulos. Las piezas extruidas se verifican para la actividad de bacterias de las cepas adicionadas. No se detecta nada.

Ejemplo 13:

Se usan en el estudio 24 perros. Se incluyen perros jóvenes y viejos, estos últimos que son de 8 a 12 años de edad. Los perros viejos seleccionados, exhiben signos externos de inflamación de articulaciones en proporción con sus edades y parecen experimentar alguna dificultad en el movimiento a veces. Ciertos movimientos parecen ser dolorosos, Estos síntomas frecuentemente se observan en perros viejos y se cree que están relacionados a la condición artrítica.

Se usan tres alimentos secos para mascotas en el estudio. Designados A, B y C. El alimento A es un alimento seco para mascotas nutricionalmente completo (ALPO de Beffy Dinner). Esto es el alimento de control.

Los 24 miembros de los seleccionados se pre-alimentan durante 8 semanas usando alimento A para mascotas. Los perros luego se dividen en 3 grupos, A, B y C cada uno que tiene 8 perros y la misma proporción de jóvenes y viejos dentro del mismo. Cada grupo luego se alimenta con las siguientes dietas respectivas durante 8 semanas.

Grupo	Alimento para mascotas
A	A
B	B
C	C

El alimento B para mascotas es un alimento seco para mascotas nutricionalmente completo que substancialmente es idéntico al alimento "A" para mascotas pero que contiene un revestimiento que constituye el 2% de su peso, el revestimiento comprende los microorganismos de *Enterococcus faecium* sf68 (NCIMB 10415). La cantidad de alimento alimentado diariamente a cada perro se calcula de acuerdo a la masa individual corporal, de modo que la dosis de $1.0E+09$ cfu/día.

La dieta C comprende productos molidos, extruidos producidos en el Ejemplo 12 anterior. La cantidad de alimento alimentado diariamente a cada perro se calcula de acuerdo a la masa corporal individual, de modo que la dosis de microorganismos es de $1.0E+11$ cfu/día.

Los perros tienen acceso libre al agua y se alimentan una vez al día. Se une un medidor de actividad al collar de cada perro y las mediciones se toman diariamente. Los perros también se evalúan visualmente para la actividad por personal de la perrera.

La condición de todos los perros es visual y táctilmente buena como se puede esperar de perros saludables, normales. Sin embargo, los perros en los grupos que reciben las dietas B y C de alimento para mascotas son notablemente más activas que sus

contrapartes en la dieta A. Las lecturas del medidor soportan esas observaciones.

5 Adicionalmente, los perros más viejos en los grupos B y C, después de que se alimentan de las dietas B y C durante el periodo de prueba, parecen exhibir pocos signos externos de inflamación de articulaciones locales. Adicionalmente, los perros parecen experimentar menos niveles de dolor en el
10 movimiento físico y se mueven más libremente que antes. Se puede concluir que las dietas B y C parecen proporcionar alivio con respecto a ciertas señales de envejecimiento y mejorar la movilidad de las mascotas más antiguas.

Ejemplo 14: Alimento seco para gatos

15 Se elabora una mezcla de alimento de aproximadamente 58% en peso de maíz, aproximadamente 6% en peso de gluten de maíz, aproximadamente 23% en peso de harina de pollo, sales, vitaminas y minerales que constituyen el resto.

20 La mezcla de alimentación se alimenta en el pre-acondicionador y se humecta. La alimentación humectada luego se alimenta en un extrusor-hornillo y se gelatiniza. La matriz gelatinizada que deja el extrusor se fuerza a través de una boquilla y se extruye. El producto extruido se corta en piezas adecuadas para alimentar a los gatos, se seca a
25 aproximadamente 110°C durante aproximadamente 20 minutos, y se enfría para formar gránulos: en este punto, se proporciona un polvo liofilizado de una o más cepas de las siguientes especies de lactobacilos, para la aplicación a los gránulos:
Lactobacillus

5 *rhamnosus* NCC2583 (CNCM I-2449), *Lactobacillus acidophilus*
NCC2628 (CNCM I-2453), o *Enterococcus Faecium* SF68 (NCLBM-
10415). De esta manera, se proporciona suficiente polvo de
modo que la cantidad de consumo dietético correspondiente
para el gato es de aproximadamente 1.0E+07-1.0E+9 cfu/día.
Algo del polvo se mezcla en una primera masa de gránulos y se
embolsa. Una segunda cantidad del polvo se mide y se mezcla
10 con un portador lípido que luego se rocía en una segunda masa
de gránulos. Los gránulos se embolsan después de que el
revestimiento se ha secado de manera suficiente a 50-60°C
durante algunos minutos.

Ejemplo 15: Alimento en bote para mascotas y complemento

15 Se prepara una mezcla de 73% de carne de ave de corral,
pulmones de cerdo e hígado de res (molido), 16% de harina de
trigo, 2% de tintes, vitaminas y sales inorgánicas. Esta
mezcla se emulsiona a 12°C y se extruye en la forma de un
20 budín que luego se cuece a una temperatura de 90°C. Se enfría
a 30°C y se corta en trozos. Se mezclan 45% de estos trozos
con 55% de una salsa preparada de 98% de agua, 1% de tinte y
1% de goma de guar. Se rellenan de botes de hojalata y se
esterilizan a 125°C durante 40 minutos. Como un complemento
25 probiótico que se va a mezclar con el alimento para mascotas
antes de servir, se proporciona un empaque adicional en la
forma de sobrecitos con cepas de las siguientes especies de
lactobacilos: *Lactobacillus rhamnosus* NCC2583 (CNCM I-2449),
Lactobacillus acidophilus

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 1 290 136 B1

(12)

EUROPEAN PATENT SPECIFICATION

(45) Date of publication and mention
of the grant of the patent:
10.05.2006 Bulletin 2006/19

(21) Application number: 01956446.7

(22) Date of filing: 22.05.2001

(51) Int Cl.:

C12N 1/20 (2006.01) A61K 35/74 (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01) A23K 1/16 (2006.01)
A23K 1/20 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

(86) International application number:
PCT/EP2001/006039

(87) International publication number:
WO 2001/090311 (29.11.2001 Gazette 2001/48)

(54) PROBIOTICS FOR PET FOOD APPLICATIONS

PROBIOTICA FÜR VERWENDUNG ALS HAUSTIERFUTTER

PROBIOTIQUES POUR APPLICATIONS EN ALIMENTATION D'ANIMAUX DE COMPAGNIE

(84) Designated Contracting States:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR

(30) Priority: 25.05.2000 EP 00201867
25.04.2001 EP 01201503

(43) Date of publication of application:
12.03.2003 Bulletin 2003/11

(60) Divisional application:
05001029.7 / 1 541 673

(73) Proprietor: Société des Produits Nestlé S.A.
1800 Vevey (CH)

(72) Inventors:
• ZINK, Ralf
CH-1801 Le Mont Pelerin (CH)
• RENIERO, Roberto
CH-1801 Le Mont-Pelerin (CH)
• ROCHAT, Florence
CH-1820 Montreux (CH)
• CAVADINI, Christoph
CH-1801 Le Mont-Pelerin (CH)
• VON DER WEID, Thierry
CH-1005 Lausanne (CH)
• SCHIFFRIN, Eduardo
CH-1023 Crissier (CH)

• BENYACOU, Jalli
CH-1010 Lausanne (CH)
• ROUSSEAU, Virginie
F-31400 Toulouse (FR)
• PEREZ, Pablo
1900 La Plata (AR)

(74) Representative: Rupp, Christian et al
Mitscherlich & Partner,
Patent- und Rechtsanwälte,
Postfach 33 06 09
80066 München (DE)

(56) References cited:
EP-A- 0 862 863 WO-A-00/53202
WO-A-96/08261 WO-A-99/17788
US-A- 5 922 375 US-A- 5 968 569

• FUJISAWA TOMOHILO; MITSUOKA TOMOTARI:
'Homofermentative Lactobacillus species
predominantly isolated from canine feces'
JOURNAL OF VETERINARY MEDICAL SCIENCE
vol. 58, no. 6, June 1996, JAPAN, pages 591 - 593
• HARTEMINK R.; ROMBOUTS FRANS M.:
'Comparison of media for the detection of
bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes
from faecal samples' Journal of Microbiological
Methods' JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL
METHODS vol. 36, no. 3, June 1999,
NETHERLANDS, pages 181 - 192

Note: Within nine months from the publication of the mention of the grant of the European patent, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to the European patent granted. Notice of opposition shall be filed in a written reasoned statement. It shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid. (Art. 99(1) European Patent Convention).

to certain signs of ageing and improve the motility of older pets.

Example 14: Dry cat food

[0169] A feed mixture is made up of about 58% by weight of corn, about 6% by weight of corn gluten, about 23% by weight of chicken meal, salts, vitamins and minerals making up the remainder.

[0170] The feed mixture is fed into a preconditioner and moistened. The moistened feed is then fed into an extruder-cooker and gelatinised. The gelatinised matrix leaving the extruder is forced through a die and extruded. The extrudate is cut into pieces suitable for feeding to cats, dried at about 110°C for about 20 minutes, and cooled to form pellets. At this point, a lyophilized powder of one or more strains of the following *Lactobacillus* species is provided for application to the pellets: *Lactobacillus rhamnosus* NCC2583 (CNCM I-2449), *Lactobacillus acidophilus* NCC2628 (CNCM I-2453) or *Enterococcus faecium* SF68 (NCIMB 10415). Sufficient powder is thus provided so that the corresponding dietary intake amount for the cat is from about 1.0E+07-1.0E+9 cfu / day. Some of the powder is mixed into a first mass of pellets and bagged. A second quantity of the powder is measured out and mixed with a lipid carrier which is then sprayed on to a second mass of pellets. The pellets are bagged after the coating has dried sufficiently at 50-60°C for some minutes

Example 15: Canned pet food and supplement.

[0171] A mixture is prepared from 73 % of poultry carcass, pig lungs and beef liver (ground), 16 % of wheat flour, 2 % of dyes, vitamins, and inorganic salts. This mixture is emulsified at 12°C and extruded in the form of a pudding which is then cooked at a temperature of 90°C. It is cooled to 30°C and cut in chunks. 45% of these chunks are mixed with 55% of a sauce prepared from 98% of water, 1% of dye and 1% of guar gum. Tinplate cans are filled and sterilized at 125°C for 40 min. As a probiotic supplement to be mixed with the pet-food before serving, additional packaging in sachet form with strains of the following *Lactobacillus* species are provided *Lactobacillus rhamnosus* NCC2583 (CNCM I-2449), *Lactobacillus acidophilus* NCC2628 (CNCM I-2453) or *Enterococcus faecium* SF68 (NCIMB 10415). The corresponding amount for the pet is from about 10⁸-10¹² cfu/day, depending on whether a cat or a dog and on physical factors such as body mass. This is supplied as a supplement with removably attached to the can, together with feeding directions.

Claims

1. Probiotic strain which is *Lactobacillus reuteri* NCC2581 (CNCM I-2448), *Lactobacillus reuteri* NCC2592 (CNCM I-2450), *Lactobacillus rhamnosus* NCC2583 (CNCM I-2449), *Lactobacillus reuteri* NCC2603 (CNCM I-2451), *Lactobacillus reuteri* NCC2613 (CNCM I-2452), *Lactobacillus acidophilus* NCC2628 (CNCM I-2453).
2. A method of obtaining probiotic strains for cats and/or dogs comprising the steps of:
 - a. Isolating lactic acid bacteria strains from cats' and dogs' faeces,
 - b. Selecting strains having the capability to grow producing at least 1.0E+06 cfu/ml in the presence of up to 2.0% bile salts, and having the capability to grow producing at least 1.0E+06 cfu/ml after 2 hours at a pH range from 3.4 to 4.2.
3. A method of preparing a dog or cat food composition comprising the steps of:
 - a. Isolating lactic acid bacteria strains from cats' or dogs' faeces,
 - b. Selecting strains having the capability to grow producing at least 1.0E+06 cfu/ml in the presence of up to 2.0% bile salts, and having the capability to grow producing at least 1.0E+06 cfu/ml after 2 hours at a pH range from 3.4 to 4.2.
 - c. Incorporating the selected strain(s) into a dog or cat food composition.
4. The method according to claim 3, the strain being a *Lactobacillus* or *Bifidobacterium*, wherein the strain is associated with an ingestible support or a pharmaceutical matrix.
5. The method according to claim 4, the composition being intended for the health of the gastrointestinal tract of cats and/or dogs.
6. The method according to claim 4, the composition being intended for the health of the skin and/or coat system of cats and/or dogs.

7. The method according to claim 4, the composition being intended for ameliorating or reducing the effects of ageing in cats and/or dogs.
8. The method according to claims 3 to 7, wherein the strain is contained in the composition in an amount of from $1.0E+04$ cfu/g to $1.0E+11$ cfu/g.
9. The method according to any of claims 3 to 8, which further contains the step of adding a prebiotic.
10. The method according to any of claims 3 to 9, wherein the composition is in the form of
 - a. A nutritionally complete pet food in a powdered, dried or a wet, chilled or shelf stable form or,
 - b. In the form of a dietary adjunct.

Patentansprüche

1. Probiotischer Stamm, welcher ist: *Lactobacillus reuteri* NCC2581 (CNCM I-2448), *Lactobacillus reuteri* NCC2592 (CNCM I-2450), *Lactobacillus rhamnosus* NCC2583 (CNCM I-2449), *Lactobacillus reuteri* NCC2603 (CNCM I-2451), *Lactobacillus reuteri* NCC2613 (CNCM I-2452), *Lactobacillus acidophilus* NCC2628 (CNCM I-2453).
2. Verfahren zum Erhalten probiotischer Stämme für Katzen und/oder Hunde, welches die folgenden Schritte umfasst:
 - a. Isolieren von Milchsäure-Bakterien-Stämmen aus Fäkalien von Katzen und Hunden,
 - b. Auswählen von Stämmen, welche die Fähigkeit haben, so zu wachsen, dass sie zumindest $1.0E+06$ cfu/ml in Anwesenheit von bis zu 2,0% Gallen-Salzen erzeugen, und welche die Möglichkeit haben, so zu wachsen, dass sie zumindest $1.0E+06$ cfu/ml nach 2 Stunden in einem pH-Bereich von 3,4 bis 4,2 erzeugen.
3. Verfahren zum Erzeugen einer Hundefutter-Zusammensetzung oder Katzenfutter-Zusammensetzung, welches die folgenden Schritte umfasst:
 - a. Isolieren von Milchsäure-Bakterien-Stämmen aus Katzen-Fäkalien oder Hunde-Fäkalien,
 - b. Auswählen von Stämmen, welche die Möglichkeit haben, so zu wachsen, dass sie zumindest $1.0E+06$ cfu/ml in Anwesenheit von bis zu 2,0% Gallen-Salzen erzeugen, und welche die Möglichkeit haben, so zu wachsen, dass sie zumindest $1.0E+06$ cfu/ml nach 2 Stunden in einem pH-Bereich von 3,4 bis 4,2 erzeugen,
 - c. Einarbeiten des/der ausgewählten Stammes/Stämme in eine Hundefutter-Zusammensetzung oder Katzenfutter-Zusammensetzung.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei der Stamm ein *Lactobacillus* oder *Bifidobacterium* ist, wobei der Stamm mit einem essbaren Träger oder einer pharmazeutischen Matrix assoziiert ist.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, wobei die Zusammensetzung für die Gesundheit des Magen-Darm-Traktes von Katzen und/oder Hunden vorgesehen ist.
6. Verfahren gemäß Anspruch 4, wobei die Zusammensetzung für die Gesundheit des Haut-Systems und/oder Fell-Systems von Katzen und/oder Hunden vorgesehen ist.
7. Verfahren gemäß Anspruch 4, wobei die Zusammensetzung zum Verbessern oder Reduzieren der Alterung-Effekte in Katzen und/oder Hunden vorgesehen ist.
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 7, wobei der Stamm in der Zusammensetzung in einer Menge von $1.0E+04$ cfu/g bis $1.0E+11$ cfu/g enthalten ist.
9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 8, welches ferner den Schritt eines Zufügens einer präbiotischen Substanz enthält.
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 9, wobei die Zusammensetzung in Form von
 - a. einem vollständig mit Nährstoffen versehenen Tierfutter in einer pulverförmigen, getrockneten, oder in einer

250

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C., 9 de enero de 2008

Abogado
Gustavo Tamayo Arango

ASUNTO Radicación 02-10185
 Trámite 002
 Evento 001
 Actuación 430
 Oficio 714
 Folios 005

Patente de Invención ☒ Patente de Modelo de Utilidad ☐
Vía Nacional ☐
Vía PCT (fase nacional) ☒ Cap. I ☐ Cap. II ☒
No. Sol. Internacional PCT/EP01/06309
Fecha de Presentación Internal. 22/05/2001

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

1. Documentos estudiados

- 1.1. Descripción: Folios: 176 a 243 según modificación de 26/10/2007.
- 1.2. Reivindicaciones: Folios: 244 a 246 según modificación de 26/10/2007.
- 1.3. Prioridad: 25/05/2000, EP 00201867
 25/04/2001, EP 01201503
- 1.4. Respuesta del Solicitante: Folios: 158 a 173.

2. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Nuevos probióticos para aplicaciones de alimento de mascotas".

El objeto de la presente solicitud de patente de invención consiste en el aislamiento de cepas bacterianas probióticas, su método de obtención y composiciones que las contienen, así como el método de preparación de estas últimas.

Reivindicación 1: Cepas probióticas de *Lactobacillus reuteri* CNCM I-2448, *Lactobacillus reuteri* CNCM I-2450, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-2449, *Lactobacillus reuteri* CNCM I-2451, *Lactobacillus reuteri* CNCM I-2452, *Lactobacillus acidophilus* CNCM I-2453.

Reivindicación 2: Un método para la obtención de cepas probióticas para gatos y/o perros, que comprende las etapas de: 1) aislar cepas de bacteria de ácido láctico a partir de las heces de gatos y perros; y 2) seleccionar las cepas con capacidad de producir al menos 1×10^6 cfu/mL en presencia de 2.0% de sales biliares, luego de dos horas a un pH de 3.4 a 4.2.

Reivindicación 3-7: Un método para la preparación de una composición de alimento para perro o gato, que comprende las etapas de: 1) aislar cepas de bacteria de ácido láctico (*Lactobacillus spp.* o *Bifidobacterium spp.*) a partir de las heces de gatos y perros; 2) seleccionar las cepas con capacidad de producir al menos 1×10^6 cfu/mL en presencia de 2.0% de sales biliares, luego de dos horas a un pH de 3.4 a 4.2; y 3) incorporar la(s) cepa(s) seleccionada(s) en una composición de alimento para perro o gato en una cantidad de 1×10^4 cfu/g a 1×10^{11} cfu/g sobre un soporte ingerible o una matriz en forma de polvo, seca o húmeda, molida o estable en anaquel o como un adjunto dietético.

Reivindicación 8: Una composición de alimento para mascotas que comprende una cepa aislada de bacteria de ácido láctico seleccionada del grupo consistente en *Lactobacillus reuteri* CNCM I-2448, *Lactobacillus reuteri* CNCM I-2450, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-2449, *Lactobacillus reuteri* CNCM I-2451, *Lactobacillus reuteri* CNCM I-2452, *Lactobacillus acidophilus* CNCM I-2453, *Enterococcus faecium* SF 68 NCIBM 10415 y combinaciones de los mismos en una cantidad de 1×10^4 a 1×10^{12} cfu/animal al día; que comprende además un prebiótico y se presenta en forma de polvo, seca o húmeda, molida o estable en anaquel o como un adjunto dietético o un complemento.

El problema planteado en esta solicitud es la necesidad de proporcionar nuevas cepas bacterianas probióticas para alimentación y mantenimiento de mascotas.

Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio proporciona cepas bacterianas de ácido láctico aisladas, su método de obtención y selección y composiciones que las contienen, así como el método de preparación de las mismas.

El objeto de la solicitud definida anteriormente se clasificó en la IPC A23K 1/00.

3. De la solicitud de Patente (según el caso)

3.1. Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

El capítulo reivindicatorio en general carece de concisión y claridad por cuánto:

- 1) no todas las cepas reclamadas cuentan con sustento probado suficiente (cláusula 8), de manera que se presenta una inconsistencia con la descripción;
- 2) se caracteriza la invención de manera imprecisa a partir de términos vagos como *al menos o hasta*, variadas posibilidades e intervalos muy amplios (p.e. cláusulas 3, 7, 8).

4. No es una invención (artículo 15 D 486 literal a)-f) (según causal)

Teniendo en cuenta que bajo la legislación colombiana "el todo o parte de seres vivos tal como se encuentran en la naturaleza, el material biológico existente en la naturaleza o que pueda ser asilado..." no se considera una invención y que los aislamientos de cepas bacterianas (reivindicación 1) corresponden con este tipo de materia, al ser de origen natural, no pueden considerarse como susceptibles de patente.

Por lo anterior y de acuerdo a lo establecido en el artículo 15 de la Decisión 486 el contenido de la citada reivindicación no es admisible.

5. Determinación del Estado de la Técnica

La fecha que se ha tenido en cuenta para determinar el Estado de la Técnica es:

Fecha de presentación de la solicitud prioritaria: 25/05/2000.

Teniendo en cuenta la fecha indicada se realizó la búsqueda en el estado de la técnica de documentos relacionados con la solicitud encontrándose los siguientes documentos más relevantes:

Nº	Documento	Título	Fecha de publicación
D1	US5968569	"Pet food product containing probiotics"	19 – Oct – 1999

6. Análisis de patentabilidad (según requisito) (artículo 14 D486)

6.1. Nivel inventivo (artículo 18 D486)

La reivindicación 2 reclama un método para la obtención de cepas probióticas para gatos y/o perros, que comprende las etapas de: 1) aislar cepas de bacteria de ácido láctico a partir de las heces de gatos y perros; y 2) seleccionar las cepas con capacidad de producir al menos 1×10^6 cfu/mL en presencia de 2.0% de sales biliares, luego de dos horas a un pH de 3.4 a 4.2.

Las reivindicaciones 3-7 reclaman un método para la preparación de una composición de alimento para perro o gato, que comprende las etapas de: 1) aislar cepas de bacteria de ácido láctico (*Lactobacillus spp.* o *Bifidobacterium spp.*) a partir de las heces de gatos y perros; 2) seleccionar las cepas con capacidad de producir al menos 1×10^6 cfu/mL en presencia de 2.0% de sales biliares, luego de dos horas a un pH de 3.4 a 4.2; y 3) incorporar la(s) cepa(s) seleccionada(s) en una composición de alimento para perro o gato en una cantidad de 1×10^4 cfu/g a 1×10^{11} cfu/g sobre un soporte ingerible o una matriz en forma de polvo, seca o húmeda, molida o estable en anaquel o como un adjunto dietético.

Y la reivindicación 8 reclama una composición de alimento para mascotas que comprende una cepa aislada de bacteria de ácido láctico seleccionada del grupo consistente en *Lactobacillus reuteri* CNCM I-2448, *Lactobacillus reuteri* CNCM I-2450, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-2449, *Lactobacillus reuteri* CNCM I-2451, *Lactobacillus reuteri* CNCM I-2452, *Lactobacillus acidophilus* CNCM I-2453, *Enterococcus faecium* SF 68 NCIBM 10415 y combinaciones de los mismos en una cantidad de 1×10^4 a 1×10^{12} cfu/animal al día; que comprende además un prebiótico y

se presenta en forma de polvo, seca o húmeda, molida o estable en anaquel o como un adjunto dietético o un complemento.

Considerando: 1) que tanto el aislamiento de bacterias como su selección según condiciones de crecimiento y/o cultivo (pH, concentración de sales, presencia de oxígeno, etc.) se constituyen como actividades cotidianas para un técnico medio en la materia; 2) que el concepto de incluir probióticos en alimentos y suplementos para mejorar la salud de animales es también conocido [ver p.e. D1 (folios 147-153)]; 3) que el ajuste de proporciones y formas de presentación de una composición se constituyen igualmente como de uso habitual en la técnica; 4) y que el mismo documento (D1) enseña composiciones probióticas que pueden contener los mismos microorganismos [Ver Columna 3, Párrafo 10-25], que además sugiere el ajuste de su contenido según diferentes composiciones y componentes e inclusive muestra las mismas concentraciones bacterianas propuestas en la solicitud en estudio [Ver Descripción y Ejemplos]; 5) y que la única diferencia entre la solicitud y D1 se refiere a las condiciones específicas de cultivo, correspondientes con actividades habituales para un técnico medio en la materia, los métodos y las composiciones reclamados solo pueden reconocerse como una alternativa a las presentes en el estado de la técnica al tiempo de su reclamación y por lo tanto carente de actividad inventiva.

De esta manera, la materia reclamada no cumple con el requisito de nivel inventivo establecido en el artículo 18 de la Decisión 486.

7. Conclusión:

Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

N°	Documento N°	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	US5968569	1-8	Nivel Inventivo

8. Respuesta a los argumentos del solicitante:

De acuerdo a lo citado en el concepto técnico No.1195 y a la respuesta del solicitante se aclara que la materia referente a los aislamientos no se exceptúa de patentabilidad, sino que se **excluye** en virtud del artículo 15 de la Decisión 486 que no considera una invención *“el todo o parte de seres vivos tal como se encuentran en la naturaleza, el material biológico existente en la naturaleza o que pueda ser aislado...”*, entre lo que, obviamente, se incluye a los microorganismos y sus aislamientos. Por lo tanto, no es procedente aceptar las aclaraciones del solicitante, toda vez que sus argumentos corresponden a disposiciones sobre excepciones a patentabilidad (artículo 20) y no a materia que no se considera como invención, a más de que las instrucciones citadas (ADPIC y Disposición Transitoria Segunda Decisión 486) no son vinculantes, no han sido normalizadas y en ningún caso sobrepasan la Decisión 486, que no considera como invención a la materia presente en la naturaleza (artículo 15) y que no excluye a los microorganismos de excepción de patentabilidad (artículo 20) tal como se propone en el numeral III del artículo 27del ADPIC.

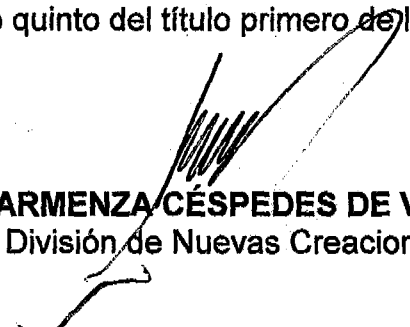
En estrecha relación con lo anterior y teniendo en cuenta que tal como lo argumenta el solicitante en su respuesta son los aislamientos el concepto novedoso e inventivo reclamado, este Despacho no puede reconocerlo como tal, no solo porque el aislamiento *per se* no se considera como una invención, sino porque tratándose de las mismas especies ya conocidas por sus calidades probióticas es, en este caso, la diversidad biológica existente entre diferentes cepas la responsable de las características propias de las mismas, y no la intervención de una iniciativa

innovadora. Asimismo, para los métodos y las composiciones reclamadas, que obtenidas de manera convencional y sin innovaciones aparentes no pueden reconocerse como procedentes de la inventiva, máxime cuando no es su desarrollo el objeto de la invención.

Adicionalmente, se considera que no es preciso argumentar que D1 es silencioso sobre los métodos reclamados y los aislamientos, ya que menciona tanto las especies reclamadas como sus características técnicas de importancia y los métodos definidos corresponden con los convencionales, de manera que se podría decir que están intrínsecos a los desarrollos presentados en D1. Las diferentes fuentes de aislamiento no hacen diferente a la especie, ni cambian las características esenciales y conocidas de las misma y la obviedad técnica de los métodos reclamados no es equivalente al silencio de D1 al respecto.

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de 60 días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

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


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha

18 ENE 2008

CONCEPTO TÉCNICO No. 72	EXAMINADOR TÉCNICO Código No.202081
-----------------------------------	---

ASL