

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 333**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

A23K 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04815184 .9**

96 Fecha de presentación: **17.12.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1718155**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.11.2006**

54 Título: **MÉTODOS DE USO DE BIFIDOBACTERIAS PROBIÓTICAS PARA ANIMALES DE COMPAÑÍA.**

30 Prioridad:
19.12.2003 US 531597 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2011

73 Titular/es:
**THE IAMS COMPANY
7250 POE AVENUE
DAYTON, OHIO 45414, US y
ALIMENTARY HEALTH LIMITED**

72 Inventor/es:
**BOILEAU, Thomas, William-Maxwell; CEDDIA, Michael,
Anthony;
DAVENPORT, Gary, Mitchell; KIELY, Barry, Pius;
O'MAHONY, Liam, Diarmuid; SUNVOLD, Gregory, Dean;
TETRICK, Mark, Alan y VICKERS, Robert, Jason**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 368 333 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de uso de bifidobacterias probióticas para animales de compañía.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de *Bifidobacteria* probióticas, más específicamente a métodos de uso de *Bifidobacteria* probióticas en animales de compañía.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los mecanismos de defensa para proteger el tracto gastrointestinal de los mamíferos (GI) de la colonización de bacterias son muy complejos. El tracto GI de la mayoría de mamíferos está colonizado por microflora natural y microorganismos patógenos invasivos. En un estado saludable, esta microflora en conflicto se encuentra en un estado de equilibrio. La modificación del equilibrio de la microflora intestinal puede producir o evitar muchos trastornos GI, en humanos, y en otras especies de mamíferos como animales de compañía incluidos gatos, perros y conejos. El bienestar de los animales de compañía está estrechamente relacionado con su alimentación y salud GI, y el mantenimiento del equilibrio de la microflora intestinal en estos animales puede dar como resultado animales domésticos más sanos.

El número y composición de la microflora intestinal suele ser estable, aunque la edad y la dieta pueden modificarlo. Se cree que la acidez gástrica, la bilis, la peristaltis intestinal y la inmunidad local son factores importantes en la regulación de la flora bacteriana en el intestino delgado de los seres humanos y otros mamíferos. A menudo los trastornos GI de los animales domésticos, incluidos los que se encuentran en perros y gatos, están relacionados con un crecimiento bacteriano excesivo y la producción de enterotoxinas mediante bacterias patógenas. Estos factores desestabilizan el equilibrio de la microflora intestinal y pueden fomentar la inflamación y respuestas inmunitarias aberrantes.

Recientemente, se han empezado a realizar investigaciones para destacar algunas valiosas cepas de bacterias obtenidas mediante el aislamiento del tracto gastrointestinal extirpado y lavado de mamíferos, como seres humanos y perros, y su potencial uso como agentes probióticos. Los probióticos se consideran preparaciones de bacterias, o bien viables o muertas, sus constituyentes como las proteínas o carbohidratos, o fracciones purificadas de fermentos bacterianos que estimulan la salud de los mamíferos al preservar la microflora natural en el tracto GI, y refuerzan los controles normales en respuestas inmunitarias aberrantes. Hay quienes consideran que las bacterias probióticas son más eficaces cuando se derivan de las especies, o especies estrechamente relacionadas, previstas para ser tratadas. Aunque se han detallado varias cepas de bacterias probióticas, los métodos de uso de estas cepas y su eficacia terapéutica se ha limitado a la modulación de trastornos gastrointestinales en seres humanos. Todavía no se han llevado a cabo muchas investigaciones sobre el potencial que tienen estos microorganismos para afectar de forma ventajosa a sistemas psicológicos que no sean el tracto gastrointestinal en los animales de compañía, como perros y gatos.

WO01/90311 se refiere a probióticos nuevos para su aplicación en alimentos para animales domésticos.

El artículo de Colum dunne y col. en Antonie van Leeuwenhoek, Dordrecht, NL, vol. 76, n.º 1-4, de julio de 1999, páginas 279-292 se refiere a un estudio para demostrar la funcionalidad de los probióticos en modelos animales de enfermedad y en pruebas clínicas con seres humanos.

WO03/010297 se refiere a cepas de bifidobacteria probiótica.

En US-2003/0170217 se describe la bifidobacteria NCIMB41003 aislada del tracto gastrointestinal humano extirpado y lavado.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición que comprende una cepa probiótica de bifidobacterias obtenida mediante aislamiento del tracto gastrointestinal de un mamífero extirpado y lavado para usar en el tratamiento de un animal de compañía seleccionado del grupo que consiste en perros y gatos, siendo el tratamiento seleccionado para regular el sistema inmunológico de un animal de compañía, mantener o mejorar la

5 salud de la piel y/o el pelaje de un animal de compañía, mejorar o reducir los efectos del envejecimiento en un animal de compañía, evitar la pérdida de peso durante y después de la infección en un animal de compañía, tratar o prevenir dolencias del tracto urinario en los animales de compañía, aumentar la digestión de fibra en los animales de compañía, evitar o tratar la infección del tracto gastrointestinal de un animal de compañía, mejorar la digestión en los animales de compañía, reducir los niveles de estrés en un animal de compañía o mezclas de las mismas, en donde dichas bifidobacterias probióticas se seleccionan del grupo que consiste en *Bifidobacteria pseudolongum* NCIMB 41199 y *Bifidobacteria globosum* NCIMB 41198 y mezclas de los mismos.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Secuencias

SEC. n.º 1 – Secuencia de nucleótidos del espaciador intergénico 16s-23s de *Bifidobacteria globosum* AHC7 (NCIMB 41198).

15 SEC. n.º 2 – Secuencia de nucleótidos del espaciador intergénico 16s-23s de *Bifidobacteria pseudolongum* AHC7 (NCIMB 41199).

SEC. n.º 3 – Secuencias de los iniciadores de la PCR izquierda 16s-23s para análisis de secuencias.

20 SEC. n.º 4 – Secuencias de los iniciadores de la PCR derecha 16s-23s para análisis de secuencias.

Números de depósito bacteriano

25 La tabla que se muestra a continuación describe las especies, el número de cepa y número de depósito para *Bifidobacteria* probióticas obtenidas mediante el aislamiento del tracto gastrointestinal extirpado y lavado de mamíferos de utilidad en la presente invención. Las cepas bacterianas se han depositado en la NCIMB (National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria), Aberdeen, Reino Unido.

| Referencia de la cepa | Número de depósito NCIMB | Listado de secuencias |
|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| AH208 | NCIMB 41050 | - |
| AH209 | NCIMB 41051 | - |
| AH210 | NCIMB 41052 | - |
| AH211 | NCIMB 41053 | - |
| AH212 | NCIMB 41099 | - |
| AH214 | NCIMB 41100 | - |
| AH35624 | NCIMB 41003 | - |
| AHC7 | NCIMB 41199 | SEC. n.º 2 |
| AHCF | NCIMB 41198 | SEC. n.º 1 |

30 Todos los pesos, medidas y concentraciones de la presente memoria están medidos a 25 °C en la composición en su totalidad, salvo que se indique lo contrario.

Salvo que se indique lo contrario, todos los porcentajes de composiciones referidas en la presente memoria son porcentajes en peso y todas las relaciones son relaciones en peso.

35 Salvo que se indique lo contrario, todos los pesos moleculares son pesos moleculares promedios en peso.

Salvo que se indique lo contrario, el contenido de todas las fuentes bibliográficas a las que se hace referencia en el presente texto se incorpora en su totalidad a la presente memoria a título de referencia.

Excepto en los casos en los que se detallan los valores de medición reales de ejemplos específicos, los valores numéricos a los que se hace referencia en la presente memoria deberán considerarse acompañados por la palabra “aproximadamente”.

5 En la siguiente descripción, la abreviatura UFC (“unidades formadoras de colonias”) designa al número de células bacterianas reveladas por recuentos microbiológicos en placas de agar, como se conoce comúnmente en la técnica.

10 El término “mutantes de los mismos”, tal y como se utiliza en la presente memoria, incluye cepas bacterianas derivadas que tienen al menos 88% de homología, preferiblemente al menos 90% de homología, más preferiblemente 95% de homología con la secuencia polinucleótida del espaciador intergénico 16s-23s de una cepa mencionada, pero que comprende mutaciones de ADN en otras secuencias de ADN en el genoma bacteriano.

15 El término “mutaciones de ADN”, tal y como se utiliza en la presente memoria, incluye mutaciones naturales o inducidas que comprenden al menos alteraciones de una sola base que incluyen deleciones, inserciones, transversiones, y otras modificaciones del ADN conocidas por el experto en la técnica, entre las que se incluyen la modificación genética introducida en una secuencia de aminoácidos o nucleótida precursora mientras se mantiene al menos 50% de homología con la secuencia precursora. Preferiblemente, la secuencia que comprende la mutación o mutaciones de ADN tiene al menos un 60%, más preferiblemente al menos 75%, aún más preferiblemente 85% de homología con la secuencia precursora. La “homología” de la secuencia, tal y como se utiliza en la presente memoria, se puede determinar utilizando técnicas estándar conocidas por el experto en la técnica. Por ejemplo, la homología se puede determinar utilizando el programa de algoritmos de homología en línea “BLAST”, disponible públicamente en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

25 El término “modificación genética”, tal y como se utiliza en la presente memoria, incluye la introducción de secuencias de ADN exógenas y/o endógenas en el genoma de un organismo o bien mediante la inserción en el genoma de dicho organismo o mediante vectores que incluyen ADN plasmídico o bacteriófago como es conocido por el experto en la técnica, siendo dicha secuencia de ADN de al menos dos bases de ácido desoxirribonucleico de longitud.

30 En la presente memoria, “animal de compañía” significa un animal doméstico. Preferiblemente, “animales de compañía” significa animales domésticos como perros, gatos, conejos, hurones, caballos, vacas, o similares. Más preferiblemente, “animales de compañía” significa un perro o gato doméstico.

35 La cepa de bacterias de ácido láctico del género *Bifidobacteria globosum* obtenida mediante aislamiento del tracto gastrointestinal canino extirpado y lavado se puede utilizar para proporcionar un beneficio probiótico tras la administración oral en animales, preferiblemente animales de compañía o seres humanos. Este beneficio probiótico generalmente mantiene y mejora la salud general del animal. Entre los elementos no limitativos de la salud y la fisiología animal que son beneficiosos, bien al aliviar terapéuticamente los síntomas, o en la prevención de la enfermedad mediante profilaxis, se incluyen los trastornos inflamatorios, inmunodeficiencia, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del intestino irritable, cáncer (especialmente el de los sistemas gastrointestinal e inmunológico), enfermedades diarreicas, diarrea asociada a antibióticos, apendicitis, enfermedades autoinmunitarias, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, amiloidosis, artritis reumatoide, artritis, movilidad de las articulaciones, diabetes mellitus, infecciones bacterianas, infecciones virales, infecciones por hongos, enfermedad del periodonto, enfermedad urogenital, trauma asociado a una operación quirúrgica, enfermedad metastática inducida por una operación quirúrgica, septicemia, pérdida de peso, aumento de peso, acumulación excesiva de tejido adiposo, anorexia, control de la fiebre, caquexia, curación de heridas, úlceras, infección de la barrera del intestino, alergia, asma, trastornos respiratorios, trastornos circulatorios, enfermedad coronaria, anemia, trastornos del sistema de coagulación de la sangre, enfermedad renal, trastornos del sistema nervioso central, enfermedad hepática, isquemia, trastornos nutricionales, osteoporosis, trastornos endocrinos, y trastornos epidérmicos. Se prefiere el tratamiento del tracto gastrointestinal, incluido el tratamiento o prevención de diarreas; la regulación del sistema inmunológico, preferiblemente el tratamiento o prevención de las enfermedades autoinmunitarias y la inflamación; manteniendo o mejorando la salud de la piel y/o el pelaje, preferiblemente tratando o previniendo las enfermedad atópicas de la piel; mejorando o reduciendo los efectos del envejecimiento, incluidos los niveles de actividad y percepción mental; y evitando la pérdida de peso durante la infección y tras la misma.

60 El tratamiento de los trastornos descritos más arriba se puede medir utilizando técnicas conocidas por el experto en la técnica. Por ejemplo, los trastornos inflamatorios incluyendo las enfermedades autoinmunitarias y la inflamación se pueden detectar y supervisar utilizando pruebas de la función inmunológica *in vivo* como la blastogénesis de linfocitos, la actividad de las células asesinas naturales, la respuesta de los anticuerpos a las

vacunas, hipersensibilidad retardada y mezclas de las mismas. Estos métodos se describen brevemente en la presente memoria, aunque son bien conocidos por el experto en la técnica.

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
1. Blastogénesis de linfocitos: esta prueba mide la respuesta proliferativa *in vitro* de los linfocitos aislados de la sangre total fresca de los animales de prueba y control a varios mitógenos y es una medida de la función global de las células T y B. Explicado de manera concisa, los mononucleocitos de la sangre periférica (PBMC) se aíslan de la sangre total mediante métodos de centrifugación de la densidad Ficoll-Hypaque conocidos por el experto en la técnica. Los PBMC aislados se lavan dos veces en un medio celular RPMI 1640 suplementado con HEPES, L-glutamina y penicilina/estreptomicina. Las células lavadas se vuelven a suspender en RPMI 1640, se cuentan y se ajusta la densidad celular apropiadamente. Las células 2×10^5 se exponen en un rango de concentraciones (0,1 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$) de varios mitógenos, algunos ejemplos de los cuales incluyen mitógeno de la hierba carmín (Gibco), fitohemaglutinina (Gibco) y conconavalina A (Sigma) por triplicado durante 72 horas a 37 °C y 5% de CO₂ con 10% de suero fetal bovino (Sigma). A las 54 horas las células se pulsan con 1 μCi ³H-timidina, y las células se recolectan y se leen los recuentos por centelleo en un TopCount NXT a las 72 horas.
 2. Actividad de las células asesinas naturales: como se describe en US-6.310.090, esta prueba mide la actividad efectora *in vitro* de las células asesinas naturales aisladas de la sangre total fresca de los animales de prueba y control. Las células asesinas naturales son un componente de la función inmunológica de un mamífero. Para evaluar la actividad citotóxica de las células NK se utilizaron células de adenocarcinoma de tiroides canina como células diana. Previamente se había demostrado que esta línea celular es susceptible de ser destruida por las células NK caninas. Las células diana se cultivaron en un matraz T75 con 20 ml de medio esencial mínimo (MEM; Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FCS), 100 U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina. Tras la confluencia, las células diana se tripsinizaron, se lavaron 3 veces y se resuspendieron a una concentración de 5×10^5 células/ml en medio completo (RPMI-1640+10% FCS+100 U/ml de penicilina+100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina). Con una pipeta, se introdujeron alícuotas de 100 μl de las células diana, por triplicado, sobre placas de 96 pocillos de fondo en U (Costar, Cambridge, Mass.) y se incubaron durante 8 horas para permitir la adherencia celular. A continuación, se añadieron linfocitos (células efectoras; 100 μl) aisladas mediante una separación Ficoll-Hypaque (como se ha descrito anteriormente) a las células diana para proporcionar una relación de efector/célula diana (E:T) de 10:1. Después de 10 horas de incubación a 37 °C., se añadieron 20 μl de un sustrato que contenía 5 μg de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT). La mezcla se incubó durante 4 horas a 37 °C, después de las cuales se extrajo el MTT no metabolizado mediante aspiración. Los cristales de formazano se disolvieron añadiendo 200 μl de etanol al 95%. La densidad óptica se midió a 570 nm utilizando un lector de microplacas. El porcentaje de lisis específica de células NK se calculó del siguiente modo:

$$\text{Citotoxicidad específica (\%)} = 100 \times \{1 - [(\text{OD de células diana y células efectoras} - \text{OD de células efectoras}) / (\text{OD de células diana})]\}$$
 3. Respuesta de los anticuerpos a las vacunas: se da a los sujetos que realizan la prueba una serie (de hasta 5) vacunas después de, al menos, 12 semanas de alimentación de control o probiótica. Las vacunas pueden ser una mezcla de vacunas nuevas y redundantes. Entre los ejemplos no limitativos de series de vacunas que se pueden utilizar se incluyen mezclas de vacunas preparadas por Fort Dodge Animal Health. Entre los ejemplos no limitativos de vacunas adecuadas para su uso en la presente invención se incluyen la vacuna para moquillo canino, adenovirus, coronavirus, parainfluenza y parvovirus. El historial de vacunas del sujeto de la prueba determinará las vacunas que se utilizarán. Los anticuerpos específicos a las vacunas administradas se miden en la sangre durante 3 semanas y se compara la duración y la resistencia de la respuesta en los grupos de alimentación probióticos y de control.
 4. Hipersensibilidad retardada: un método no invasivo *in vivo*, de evaluar el estado del sistema inmunológico. Esta prueba comprende una inyección intradérmica del mitógeno policlonal fitohemaglutinina (PHA) junto con glóbulos rojos de ovejas, una vacuna multivalente, histamina (100 μl de 0,0275 g/l de fosfato de histamina; Greer, Lenoir, NC), o PBS (100 μl de solución salina tampón fosfato, 8,5 g/l; Sigma). La respuesta inmunitaria al antígeno se registra como el grosor del pliegue cutáneo utilizando calibradores en intervalos de tiempos de 0, 24, 48 y 72 horas después de administrar la inyección. Un incremento en el grosor del pliegue cutáneo es indicativo de una mayor respuesta a la hipersensibilidad que debe disminuirse mediante el tratamiento con las bacterias de la presente invención.

Otros métodos para determinar el efecto de las bacterias *Bifidobacteria* de la presente invención se describen en US-6.133.323 y US-6.310.090.

Además, se puede determinar la mejora de los efectos de la edad utilizando la absorptometría de rayos X doble o una exploración mediante tomografía por ordenador para medir la composición del cuerpo, incluyendo la masa de la grasa corporal, la masa exenta de grasas y el contenido mineral del hueso. De forma similar, este método se puede utilizar para determinar los cambios en la anatomía como la pérdida de peso o la densidad ósea en los sujetos tras la infección.

Las *Bifidobacteria* de la presente invención también se pueden utilizar en un método para reducir los niveles de estrés en los animales de compañía. Las concentraciones de hormonas del estrés en la sangre incluyendo la epinefrina, norepinefrina, dopamina, cortisol y proteína C reactiva se pueden medir para determinar los niveles de estrés y su reducción o mantenimiento. Estas hormonas son marcadores biológicos de estrés reconocidos y se pueden medir fácilmente utilizando técnicas conocidas por el experto en la técnica.

Además, el mantenimiento o mejora de la salud de la piel y/o el pelaje de los animales domésticos, incluyendo las enfermedades atópicas de la piel, se puede medir utilizando valoraciones de la piel y el pelaje dirigidas por dos personas con la debida formación. Entre los ejemplos de los criterios examinados durante dichas valoraciones se incluyen los siguientes:

- a) Índice de caída del pelo: a cada sujeto que realiza la prueba se le asigna un índice de caída de pelo recogiendo el pelo producido durante una sesión de cepillado estandarizada. El pelo se retiene y se pesa y se comparan los sujetos que realizan la prueba con los sujetos de control.
- b) Evaluaciones subjetivas de la piel/pelaje: expertos cualificados evalúan subjetivamente el estado de la piel y el pelaje valorando la caída del pelo, la caspa, el brillo, la uniformidad, la suavidad y la densidad.
- c) Valoración funcional de la piel: la función de barrera de la piel se puede valorar limpiando la superficie de la piel con una gasa humedecida con acetona. Esta técnica desestabiliza de forma eficaz la barrera de la piel al eliminar las capas monocelulares y las fracciones lipídicas asociadas de la capa córnea de la epidermis. La desestabilización de la barrera se cuantifica midiendo el aumento en la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) y el grado de enrojecimiento del sitio dañado utilizando métodos conocidos por el experto en la técnica. Las puntuaciones de enrojecimiento (eritema) se obtienen utilizando el sistema de cámara e iluminación descrito anteriormente. Las lecturas TEWL y las puntuaciones de enrojecimiento se obtienen inmediatamente antes y después de la desestabilización, y en criterios de evaluación de 5 y 24 horas para evaluar las propiedades protectoras y de curación de la piel.

El tratamiento o prevención de la infección gastrointestinal, incluida la diarrea, en los animales de compañía se puede medir utilizando puntuaciones para las deposiciones. Según la presente invención, las puntuaciones para las deposiciones se pueden registrar diariamente según las siguientes directrices y comparar los grupos de control y de prueba antes y después de la ingestión con las bacterias.

Puntuación: 5 Extremadamente seca

Esta deposición es dura y no se adhiere a las superficies. La deposición rodará si se empuja. No se produce ninguna indentación al recoger la deposición. La deposición a menudo se defeca en grupos de deposiciones individuales en lugar de en una sola unidad. La deposición mantiene su forma original después de ser recogida.

Puntuación: 4 Firme (deposición ideal)

Esta deposición es firme, bien definida y cilíndrica. Esta deposición no se parte fácilmente al recogerla. Esta deposición puede dejar residuos en superficies y guantes. Esta deposición a menudo se defeca como una unidad. La deposición mantiene su forma original después de ser recogida.

Puntuación: 3 Blanda y definida

Esta deposición es blanda, sin embargo, tiene formas definidas. Esta deposición se partirá fácilmente y, sin duda alguna, dejará residuos en superficies y guantes. La deposición a menudo pierde su forma original después de ser

recogida. Esta deposición a menudo está presente con otra puntuación pero puede comprender toda la muestra de la deposición.

Puntuación: 2 Blanda, sin forma

5 Esta deposición es blanda y no tendrá una forma cilíndrica. La forma a menudo asociada con un “2” es una forma de “boñiga de vaca”. Esta deposición perderá su forma original al ser recogida y dejará, sin duda alguna, residuo en las superficies y los guantes. La puntuación de esta deposición a menudo está presente con otra puntuación pero puede comprender toda la muestra de la deposición. Esta muestra de la deposición se puede extender sobre un área de
10 varios centímetros.

Puntuación: 1 Líquida

15 La deposición con esta puntuación siempre parecerá líquida y puede que haya o no presente materia en forma de partículas. Esta deposición a menudo se defecará en grupos de pilas en lugar de en una unidad completa. En esta muestra de la deposición a menudo hay mucosidades presentes. Esta muestra de la deposición es muy difícil de recoger y siempre quedan residuos en las superficies y en los guantes. Esta muestra de la deposición se puede extender sobre un área de varios centímetros.

20 Además, también se registran otras observaciones, entre las que se incluyen: sangre en la deposición; objetos extraños en la deposición; o mucosidades en la deposición.

25 Además, el tratamiento de la infección gastrointestinal en los animales de compañía puede comprender la mejora de la ecología microbiana de los animales de compañía. La mejora de la ecología microbiana de los animales de compañía preferiblemente comprende la reducción de los niveles de bacterias patógenas en las heces de los animales de compañía. Los niveles de bacterias patógenas presentes en las heces de los animales de compañía se pueden enumerar utilizando la técnica de recuento de colonias estándar conocida por el experto en la técnica. Más preferiblemente, las bacterias patógenas se seleccionan del grupo que consiste en *clostridia*, *escherichia*, *salmonela*, bacteroides y mezclas de los mismos. Entre los ejemplos no limitativos de cepas adecuadas de bacterias patógenas se incluyen *C. perfringens*, *C. difficile*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y mezclas de las mismas.
30

35 El método de uso de las bacterias de la presente invención también puede incluir el tratamiento, bien profiláctico o bien terapéutico del tracto urinario de los mamíferos, preferiblemente de los animales de compañía. Ejemplos no limitativos de tratamiento del tracto urinario incluyen el tratamiento o prevención de infecciones del tracto urinario, el tratamiento o prevención de enfermedades renales, incluyendo piedras en el riñón, el tratamiento o prevención de infecciones en la vejiga y similares. Sin pretender imponer ninguna teoría, se considera que las bacterias *Bifidobacteria* de la presente invención son útiles en la prevención de estas dolencias como resultado de su capacidad de degradar el ácido oxálico, como se demuestra *in vitro*. El ácido oxálico es un subproducto del metabolismo urinario que puede formar precipitados insolubles que producen infecciones en el riñón, la vejiga y en otros lugares del tracto urinario. Al degradar el ácido oxálico y, por consiguiente, prevenir potencialmente su precipitación y acumulación en el tracto urinario, las bacterias de la presente invención pueden tratar y prevenir infecciones y otras dolencias del tracto urinario. La degradación del ácido oxálico se puede medir *in vitro* utilizando el kit de pruebas de ácido oxálico, n.º 755699 comercializado por Boehringer Mannheim/R-Biopharm.
40

45 Las *Bifidobacteria pseudolongum* de la presente invención se pueden utilizar en un método para mejorar o mantener la salud de los animales de compañía y comprenden la mejora de la digestión de las fibras. La mejora de la digestión de las fibras es deseable ya que estimula el crecimiento de dichas bacterias probióticas, además de la microflora endógena beneficiosa, que contribuye a la supresión de algunas bacterias potencialmente patógenas. Además, se ha documentado en los seres humanos una disminución en la cantidad de metabolitos tóxicos y enzimas perjudiciales que son el resultado de la fermentación colónica (Tomomatsu, H. “Health effects of oligosaccharides”, (1994) *Food Technol*, **48**, págs. 61-65). La digestión de las fibras se puede determinar utilizando el método descrito en Vickers y col. (2001), “Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fiber substrates by canine colonic microflora”, *Am. J. Vet. Res.* **61** (4), págs. 609-615, con la excepción de que en lugar de inocular utilizando muestras fecales diluidas, cada experimento utilizó cultivos puros de las cepas bacterianas de interés.
50

55 Preferiblemente, los métodos de la presente invención comprenden la administración de *Bifidobacteria* seleccionadas de la especie que comprenden *Bifidobacteria longum*, *Bifidobacteria pseudolongum*, *Bifidobacteria infantis* o *Bifidobacteria globosum*.

Ejemplos no limitativos de *Bifidobacteria* probióticas obtenidas mediante aislamiento del tracto gastrointestinal de mamíferos extirpado y lavado útiles en la presente invención se describen con más detalle en WO 00/42168 y WO 03/010297.

5 En WO 00/42168 se describen las *Bifidobacteria* probióticas aisladas de un tracto gastrointestinal humano extirpado y lavado. Estas bacterias se depositan en la NCIMB bajo los números de depósito 41050, 41051, 41052, 41053, 41099 y 41100.

10 En WO 03/010297 se describe otro ejemplo de *Bifidobacteria* probióticas aisladas de un tracto gastrointestinal humano extirpado y lavado. Esta bacteria se deposita en la NCIMB bajo el número de depósito 41003.

15 Otros ejemplos incluyen cepas de *Bifidobacteria globosum* obtenidos mediante aislamiento del tracto gastrointestinal canino extirpado y lavado que tienen una actividad probiótica en los animales. Se ha descubierto que las cepas de *Bifidobacteria* obtenidas mediante el aislamiento directamente del tracto gastrointestinal extirpado y lavado de mamíferos se adhieren al tracto gastrointestinal tras la alimentación de células bacterianas viables, y también son significativamente inmunomoduladoras cuando se suministran a animales en forma viable, no viable o fraccionada. Sin pretender imponer ninguna teoría, se considera que las *Bifidobacteria* obtenidas mediante el aislamiento del tracto gastrointestinal extirpado y lavado se asocian estrechamente con los tejidos mucosos del intestino. Sin pretender imponer además ninguna teoría, se cree que esto hace que las *Bifidobacteria* probióticas generen respuestas alternativas al huésped que dan como resultado su acción probiótica. Se ha descubierto que las bacterias probióticas obtenidas mediante el aislamiento del tracto gastrointestinal extirpado y lavado pueden modular el sistema inmunológico del huésped a través de la interacción directa del epitelio mucoso, y las células del sistema inmunitario del huésped. Esta inmunomodulación, junto con el mecanismo tradicional de acción asociado con las bacterias probióticas, es decir, la prevención de adherencia patógena al intestino mediante la oclusión y competición en busca de nutrientes, hace que las *Bifidobacteria* sean muy eficaces como microorganismos probióticos.

25 Las *Bifidobacteria* útiles en la presente invención, obtenidas mediante el aislamiento del tracto gastrointestinal extirpado y lavado de los mamíferos tienen una actividad antimicrobiana *in vitro* ante una serie de especies/cepas bacterianas patógenas. Sin pretender imponer ninguna teoría, se considera que esta actividad antimicrobiana *in vitro* es indicativa de una actividad probiótica *in vivo* potencial en animales, preferiblemente en animales de compañía como perros y gatos. Las bacterias de ácido láctico de la presente invención preferiblemente tienen actividad antimicrobiana *in vitro* ante *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* o *Escherichia coli*, más preferiblemente una mezcla de estas cepas, más preferiblemente aún, todas estas cepas.

35 Sin pretender imponer ninguna teoría, se considera que la actividad antimicrobiana de las bacterias *Bifidobacteria* pueden ser el resultado de una serie de acciones diferentes de las bacterias *Bifidobacteria*. Se ha sugerido previamente en la técnica que varias cepas de bacterias aisladas de las muestras fecales ejercen su efecto probiótico en el tracto gastrointestinal tras la ingestión oral al evitar la adherencia de microorganismos patógenos a la mucosa intestinal por oclusión. Esto requiere la ingestión oral de células bacterianas "vivas" o viables para que se pueda establecer una colonia de bacterias en el intestino. Sin embargo, se cree que las *Bifidobacteria* útiles en la presente invención, obtenidas mediante el aislamiento del tracto gastrointestinal extirpado y lavado de los mamíferos, aunque ejercen un determinado efecto probiótico debido a la oclusión si se proporciona de una forma viable, pueden suministrar un efecto probiótico sustancial en forma viable o no viable debido a la producción durante la fermentación *in vitro* de una sustancia o sustancias que o bien inhiben el crecimiento de los microorganismos patógenos o los destruyen, y/o alteran la capacidad inmune del animal huésped. Esta forma de actividad probiótica es deseable, ya que las bacterias de la presente invención se pueden ofrecer como cultivos viables o no viables o productos de fermentación purificada y seguir proporcionando un efecto terapéutico benéfico al animal huésped.

50 Preferiblemente, las bacterias *Bifidobacteria* pueden mantener la viabilidad tras el tránsito por el tracto gastrointestinal. Esto es deseable para que los cultivos vivos de las bacterias se tomen oralmente, y para que se produzca la colonización en los intestinos y las tripas tras el tránsito por el esófago y el estómago. La colonización de los intestinos y las tripas por las bacterias de ácido láctico de la presente invención es deseable para que se proporcionen los beneficios probióticos al huésped. La dosificación oral de células no viables o purificadas aisladas de la misma induce beneficios temporales, pero puesto que las bacterias no son viables, no pueden crecer, y proporcionan continuamente un efecto probiótico *in situ*. Por consiguiente, esto puede requerir que se dosifique al huésped regularmente para mantener los beneficios para la salud. En contraste, las células viables que pueden sobrevivir al tránsito gástrico en forma viable y, posteriormente, colonizar adhiriéndose y proliferando en la mucosa del intestino pueden proporcionar efectos probióticos continuamente *in situ*.

60 Por lo tanto, es preferible que las bacterias de ácido láctico de la presente invención mantengan la viabilidad después de la suspensión en un medio que tenga un pH de 2,5 durante 1 hora. El término "mantener la viabilidad", tal y como se

utiliza en la presente memoria, significa que al menos 25% de las bacterias suspendidas inicialmente en el medio de prueba son viables utilizando la técnica de recuento de colonias conocida por el experto en la técnica. Preferiblemente, "mantener la viabilidad" significa que al menos 50% de las bacterias suspendidas inicialmente son viables. Es deseable para las bacterias de ácido láctico de la presente invención que mantengan la viabilidad tras la exposición a un pH bajo ya que esto imita la exposición a los jugos gástricos en el estómago y la parte superior del intestino *in vivo* tras la ingestión oral en los animales de compañía.

Además, es preferible que las bacterias de ácido láctico de la presente invención tengan un crecimiento de al menos 33% cuando se encuentren en presencia de al menos 0,5% de sales biliares porcinas. El término crecimiento, tal y como se utiliza en la presente memoria, se describe con más detalle en el Ejemplo 3. Es más preferible que las bacterias de la presente invención tengan un crecimiento de al menos 33% cuando se encuentren en presencia de al menos 1% de sales biliares porcinas. Sin pretender imponer ninguna teoría se considera que las bacterias de ácido láctico de la presente invención, capaces de mantener la viabilidad en presencia de al menos 0,5% de sales biliares porcinas, pueden sobrevivir a las condiciones presentes en el intestino. Se cree que esto es el resultado de la adición de bilis porcina al medio de cultivo simulando las condiciones del intestino.

Además, es preferible que las bacterias *Bifidobacteria* útiles en la presente invención tengan una adhesión significativa a las células epiteliales del intestino *in vitro*. El término "adhesión significativa", tal y como se utiliza en la presente memoria, significa que al menos 4% del número total de bacterias de ácido láctico coincubadas con las células epiteliales *in vitro* se adhieren a las células epiteliales. Más preferiblemente, al menos 6% de las células bacterianas coincubadas se adhieren a las células epiteliales *in vitro*. Sin pretender imponer ninguna teoría, se considera que la adherencia de las células epiteliales del intestino *in vitro* es indicativa de la capacidad de las bacterias del ácido láctico de colonizar el tracto gastrointestinal de un animal *in vivo*.

La secuencia polinucleótica intergénica 16s-23s es conocida por el experto en la técnica como la secuencia de ADN en el genoma bacteriano que se puede utilizar para identificar las especies y cepas de bacterias. Esta secuencia polinucleótica intergénica se puede determinar mediante el método que se detalla a continuación.

Las colonias de *Bifidobacteria globosum* se seleccionaron de una placa de agar y se volvieron a suspender en un tampón IX PCR, calentado a 96 °C durante 5 minutos, congelado a -70 °C durante 5-10 minutos, descongelado y se añadió una parte alícuota a un tubo para PCR de Eppendorf. El PCR se llevó a cabo utilizando los imprimadores de espaciador intergénico (IGS), IGS L: 5'-GCTGGATCACCTCCTTTC-3' y IGS R: 5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3'. Las condiciones de ciclado fueron de 96 °C para 1 min (1 ciclo), 94 °C para 30 segundos, 53 °C para 30 segundos, 72 °C para 30 segundos (28 ciclos). La reacción de la PCR contenía 5 µl de ADN, tampón PCR (Bioline, Reino Unido), 0,2 mM dNTPs (Roche, Reino Unido), imprimador de 0,4 µM IGS L y R (150 ng/50 µl) (MWG Biotech, Alemania) y *Taq* polimerasa de Bioline (0,6 unidades). Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo en un termociclador Hybaid. Los productos de la PCR (8 µl) se ejecutaron junto a un marcador de peso molecular (ΦX174 *Hae III*, Promega) en un 2% de gel teñido con bromuro de etidio de agarosa en TAE, para determinar su perfil IGS. Utilizando los mismos imprimadores anteriores, el ADN del espaciador intergénico (IGS) se secuenció para las 2 cepas caninas de *Bifidobacteria globosum* utilizando métodos conocidos por el experto en la técnica.

Tras la secuenciación, las secuencias obtenidas para las cuatro cepas depositadas se compararon con la base de datos de secuencias en línea "BLAST", disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> para su homología con otras secuencias 16s-23s bacterianas depositadas. La correspondencia más cercana para AHCF fue *Bifidobacteria pseudolongum* ATCC 25526, con unas puntuaciones de homología de un 92%. *Bifidobacteria pseudolongum* ATCC25865 fue la correspondencia más cercana para AHC 7, con unas puntuaciones de homología de un 92%. Sin embargo, existen distintas diferencias entre estas cepas y entre unas y otras.

En una realización preferida de la presente invención, la cepa de *Bifidobacteria globosum* tiene una secuencia polinucleótica 16s-23s según SEC. ID n.º 1. Más preferiblemente aún, la cepa de bacterias de ácido láctico según la presente invención es la cepa de *Bifidobacteria globosum* NCIMB 41198 (AHCF) o una mutante de la misma.

En otra realización preferida de la presente invención, la cepa de *Bifidobacteria pseudolongum*, tiene una secuencia polinucleótica 16s-23s según SEC. ID n.º 2. Más preferiblemente aún, la cepa de bacterias de ácido láctico según la presente invención es la cepa *Bifidobacteria pseudolongum* NCIMB 41199 (AHC7) o una mutante de la misma.

El método de uso de las bacterias *Bifidobacteria* de la presente invención de forma típica implica la ingestión oral por parte del animal. La ingestión oral puede ocurrir como parte de la ingestión alimentaria habitual o como un suplemento de la

misma. La ingestión oral de forma típica se produce al menos una vez al mes, preferiblemente al menos una vez a la semana, más preferiblemente al menos una vez al día. Las *Bifidobacteria* se pueden dar al animal de compañía en una cantidad terapéuticamente eficaz para mantener o mejorar la salud del animal, preferiblemente un animal de compañía. El término "cantidad terapéuticamente efectiva", tal y como se utiliza en la presente memoria, en referencia a las bacterias de ácido láctico, significa aquella cantidad de bacterias suficiente para proporcionar el efecto deseado o beneficiar a un animal huésped que necesite un tratamiento, sin embargo, lo suficientemente baja para evitar efectos adversos como toxicidad, irritación, o una respuesta alérgica, proporcionada con una relación de beneficio/riesgo razonable cuando se utiliza en el modo de la presente invención. La "cantidad terapéutica efectiva" específica variará en función de factores como la condición particular que se está tratando, la condición física del usuario, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hay), la forma de dosificación específica que se utilizará, el vehículo empleado, la solubilidad de la forma de la dosis y el régimen de dosificación particular.

Preferiblemente, las bacterias de ácido láctico se dan a los animales de compañía a una dosis de $1,0E+04$ a $1,0E+14$ UFC por día, más preferiblemente de $1,0E+06$ a $1,0E+12$ UFC por día. La composición preferiblemente puede contener al menos 0,001% de $1,0E+04$ a $1,0E+12$ UFC/g de las *Bifidobacteria* obtenidas mediante el aislamiento del tracto gastrointestinal extirpado y lavado de los mamíferos. Las bacterias *Bifidobacteria* se pueden dar al animal o bien de forma viable, o como células destruidas, o destilados, aislados u otras fracciones de los productos de la fermentación de las bacterias de ácido láctico de la presente invención, o cualquier mezcla de las mismas.

Preferiblemente, las bacterias *Bifidobacteria*, o una fracción purificada o aislada de las mismas, se utilizan para preparar una composición destinada a mantener o mejorar la salud de un animal. Como se ha indicado anteriormente, la composición puede formar parte de la ingestión alimentaria habitual, o un suplemento. Cuando la composición comprende parte de la ingestión alimentaria habitual, la composición puede estar en forma de un alimento animal desecado como galletas o croquetas, un alimento en grano procesado, un alimento animal húmedo, yogures, salsas, dulces, golosinas y similares.

Dichas composiciones pueden comprender otros componentes. Otros componentes son ventajosos para ser incluidos como composiciones usadas en la presente invención, pero son opcionales para los propósitos de la presente invención. Por ejemplo, las composiciones alimenticias son preferiblemente equilibradas nutricionalmente. En una realización, las composiciones alimenticias pueden comprender, calculadas con respecto a la sustancia seca, de 20% a 50% de proteína en bruto, preferiblemente de 22% a 40% de proteína en bruto, en peso de la composición alimenticia. El material de la proteína en bruto puede comprender cualquier material que tenga un contenido en proteínas de, al menos, 15% en peso, ejemplos no limitativos del cual incluyen proteínas vegetales como la soja, la semilla del algodón y los cacahuets, proteínas animales como la caseína, la albúmina y el tejido cárnico. Entre los ejemplos no limitativos de tejido cárnico útiles en la presente invención se incluye la carne fresca y los granos molidos gruesos secos o procesados como grano molido grueso de pescado, grano molido grueso de aves de corral, grano molido grueso de carne, grano molido grueso de huesos y similares. Otros tipos de fuentes de proteínas en bruto adecuadas incluyen gluten de trigo o gluten de maíz y proteínas extraídas de fuentes microbianas como la levadura.

Además, las composiciones alimenticias pueden comprender, calculadas con respecto a la sustancia seca, de 5% a 35% de grasa, preferiblemente de 10% a 30% de grasa, en peso de la composición alimenticia. Además, las composiciones alimenticias que comprenden las bacterias de ácido láctico de la presente invención también pueden comprender de 4% a 25% de la fibra alimentaria total. Las composiciones también pueden comprender una fuente de almidón múltiple como se describe en WO99/51108.

Las composiciones de la presente invención pueden también comprender una fuente de carbohidrato. Granos o cereales tales como el arroz, el maíz, el milo, el sorgo, la cebada, la alfalfa, el trigo, y similares son fuentes ilustrativas. Además, las composiciones pueden también contener otros materiales diferentes tales como suero desecado y otros subproductos lácteos.

Las composiciones que comprenden las bacterias de la presente invención también pueden comprender un prebiótico. El término "prebiótico" incluye sustancias o compuestos que son fermentados por la flora intestinal del animal doméstico y, por lo tanto, estimulan el crecimiento o desarrollo de las bacterias de ácido láctico en el tracto gastrointestinal del animal doméstico a expensas de las bacterias patógenas. El resultado de esta fermentación es una liberación de ácidos grasos, en especial ácidos grasos de cadena corta en el colon. Esto tiene el efecto de reducir el valor del pH en el colon. Entre los ejemplos no limitativos de prebióticos adecuados se incluyen los oligosacáridos, como la inulina y sus productos de hidrólisis comúnmente conocidos como fructooligosacáridos, galacto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos u oligo derivados del almidón. Los prebióticos pueden ser suministrados en cualquier forma que sea adecuada. Por ejemplo, el prebiótico puede ser suministrado en forma de material vegetal que contiene la fibra. Entre los materiales vegetales adecuados se incluyen los espárragos, las alcachofas, las cebollas, el trigo o las achicorías, o residuos de

5 estos materiales vegetales. De forma alternativa, la fibra prebiótica se puede suministrar como un extracto de inulina, por ejemplo los extractos de achicoria son adecuados. Los extractos de inulina adecuados se pueden obtener a través de Orafit SA de Tirlemont 3300, Bélgica bajo el nombre comercial "Raftiline". Por ejemplo, la inulina se puede suministrar en forma de Raftiline (g) ST que es un polvo blanco fino que contiene entre 90% y 94% en peso de inulina, hasta aproximadamente 4% en peso de glucosa y fructosa, y entre 4% y 9% en peso de sacarosa. De forma alternativa, la fibra puede estar en forma de un fructooligosacárido como el que se obtiene de Orafit SA de Tirlemont 3300, Bélgica bajo la marca comercial "Raftilose". Por ejemplo, la inulina puede ser suministrada en forma de Raftilose (g) P95. Por otra parte, los fructooligosacáridos se pueden obtener hidrolizando la inulina, mediante métodos enzimáticos o utilizando microorganismos.

10 Para los alimentos desecados para animales domésticos, un proceso adecuado es la cocción por extrusión, aunque se puede utilizar el horneado y otros procesos adecuados. Cuando se cocinan por extrusión, los alimentos desecados para animales domésticos normalmente se suministran en forma de croquetas. Si se utiliza un prebiótico, el prebiótico se puede administrar con los otros ingredientes del alimento desecado para animales domésticos antes de llevar a cabo el procesamiento. Un proceso adecuado se describe en la solicitud de patente europea N.º 0850569. Si se utiliza un microorganismo probiótico, es mejor que el microorganismo recubra o llene el alimento desecado para animales domésticos. Un proceso adecuado se describe en el número de publicación de la patente europea EP-0 862 863.

20 Para los alimentos húmedos, se pueden utilizar los procesos descritos en US-4.781.939 y US-5.132.137 para producir productos de carne simulada. También se pueden utilizar otros procedimientos para producir productos troceados; por ejemplo la cocción en un horno de vapor. De forma alternativa, los productos en barra se pueden producir emulsionando un material cárnico adecuado para producir una emulsión de carne, añadir un agente gelificante adecuado, y calentar la emulsión de carne antes de ponerla en latas u otros recipientes. Las composiciones alimenticias húmedas típicas pueden comprender de 5% a 15% de proteínas, de 1% a 10% de grasas y de 1% a 7% de fibra. Entre los ingredientes no limitativos que se pueden utilizar en las composiciones alimenticias húmedas se incluyen el pollo, pavo, ternera, pescado blanco, caldo de pollo, caldo de pavo, caldo de ternera, hígado de pollo, arroz para la elaboración de cerveza, sémola de maíz, grano molido grueso de pescado, huevo, pulpa de remolacha, cloruro, grano molido grueso de lino, cordero, subproductos de la ternera, subproductos del pollo y mezclas de los mismos.

35 En otra realización, las composiciones suplementarias como galletas, dulces, y otras golosinas pueden comprender, calculadas con respecto a la sustancia seca, de 20% a 60 % de proteínas, o de 22% a 40% de proteínas, en peso de la composición suplementaria. En otro ejemplo, las composiciones suplementarias pueden comprender, calculadas con respecto a la sustancia seca, de 5% a 35% de grasa, o de 10% a 30% de grasa, en peso de la composición suplementaria. Los alimentos y las composiciones suplementarias previstas para ser utilizadas en perros y gatos se conocen comúnmente en la técnica.

40 Los alimentos para animales domésticos pueden contener otros principios activos como ácidos grasos de cadena larga y cinc. Entre los ácidos grasos de cadena larga adecuados se incluye el ácido alfa-linoleico, el ácido gamma linoléico, el ácido linoleico, el ácido eicosapentanoico y el ácido docosahexanoico. Los aceites de pescado son una fuente adecuada de ácidos eicosapentanoicos y ácido docosahexanoico.

45 El aceite de borraja, el aceite de semilla de grosella negra y el aceite de onagra son fuentes adecuadas de ácido gamma linoléico. Los aceites de cártamo, los aceites de girasol, los aceites de maíz y los aceites de semilla de soja son fuentes adecuadas de ácido linoleico. Estos aceites también se pueden utilizar en los sustratos de recubrimiento a los que se ha hecho referencia anteriormente. El cinc puede ser suministrado en varias formas adecuadas, por ejemplo como sulfato de cinc u óxido de cinc. Además, muchos ingredientes que se utilizan comúnmente en los alimentos para animales domésticos son fuentes de ácidos grasos y cinc. Se ha observado que la combinación de achicoria, como una fuente de prebióticos, con un aceite rico en ácido linoleico, como el aceite de semilla de soja, proporciona beneficios inesperados, que sugieren un efecto sinérgico.

55 En los casos en los que la composición es en forma de salsa de carne, la composición preferiblemente comprende al menos 10% de caldo o consomé, incluyendo ejemplos no limitativos del mismo consomé de verduras de carne de vaca, pollo o jamón. Las composiciones de salsa de carne típicas pueden comprender de 0,5% a 5% de proteína en bruto, de 2% a 5% de grasa en bruto, y de 1% a 5% de fibra.

60 Otros ejemplos no limitativos de suplementos adecuados para su uso en la presente invención incluyen polvos, suspensiones en aceite, quesos en suspensiones con una base de leche, y pastillas o cápsulas. Cuando la composición es en forma de una pastilla, se requieren agentes aglutinantes adecuados para mantener la pastilla en una forma sólida y comprimida. Entre los ejemplos no limitativos de agentes aglutinantes adecuados se incluyen las gomas naturales como la

- 5 goma xantano, pectinas, lecitinas, alginatos y otros conocidos por el experto en la técnica. Cuando la composición es en forma de una cápsula, la composición preferiblemente está encapsulada utilizando tecnologías conocidas por el experto en la técnica. Entre los ejemplos no limitativos de materiales de encapsulación adecuados se incluye el poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), alginatos y gelatina. Las composiciones con una base de yogur pueden comprender de 1% a 5% de proteínas, de 10% a 20% de carbohidratos, de 1% a 5% de fibra, de 1% a 5% de grasa y de 50% a 90% de un vehículo líquido como la leche.

Ejemplos

- 10 Los Ejemplos 1 a 4 son ejemplos de composiciones de croquetas desecadas que comprenden el probiótico *Bifidobacteria globosum* utilizado según la presente invención.

| Ingrediente | Porcentaje sobre un gramaje | | | |
|--|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | Ej. 1 | Ej. 2 | Ej. 3 | Ej. 4 |
| Granos de cereal | Hasta el 100 | Hasta el 100 | Hasta el 100 | Hasta el 100 |
| Subproducto de grano molido grueso de pollo | 43,5 | 40 | 45 | 35 |
| Grasa de aves de corral | 1,28 | 1,02 | 1,16 | 1,35 |
| Producto de huevo | 2,4 | 2,1 | 2,5 | 2,2 |
| Grano molido grueso de hígado de pollo | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Levadura de cerveza desecada | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Fosfato monosódico | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Carbonato de calcio | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| Cloruro potásico | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 |
| Vitaminas | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| Cloruro de colina | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Minerales | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| DL-Metionina | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Cloruro sódico | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 |
| Probiótico (1 x 10 ¹⁰ ufc/g NCIMB 41198 en aceite de girasol) | 1 | 0,5 | - | 0,6 |
| Probiótico (1 x 10 ¹⁰ ufc/g NCIMB 41199 en aceite de girasol) | - | 0,5 | 1 | 0,4 |

- 15 Los ejemplos 5 a 7 son ejemplos de composiciones alimenticias húmedas para animales domésticos que comprenden el probiótico *Bifidobacteria globosum* utilizado según la presente invención.

| Ingrediente | Porcentaje sobre un gramaje | | |
|--------------------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|
| | Ej. 5 | Ej. 6 | Ej. 7 |
| Agua | Hasta el 38 | Hasta el 47 | Hasta el 50 |
| Hígado de aves de corral | Hasta el 25 | Hasta el 20 | Hasta el 15 |
| Productos de aves de corral | 25 | 20 | 20 |
| Arroz para la elaboración de cerveza | 5 | 7 | 10 |
| Producto de huevo | 3 | 2,5 | 1,5 |
| Grasa de aves de corral | 2,9 | 3,0 | 3,2 |

| | | | |
|------------------------------------|------|-----|-----|
| Consomé de pollo | 0,6 | 0,7 | 0,9 |
| Taurina | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Vitaminas | 0,05 | 0,1 | 0,1 |
| Minerales | 0,05 | 0,1 | 0,1 |
| Probiótico NCIMB41003 (1E10 UFC/g) | 4 | 5 | 6 |

Los Ejemplos 8 a 10 son ejemplos de composiciones suplementarias de yogurt que comprenden el probiótico *Bifidobacteria globosum* utilizado según la presente invención.

| Ingrediente | Porcentaje sobre un gramaje | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|-------|--------|
| | Ej. 8 | Ej. 9 | Ej. 10 |
| Cantidad (porcentaje) | 82,75 | 81,9 | 82,7 |
| Azúcar | 12 | 12 | 10 |
| Almidón modificado | 1,0 | 0,8 | 0,8 |
| Prebiótico | 0,25 | 0,3 | 0,5 |
| Probiótico NCIMB 41052 (1E10 UFC/g) | 4 | 5 | 6 |

- 5 Todos los documentos citados en la descripción detallada de la invención han sido, en su parte relevante, incorporados como referencia en la presente memoria; la mención de cualquier documento no debe considerarse como una aceptación de que forma parte del estado de la técnica con respecto a la presente invención.
- 10 Aunque se han ilustrado y descrito realizaciones determinadas de la presente invención, resulta obvio para el experto en la materia que es posible realizar diferentes cambios y modificaciones sin abandonar por ello el ámbito de la invención. Por consiguiente, las reivindicaciones siguientes pretenden cubrir todos esos cambios y modificaciones contemplados dentro del ámbito de la presente invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The IAMS Company
 Alimentary Health Ltd
 Boileau, Thomas
 Ceddia, Michael
 Davenport, Gary
 Kiely, Barry
 O'Mahony, Liam
 Sunvold, Greg
 Tetrick, Mark
 Vickers, Robert

<120> Métodos de uso de bifidobacteria probiótica para animales de compañía

<130> P151&

<140> No concedida todavía

<141> 2004-12-15

<150> 60/531,597

<151> 2003-12-19

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 556

<212> ADN

<213> Bifidobacteria globosum

<220>

<221> característica_var

<222> (460)..(460)

<223> n i s c , g , a o r t .

<220>

<221> característica_var

<222> (549)..(549)

<223> n i s c , g , a o r t .

<400> 1

| | |
|--|-----|
| acgattttgtg ggcgcacggt ggtgcgccga tatggggatg cttccttttc ctggccgtct | 60 |
| ggccgggtgg cgtcccttgc tggctgggaa aagggtaag ggcctgcgc ccgttgtggt | 120 |
| gtgggtggtg gtggtgtggt gcatgctgtt gggttcccgg accgccaggc cccttgtcgg | 180 |
| gggtggtgtt ccgttcccgc cgtcctggcc gtgccctgt gtgggggtggg tgcctgggg | 240 |
| ggtgtggtgt ggtggtttga gaactggaga gtggacgca gcatgaacgg tgtgccctgt | 300 |
| gggtgtgcc ggtgtgttc gtactgttga ttttgtcgaa ccgttccatc cccgccttt | 360 |
| gggttggggg tgttgattg ttttcgcgag tgttttgta gagccgtcca cggcctgtg | 420 |
| ggtgtgggtg gtgttttagat gatctgatta gttgtcgtan ggtgttccag tgcaagtggc | 480 |
| atgggccctg ggcccccttt tgcgggggtg gtgggtttgt tgccatgggc gtatggtgga | 540 |
| atgcctgtnc accacg | 556 |

<210> 2

<211> 526

ES 2 368 333 T3

<212> ADN
 <213> Bifidobacteria pseudolongum

<220>
 <221> característica_var
 <222> (494)..(494)
 <223> n is a, t, g or c

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

<220>
 <221> característica_var
 <222> (518)..(518)
 <223> n is a, t, g or c

<400> 2
 tggggcacgg tagtgcccga tatgggatgc ttcctttcct ggccgtgtgg ccgggtggtg 60
 tcccttgctg gctggaaaaa ggtcaaggcg cctgcgccct tgtggtgtgg gtggacagtg 120
 gtgtggtgca tgctgttggg ttcccggacc gccaggcccc ttgtcggggg tgggtgtccg 180
 ttcccgccgt cctggccgtg ccccttgtgg ggtgggtgcc tgggggtggtg tgggtgtggtg 240
 gtttgagaac tggagagtgg acgcgagcat gaacggtgtg ccttttgggg tgtgccgggt 300
 gtgttcgtac tgttgatttt gtcgaaccgt tccgtgcccc ctttcgggt ggggtcgtgg 360
 attgtgttcg cgagtgtttt ggtaagcccc ccgcactgtt ggtgtgggtg gtgtttaaata 420
 gatctgatta attgtcgtaa ggtgttccag tgcaagtggc atgggcccgt ggcccccttt 480
 ttgcgggggt tggnggggtt tttccatggn cgtatggngg aatcct 526

<210> 3
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> artificial

<400> 3
 gctggatcac ctcctttc 18

<210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> artificial

<400> 4
 ctgggtccaa ggcaccca 18

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende una cepa probiótica de *Bifidobacteria* obtenida mediante aislamiento del tracto gastrointestinal de un mamífero extirpado y lavado para usar en el tratamiento de un animal de compañía seleccionado del grupo que consiste en perros y gatos, siendo el tratamiento seleccionado para regular el sistema inmunológico de un animal de compañía, mantener o mejorar la salud de la piel y/o el pelaje de un animal de compañía, mejorar o reducir los efectos del envejecimiento en animales de compañía, evitar la pérdida de peso durante y después de la infección en un animal de compañía, tratar o prevenir dolencias del tracto urinario en animales de compañía, aumentar la digestión de fibra en un animal de compañía, evitar o tratar la infección del tracto gastrointestinal de un animal de compañía, mejorar la digestión en animales de compañía, reducir los niveles de estrés en un animal de compañía, o mezclas de las mismas, en donde dichas *Bifidobacteria* probióticas se seleccionan del grupo que consiste en *Bifidobacteria pseudolongum* NCIMB 41199 y *Bifidobacteria globusum* NCIMB 41198 y mezclas de las mismas.
- 15 2. Composición según la reivindicación 1, en la que dicha cepa probiótica de *Bifidobacteria* se aísla del tejido gastrointestinal extirpado y lavado obtenido de seres humanos, perros o gatos.
- 20 3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que dichas *Bifidobacteria* probióticas se seleccionan por su capacidad de sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal de animales de compañía.
- 25 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dichas *Bifidobacteria* probióticas tienen al menos un crecimiento del 33% al cultivarse en presencia de 0,5% de sales biliares.
- 30 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dichas *Bifidobacteria* probióticas pueden mantener la viabilidad después de 1 hora a un pH de 2,5.
- 35 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para regular el sistema inmunológico de un animal de compañía, comprendiendo dicha regulación tratar o prevenir las enfermedades autoinmunitarias en un animal de compañía, tratar o prevenir la inflamación en un animal de compañía o mezclas de los mismos.
- 40 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para mantener o mejorar la salud de la piel y/o el pelaje de un animal de compañía, que comprende el tratamiento o prevención de las enfermedades atópicas de la piel en animales de compañía.
- 45 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para tratar o prevenir dolencias del tracto urinario en los animales de compañía, en la que dichas dolencias del tracto urinario comprenden la infección del tracto urinario, piedras en el riñón o mezclas de las mismas.
- 50 9. Composición según la reivindicación 8, en la que dichas *Bifidobacteria* probióticas aumentan la degradación de ácido oxálico in vitro.
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 5, para la prevención o tratamiento de la infección del tracto gastrointestinal, comprendiendo dicha prevención o tratamiento la mejora de la ecología microbiana de dicho animal de compañía, reduciendo el número de bacterias patógenas que se encuentran en las heces de dicho animal de compañía o mezclas de las mismas.
11. Composición según la reivindicación 10, en la que dichas bacterias patógenas se seleccionan del grupo que consiste en *Clostridia*, *Escherichia*, *Salmonella*, y mezclas de las mismas.
12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 5, para reducir los niveles de estrés en un animal de compañía, en la que dichos niveles de estrés se miden determinando el nivel en la sangre de dicho animal de compañía de hormonas de estrés seleccionadas del grupo que consiste en epinefrina, norepinefrina, dopamina, cortisol, proteína C reactiva y mezclas de las mismas.