

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 112**

51 Int. Cl.:  
**A61K 35/74** (2006.01)  
**A61K 35/38** (2006.01)  
**A23L 1/30** (2006.01)  
**A61P 13/12** (2006.01)  
**A61P 17/00** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04815182 .3**  
96 Fecha de presentación: **17.12.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1737477**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.01.2007**

54 Título: **Métodos de uso de Lactobacilli probióticos para animales de compañía**

30 Prioridad:  
**19.12.2003 US 531210 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.05.2012**

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/Representante:  
**Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 381 112 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 Lactobacilli probióticos para animales de compañía.

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al campo de los *Lactobacilli* probióticos, más específicamente a métodos de uso de *Lactobacilli* probióticos en animales de compañía.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Los mecanismos de defensa para proteger al tracto gastrointestinal (GI) de los mamíferos de la colonización por bacterias son extremadamente complejos. El tracto GI de la mayoría de los mamíferos es colonizado por microflora natural y por microorganismos patógenos invasivos. En un estado de salud, esta microflora en competencia está en un estado de equilibrio. La modificación del equilibrio de la microflora intestinal puede conducir a muchos trastornos GI, o bien prevenirlos, tanto en humanos como en otras especies de mamíferos, tales como animales de compañía, incluyendo 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.

15 La cantidad y la composición de la microflora intestinal tiende a ser estable, si bien la edad y la dieta la puede modificar. 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 afectan al equilibrio de la microflora intestinal y pueden producir inflamaciones y enfermedades autoinmunes.

20 Recientemente, se han empezado a realizar investigaciones para destacar algunas valiosas cepas de bacterias obtenidas mediante el aislamiento del tracto gastrointestinal diseccionado y lavado de mamíferos, como seres humanos y perros, y su potencial uso como agentes probióticos. Los probióticos son preparados de bacterias, viables o muertas, con constituyentes tales como proteínas o carbohidratos, o bien fracciones purificadas de fermentos bacterianos que estimulan la salud de los mamíferos preservando la microflora natural del tracto GI y reforzando los controles de enfermedades autoinmunes. Hay quienes creen que las bacterias probióticas son más eficaces si se obtienen de las especies que se pretenden tratar, o bien de especies estrechamente relacionadas con las mismas. 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.

SUMARIO DE LA INVENCION

35 La presente invención se refiere a una composición que comprende una cepa probiótica de Lactobacilli, en donde dichos Lactobacilli probióticos son de la especie *Lactobacillus murinus*; la cepa seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus murinus* NCIMB 41194 (AHC 1222), *Lactobacillus murinus* NCIMB 41195 (AHC 3133), *Lactobacillus murinus* NCIMB 41196 (AHC 5323), *Lactobacillus murinus* NCIMB 41197 (AHC 6331) que pueden obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal de mamífero diseccionado y lavado para usar en el tratamiento de un animal de compañía seleccionado de regulación del sistema inmunológico de un animal de compañía, comprendiendo dicha regulación tratar o prevenir la enfermedad autoinmune de un animal de compañía; tratar o prevenir la inflamación en un animal de compañía o mezclas de los mismos, mantener o mejorar la salud de la piel y/o sistema de recubrimiento de un animal de compañía, comprendiendo tratar o prevenir enfermedad atópica de la piel en animales de compañía; evitar la pérdida de peso durante y después de la infección en un animal de compañía, tratar o prevenir afecciones del tracto urinario en animales de compañía, evitar o tratar la infección del tracto gastrointestinal de un animal de compañía o mezclas de los mismos; en donde dicho animal de compañía se selecciona del grupo que consiste en caninos y felinos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIONSecuencias

50 SEC. n.º 1 –16s-23s secuencia de nucleótidos del espaciador intergénico de *Lactobacillus murinus* AHC 1222 (NCIMB 41194).

SEC. n.º 2 –16s-23s secuencia de nucleótidos del espaciador intergénico de *Lactobacillus murinus* AHC 3133 (NCIMB 41195).

SEC. n.º 3 –16s-23s secuencia de nucleótidos del espaciador intergénico de *Lactobacillus murinus* AHC 5323 (NCIMB 41196).

SEC. n.º 4 –16s-23s secuencia de nucleótidos del espaciador intergénico de *Lactobacillus murinus* AHC 6331 (NCIMB 41197).

SEC. n.º 5– Izquierda 16s-23s PCR secuencia de cebador para secuenciación.

SEC. n.º 6– Derecha 16s-23s PCR secuencia de cebador para secuenciación.

5 Números de depósito bacteriano

La tabla que se muestra a continuación describe las especies, el número de cepa y número de depósito para *Lactobacilli* probióticos que pueden obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal diseccionado y lavado de mamíferos. Las cepas bacterianas se han depositado en la NCIMB (National Collections of Industrial Food and Marine Bacteria), Aberdeen, Reino Unido.

Cepa	Número de depósito	Secuencia 16s-23s
<i>Lactobacillus murinus</i> AHC 1222	NCIMB 41194	SEC. n.º 1
<i>Lactobacillus murinus</i> AHC 3133	NCIMB 41195	SEC. n.º 2
<i>Lactobacillus murinus</i> AHC 5323	NCIMB 41196	SEC. n.º 3
<i>Lactobacillus murinus</i> AHC 6331	NCIMB 41197	SEC. n.º 4
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	NCIMB 40829	-
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC1	NCIMB 40830	-
<i>Lactobacillus salivarius</i> AH102	NCIMB 41044	-
<i>Lactobacillus salivarius</i> AH103	NCIMB 41045	-
<i>Lactobacillus salivarius</i> AH105	NCIMB 41047	-
<i>Lactobacillus salivarius</i> AH109	NCIMB 41093	-
<i>Lactobacillus salivarius</i> AH110	NCIMB 41094	-
<i>Lactobacillus casei</i> AH101	NCIMB 41043	-
<i>Lactobacillus casei</i> AH104	NCIMB 41046	-
<i>Lactobacillus casei</i> AH111	NCIMB 41095	-
<i>Lactobacillus casei</i> AH112	NCIMB 41096	-
<i>Lactobacillus casei</i> AH113	NCIMB 41097	-

10 Todos los pesos, medidas y concentraciones en la presente memoria se miden a 25 °C en la totalidad de la composición, 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.

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

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”.

20 En la siguiente descripción la abreviatura UFC (“unidades formadoras de colonias”) designa el número de células bacterianas obtenido por recuento microbiano sobre placas de agar, del modo generalmente entendido en la técnica.

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.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término “mutaciones de ADN” incluye mutaciones naturales o inducidas que comprenden, como mínimo, alteraciones únicas de base incluyendo supresiones, inserciones, transversiones, y otras modificaciones del ADN conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo modificaciones genéticas introducidas en un nucleótido precursor o secuencia de aminoácidos mientras se mantiene, como mínimo, un 50% de homología respecto a la secuencia precursora. Preferiblemente, la secuencia que comprende la mutación o mutaciones de ADN tiene, al menos, 60%, más preferiblemente, al menos, 75%, más preferiblemente aún 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/>.

Tal como se utiliza en la presente memoria, “modificación genética” incluye la introducción de secuencias de ADN exógenas y/o endógenas en el genoma de un organismo, sea por inserción en el genoma de dicho organismo, sea mediante vectores incluyendo ADN plásmido o bacteriófagos como los conocidos por los expertos en la técnica, teniendo dicha secuencia de ADN una longitud de, como mínimo, dos bases de ácido desoxirribonucleico.

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.

La cepa de bacterias lácticas del género *Lactobacillus murinus* que puede obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal canino diseccionado y lavado puede usarse para transmitir ventajas probióticas seleccionadas tras el consumo oral en animales, preferiblemente animales de compañía. Esta ventaja probiótica generalmente mantiene y mejora el estado de salud general del animal. Las ventajas para la salud obtenidas mediante el tratamiento de un animal de compañía se seleccionan de entre regular el sistema inmunológico de un animal de compañía, comprendiendo dicha regulación tratar o prevenir la enfermedad autoinmune en un animal de compañía; tratar o prevenir la inflamación en un animal de compañía o mezclas de los mismos, mantener o mejorar la salud de la piel y/o sistema de recubrimiento de un animal de compañía, comprendiendo tratar o prevenir la enfermedad atópica de la piel en animales de compañía; prevenir la pérdida de peso durante y después de una infección en un animal de compañía, tratar o prevenir las afecciones del tracto urinario en animales de compañía, prevenir o tratar la afección del tracto gastrointestinal de un animal de compañía o mezclas de los mismos.

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. Dichos métodos se describen brevemente en la presente memoria, pero son bien conocidos por el experto en la técnica.

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/estreptomina. Las células lavadas se vuelven a suspender en RPMI 1640, se cuentan y se ajusta la densidad celular apropiadamente. Las células  $2 \times 10^5$  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 un 5% de CO<sub>2</sub> con un 10% de suero fetal bovino (Sigma). A las 54 horas las células se pulsan con 1  $\mu\text{Ci}$  <sup>3</sup>H-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: según se describe en US-6.310.090, este ensayo mide la actividad efectora *in vitro* de las células asesinas naturales aisladas a partir de sangre entera fresca de animales de ensayo 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, Missouri, EE. UU.) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FCS), 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina. Tras la confluencia, las células diana se tripsinizaron, se lavaron 3 veces y se resuspendieron a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml en medio completo (RPMI-1640+10% FCS+100 U/ml de penicilina+100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina). Con una pipeta, se introdujeron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  de las células diana, por triplicado, sobre placas de 96 pocillos de fondo en U (Costar, Cambridge, Massachusetts) y se incubaron durante 8 horas para permitir la adherencia celular. A continuación se añadieron linfocitos (células efectoras; 100  $\mu\text{l}$ ) aisladas mediante separación Ficoll-Hypaque (según 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  $\mu\text{l}$  de un sustrato que contenía 5  $\mu\text{g}$  de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (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:

$$\text{Citotoxicidad específica (\%)} = 100 \times \{1 - [(\text{OD de células diana y células efectoras} \\ - \text{OD de células efectoras}) / (\text{OD de células diana})]\}$$

5 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.

15 4. Hipersensibilidad retardada: este es un método no invasivo, *in vivo*, de evaluación del 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.

Métodos adicionales para determinar el efecto de las bacterias *Lactobacilli* se describen en US-6.133.323 y US-6.310.090.

25 Además, usando absorptometría de rayos X o escáner (TC) para medir la composición del cuerpo, incluida la masa de grasa del cuerpo, puede usarse la masa exenta de grasa y el contenido mineral del hueso para determinar los cambios anatómicos como, por ejemplo, la pérdida de peso o densidad del hueso en sujetos después de una infección.

30 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 de 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.

35 b) Evaluaciones de la piel/pelaje subjetivas: los participantes en la evaluación, y que disponen de la formación adecuada, 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.

40 c) Valoración funcional de la piel: la función de barrera de la piel se puede evaluar limpiando la superficie de la piel con una gasa empapada en acetona. Esta técnica desestabiliza de forma eficaz la barrera de la piel al eliminar las capas monocelulares y las fracciones lípidas 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.

45 El tratamiento o prevención de la infección gastrointestinal, incluida la diarrea, en los animales de compañía se puede medir utilizando puntuaciones para las deposiciones. 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.

5 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.

10 Puntuación:2 Blanda, sin forma

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 varios centímetros.

15

Puntuación:1 Líquida

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, se registran otras observaciones, incluyendo: sangre en las heces; objetos extraños en las heces; o mucosa en las heces.

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 cuantificar 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*, *Salmonella*, bacteroides y mezclas de los mismos. Entre los ejemplos, no limitativos, de cepas adecuadas de bacterias patógenas, están: *C. perfringens*, *C. difficile*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y mezclas de las mismas.

30

El método de uso de las bacterias puede también incluir el tratamiento, ya sea profiláctico o terapéutico, del tracto urinario de los mamíferos, preferiblemente de 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 cree que las bacterias *Lactobacilli* son útiles para prevenir estas dolencias, como resultado de su capacidad de degradar el ácido oxálico, como se ha demostrado *in vitro*. El ácido oxálico es un subproducto del metabolismo urinario, y puede formar precipitados insolubles que producen infecciones en el riñón, en 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 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 de catálogo 755699 comercializado por Boehringer Mannheim/R-Biopharm.

35

40

45 Los métodos de la presente invención comprenden la administración de *Lactobacilli murinus*.

Ejemplos no limitativos de *Lactobacilli* probióticos que pueden obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal de mamíferos diseccionado y lavado se describen con más detalle en WO 98/35014, WO 03/010298 y WO 03/010299.

50

En WO 98/35014 se describen *Lactobacilli salivarius* probióticos aislados a partir de tracto gastrointestinal humano diseccionado y lavado. Estas bacterias se depositan en la NCIMB bajo los números de depósito 40829 y 40830.

En WO 03/010298 se describen ejemplos adicionales de *Lactobacilli salivarius* probióticos aislados a partir de tracto gastrointestinal humano diseccionado y lavado. Estas bacterias se depositan en la NCIMB con los números de depósito 41044, 41045, 41047, 41093 y 41094.

En WO 03/010299 se describen ejemplos adicionales de *Lactobacilli casei* probióticos aislados a partir de tracto gastrointestinal humano diseccionado y lavado. Estas bacterias se depositan en la NCIMB con los números de depósito 41043, 41046, 41095, 41096 y 41097.

5 Otros ejemplos incluyen cepas de *Lactobacilli* que pueden obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal canino diseccionado y lavado que tienen actividad probiótica en animales. Los probióticos son microorganismos viables o muertos, composiciones procesadas de microorganismos, sus constituyentes tales como proteínas o carbohidratos, o bien fracciones purificadas de fermentos bacterianos que influyen beneficiosamente en un anfitrión. Las bacterias probióticas se utilizan generalmente en forma de células viables. No obstante, esta utilización se puede ampliar a células no viables tales como los cultivos o composiciones muertos que contienen los factores beneficiosos expresados por las bacterias probióticas. Esto puede incluir microorganismos destruidos térmicamente, o microorganismos destruidos mediante exposición a modificaciones del pH o sometidos a presión. 10 Está previsto que "probióticos" incluya, además, los metabolitos generados por los microorganismos durante la fermentación, si no se indican por separado. Estos metabolitos se pueden liberar al medio de fermentación, o bien pueden quedar almacenados dentro del microorganismo. Tal como se utiliza en la presente memoria, "probióticos" también incluye las bacterias, homogeneizados de bacterias, proteínas bacterianas, extractos bacterianos, sobrenadantes de fermentos bacterianos, y mezclas de los mismos, que cumplen funciones beneficiosas en el animal que los recibe cuando se administran en dosis terapéuticas. 15

Se ha descubierto que las bacterias de ácido lácticos del género *Lactobacilli* obtenibles directamente por aislamiento a partir del tracto GI de mamíferos, extirpado y lavado, se adhieren al tracto GI tras la alimentación de células bacterianas viables, y también tienen un considerable efecto inmunomodulador cuando se administran a animales en forma viable, no viable o fraccionada. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que los *Lactobacilli* obtenibles por aislamiento a partir del tracto GI extirpado y lavado están estrechamente asociados a los tejidos de mucosa 20 intestinales. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que esto hace que los *Lactobacilli* probióticos generen respuestas alternativas al huésped dando origen a su acción probiótica. Se ha descubierto que las bacterias probióticas que pueden obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal seccionado y lavado pueden modular el sistema inmunológico del huésped mediante interacción directa con el epitelio de la mucosa y con las células inmunes 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 la búsqueda de nutrientes, hace que los *Lactobacilli* sean muy eficaces como microorganismos 25 probióticos. 30

Los *Lactobacilli* que pueden obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal canino diseccionado y lavado tienen actividad antimicrobiana *in vitro* contra un número de cepas/especies 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. 35 Las bacterias del ácido láctico de la presente invención tienen preferiblemente una actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* o *Escherichia coli*, más preferiblemente una mezcla de estas cepas y, aún más preferiblemente, todas estas cepas.

Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la actividad antimicrobiana de las bacterias del ácido láctico puede ser el resultado de una serie de acciones diferentes de las bacterias del ácido láctico de la presente memoria. 40 Se ha sugerido anteriormente en la técnica que diversas cepas de bacterias aisladas de muestras fecales ejercen su efecto probiótico en el tracto gastrointestinal después del consumo oral, evitando la unión de organismos patógenos a la mucosa intestinal mediante oclusión. Esto requiere el consumo oral de células bacterianas "vivas" o viables, para que en el intestino se establezca una colonia de bacterias. Sin embargo, se cree que los *Lactobacilli* que pueden obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal canino diseccionado y lavado, si bien ejercen un cierto efecto probiótico debido a la oclusión si se presentan en cualquier forma viable, pueden transmitir un efecto probiótico sustancial tanto en forma viable como no viable debido a la producción durante la fermentación *in vitro* de una sustancia o sustancias que inhiben el crecimiento de los microorganismos patógenos o los matan y/o alteran la competencia inmune del animal huésped. Esta forma de actividad probiótica es deseable, ya que las bacterias se pueden ofrecer como cultivos viables o no viables o productos de fermentación purificada y seguir proporcionando un efecto terapéutico benéfico al animal huésped. 45 50

Preferiblemente, las bacterias lácticas son capaces de mantener su viabilidad durante el tránsito por el tracto gastrointestinal. Esto es deseable para que los cultivos vivos de la bacteria se puedan administrar oralmente, y para que se produzca la colonización en los intestinos y en el intestino grueso después del tránsito a través del esófago y del estómago. La colonización de los intestinos y del intestino grueso por las bacterias lácticas es deseable para poder aportar al huésped ventajas probióticas de larga duración. La dosificación oral de células no viables o material purificado aislado de los mismos produce ventajas temporales pero, dado que las bacterias no son viables, no pueden multiplicarse y producir de modo continuo un efecto probiótico *in situ*. Como consecuencia de ello, esto puede requerir que el anfitrión reciba una dosis periódica, para mantener las ventajas para la salud. Al contrario, las células viables capaces de sobrevivir el tránsito gástrico en forma viable y luego formar colonias adhiriéndose a la mucosa intestinal y proliferando en ella, pueden aportar de modo continuo efectos probióticos *in situ*. 55 60

Por ello, es preferible que las bacterias del ácido láctico conserven su viabilidad después de estar en suspensión en un medio de pH de 2,5 durante 1 hora. Tal como se utiliza en la presente memoria, “conservar la viabilidad” significa que al menos el 25% de las bacterias inicialmente suspendidas en el medio de ensayo son viables usando el método de recuento en placas conocido por los expertos en la técnica. Preferiblemente, “conservar la viabilidad” significa que al menos el 50% de las bacterias inicialmente suspendidas son viables. Es deseable que las bacterias del ácido láctico de la presente invención conserven su viabilidad después de ser expuestas a un pH bajo, ya que esto imita la exposición a los jugos gástricos del estómago y el intestino superior *in vivo* después de la ingesta oral por animales.

Además, es preferible que las bacterias lácticas tengan un crecimiento de, al menos, 66% cuando están en presencia de sales biliares porcinas en una cantidad de, al menos, 0,5%. El crecimiento, tal como se emplea en la presente memoria, se describe con más detalle en el Ejemplo 3. Más preferiblemente, las bacterias tienen un crecimiento de, al menos, 33% cuando están en presencia de sales biliares porcinas en una cantidad de, al menos, 1%. Más preferiblemente aún, las bacterias tienen un crecimiento de 100% en presencia de sales biliares porcinas en una cantidad de, al menos, 0,5%. 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 se debe a que la adición de bilis porcina al medio de cultivo reproduce las condiciones del intestino.

Además, es preferible que las bacterias lácticas tengan una adhesión significativa *in vitro* a las células epiteliales del intestino. Tal como se utiliza en la presente memoria, “adherencia significativa” significa que al menos el 0,2% del número total de bacterias del ácido láctico incubadas junto con las células epiteliales *in vitro* se adhieren a células epiteliales. Más preferiblemente, al menos el 0,3% de las células bacterianas co-incubadas se adhieren a las células epiteliales *in vitro*. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la adherencia a células epiteliales intestinales *in vitro* es una indicación de la capacidad de las bacterias de ácido láctico para colonizar el tracto GI de un animal *in vivo*.

Preferiblemente, la cepa de bacterias lácticas es de una especie seleccionada del grupo que comprende *Lactobacillus murinus/ruminus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus lactis*, o mezclas de los mismos, más preferiblemente *Lactobacillus murinus/ruminus*.

La secuencia 16s-23s de polinucleótidos intergénicos es conocida por los expertos en la técnica como la secuencia de ADN del genoma bacteriano que se puede usar para identificar las diferentes especies y cepas de una bacteria. Esta secuencia polinucleótica intergénica se puede determinar mediante el método que se detalla a continuación.

Se recogieron colonias de *Lactobacilli* de una placa de agar y se resuspendieron en tampón IX para PCR, se calentaron a 96 °C durante 5 minutos, se congelaron a -70 °C durante 5-10 minutos, se fundieron y se añadió una alícuota a un tubo Eppendorf para PCR. Se llevo a cabo un proceso de PCR usando cebadores para el espaciador intergénico (IGS), IGS L: 5'-GCTGGATCACCTCCTTTC-3' (SEQ. N.º 5) y IGS R: 5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3' (SEQ. ID N.º 6 Las condiciones del proceso fueron 96 °C durante 1 min (1 ciclo), 94 °C durante 30 sec, 53 °C durante 30 sec, 72 °C durante 30 sec (28 ciclos). La reacción PCR contenía 5 µl de ADN, tampón para PCR (Bioline, Reino Unido), 0,2 mm de dNTPs (Roche, Reino Unido), 0,4 µm de cebador IGS L y R (150 ng/50 µl) (MWG Biotech, Alemania) y Bioline *Taq* polimerasa (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 (ΦX 174 *Hae III*, Promega) en un 2% de gel teñido con bromuro de etidio de agarosa en TAE, para determinar su perfil IGS. Usando los mismos cebadores que en el caso anterior, el ADN espaciador intergénico (IGS) se secuenció para 4 cepas de *Lactobacilli* usando métodos conocidos por el experto en la técnica.

Preferiblemente, la cepa de bacteria láctica del género *Lactobacillus*, tiene una secuencia de polinucleótidos intergénica 16s-23s que tiene al menos 88%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% de homología con la secuencia de polinucleótidos según la SEQ. N.º 1. Más preferiblemente, la cepa de bacterias lácticas tiene una secuencia de polinucleótidos 16s-23s según la SEQ. N.º 1. Más preferiblemente aún, la cepa de bacterias lácticas según la presente invención es la cepa de *Lactobacilli murinus/ruminus* NCIMB 41194 (AHC1222).

También preferiblemente, la cepa de bacterias lácticas del género *Lactobacilli*, tiene una secuencia de polinucleótidos intergénica 16s-23s que tiene al menos 88%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% de homología con la secuencia de polinucleótidos según la SEQ. N.º 2. Más preferiblemente, la cepa de bacterias lácticas tiene una secuencia de polinucleótidos 16s-23s según la SEQ. N.º 2. Más preferiblemente aún, la cepa de bacterias lácticas según la presente invención es la cepa de *Lactobacilli murinus/ruminus* NCIMB 41196 (AHC5323).

También preferiblemente, la cepa de bacterias lácticas del género *Lactobacilli*, tiene una secuencia de polinucleótidos intergénica 16s-23s que tiene al menos 88%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% de homología con la secuencia de polinucleótidos según la SEQ. N.º 3. Más preferiblemente, la cepa de bacterias lácticas tiene una secuencia de polinucleótidos 16s-23s según la SEQ. N.º 3. Más preferiblemente aún, la cepa de bacterias lácticas según la presente invención es la cepa de *Lactobacilli murinus/ruminus* NCIMB 41197 (AHC6331).



También preferiblemente, la cepa de bacterias lácticas del género *Lactobacilli*, tiene una secuencia de polinucleótidos intergénica 16s-23s que tiene al menos 88%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% de homología con la secuencia de polinucleótidos según la SEQ. N.º 4. Más preferiblemente, la cepa de bacterias lácticas tiene una secuencia de polinucleótidos 16s-23s según la SEQ. N.º 4. Más preferiblemente aún, la cepa de bacterias lácticas según la presente invención es la cepa de *Lactobacilli murinus/ruminus* NCIMB 41195 (AHC3133).

Después de la secuenciación, las secuencias obtenidas para las cuatro cepas depositadas se compararon con la base de datos de secuencias en línea "BLAST", que puede consultarse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> para homología con otras secuencias 16s-23s bacterianas depositadas. Las correspondencias más próximas para AHC 1222, 3133, 5323 y 6331 (NCIMB 41194, 41195, 41196 y 41197 respectivamente) correspondieron a la cepa *Lactobacillus ruminis* AF080103. Sin embargo, existen varias diferencias importantes entre las cepas de AHC y la cepa de *Lactobacillus ruminis* en la región espaciadora, resultando en un valor de homología de 87%, y un valor de BLAST de, al menos, 170.

El método de uso de las bacterias *Lactobacilli* de la presente invención de forma típica implica la ingestión oral por parte del animal. El consumo oral puede ser parte de la ingesta dietaria normal, o bien un suplemento a la misma. El consumo oral se realiza habitualmente al menos una vez por mes, preferiblemente al menos una vez por semana, más preferiblemente al menos una vez por día. Los *Lactobacilli* 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. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" referido a las bacterias de ácido láctico significa la cantidad de bacterias suficiente para aportar el efecto o las ventajas a un animal anfitrión que requiere tratamiento, pero lo suficientemente baja como para evitar efectos adversos como la toxicidad, irritación, o respuestas alérgicas, de forma acorde con una relación razonable de ventajas/riesgos, cuando se utiliza del modo de la presente invención. La "cantidad terapéuticamente eficaz" específica variará dependiendo de factores tales como la afección particular a tratar, el estado físico del animal, la duración del tratamiento, la naturaleza del tratamiento concomitante (si procede), la forma farmacéutica específica utilizada, el vehículo utilizado, la solubilidad de la forma farmacéutica y la posológica concreta.

Preferiblemente, las bacterias de ácido láctico se administran al animal de compañía con 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 los *Lactobacilli* que pueden obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal diseccionado y lavado de mamíferos. Las bacterias *Lactobacilli* se pueden dar al animal en forma viable o como células destruidas, o bien como productos de destilación, aislamiento 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 *Lactobacilli*, 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. Tal como se ha indicado anteriormente, la composición puede ser parte de la ingesta dietaria normal, o bien 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.

Tales composiciones pueden comprender componentes adicionales. 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 de alimentos preferentemente son nutricionalmente equilibradas. En una realización, dichas 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, aproximadamente 15% en peso, incluyendo ejemplos no limitativos del mismo proteínas vegetales como la de la soja, la semilla del algodón y los cacahuetes, proteínas animales como la caseína, la albúmina y el tejido cárnico. Entre los ejemplos de tejido cárnico útiles en la presente invención se incluye la carne fresca y las harinas secas o procesadas tales como la harina de pescado, la harina de aves de corral, la harina de carne, la harina 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 múltiple de almidón, tal como se describe en WO99/51108.

Las composiciones pueden además comprender una fuente de carbohidratos. 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 tales como suero secado 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 lácticas 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 achicorias, o residuos de 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 Orafti 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 Orafti SA de Tirlemont 3300, Bélgica bajo la marca comercial "Raftilose". Por ejemplo, la inulina se puede suministrar en forma de Raftilose (g) P95. Por otra parte, los fructooligosacáridos se pueden obtener hidrolizando la inulina, mediante métodos enzimáticos, o bien utilizando microorganismos.

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. En la solicitud de patente europea N.º 0850569 se describe un proceso adecuado. Si se usa un microorganismo probiótico, lo mejor es recubrir el organismo sobre el alimento seco para animales o rellenar este con aquel. La publicación de patente europea número EP-0 862 863 describe un proceso adecuado.

Para alimentos húmedos se pueden emplear los procesos descritos en las patentes US-4.781.939 y US-5.132.137 para producir productos que imitan la carne. También se pueden usar otros procedimientos para producir productos en trozos; por ejemplo, cocinar en un horno de vapor. De forma alternativa, se pueden fabricar productos del tipo de los panes, emulsificando un material cárnico adecuado para producir una emulsión de carne, añadiendo un agente gelificante adecuado, y calentando la emulsión de carne antes de rellenar con ella 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. Los ingredientes que, de forma no limitativa, se pueden usar en las composiciones de alimentos húmedos, incluyen pollo, pavo, carne vacuna, pescado blanco, caldo de pollo, caldo de pavo, caldo de carne vacuna, hígado de pollo, residuos de arroz para la elaboración de cerveza, maíz molido, harina de pescado, huevos, pulpa de remolacha, cloruros, harina de lino, cordero, subproductos de carne vacuna, subproductos de pollo, y mezclas de los mismos.

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.

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 están el ácido alfa linoleico, el ácido gamma linoleico, el ácido linoleico, el ácido eicosapentanoico, y el ácido docosahexanoico. Los aceites de pescado son fuentes adecuadas de ácidos eicosapentanoicos y de ácido docosahexanoico.

El aceite de borraja, el aceite de semillas de grosella negra y el aceite de primula nocturna son fuentes adecuadas de ácido gamma linoleico. Los aceites de cártamo, aceites de girasol, aceites de maíz y aceites de soja son fuentes adecuadas de ácido linoleico. Estos aceites también se pueden utilizar en los sustratos de recubrimiento mencionados anteriormente. El cinc se puede suministrar de distintas 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 fuente prebiótica y un aceite rico en ácido linoleico, por ejemplo aceite de soja, aporta ventajas inesperadas, lo que sugiere que existe un efecto de sinergia.

En los casos en los que la composición es en forma de salsa de carne, la composición puede comprender al menos 10% de caldo o consomé, cuyos ejemplos no limitativos incluyen el 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.

5 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 está en forma de píldora, se requieren agentes ligantes adecuados para que la píldora se mantenga en forma sólida comprimida. Ejemplos no limitativos de agentes ligantes adecuados incluyen las gomas naturales tales como xantano, pectinas, lecitinas, alginatos y otras conocidas por los expertos en la técnica. Cuando la composición está en forma de cápsula, preferiblemente la composición está encapsulada empleando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Ejemplos no limitativos de materiales de encapsulado adecuados incluyen el alcohol polivinílico (PVA), la polivinilpirrolidona (PVP), los alginatos y la 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

Los Ejemplos 1-4 son ejemplos de composiciones de pienso que comprenden los *Lactobacilli murinus* probióticos usados según la presente invención.

Ingrediente	Porcentaje en peso			
	Ej. 1	Ej. 2	Ej. 3	Ej. 4
Granos de cereal	Hasta el 100	Hasta el 100	Hasta el 100	Hasta el 100
Harina de subproductos de aves de corral	43,5	40	45	35
Grasa de aves de corral	1,28	1,02	1,16	1,35
Producto a base 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 cervecera seca	1,0	1,0	1,0	1,0
Fosfato monosódico	1,0	1,0	1,0	1,0
Carbonato cálcico	0,8	0,8	0,8	0,8
Cloruro de potasio	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 <sup>10</sup> cfu/g NCIMB 41194 en aceite de girasol)	1	0,5	-	0,6
Probiótico (1 x 10 <sup>10</sup> cfu/g NCIMB 41197 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 *Lactobacillus murinus* probiótico usado según la presente invención.

Ingrediente	Porcentaje en peso		
	Ej. 5	Ej. 6	Ej. 7
Agua	Hasta 38	Hasta 47	Hasta 50
Hígado de aves de corral	Hasta 25	Hasta 20	Hasta 15
Productos de aves de corral	25	20	20
Arroz para fabricación de cerveza	5	7	10
Producto a base de huevo	3	2,5	1,5
Grasa de aves de corral	2,9	3,0	3,2
Caldo 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 NCIMB 41096 (1E10 UFC/g)	4	5	6

Los Ejemplos 8 a 10 son ejemplos de composiciones suplementarias de yogur que comprenden el *Lactobacillus murinus* probiótico utilizado según la presente invención.

Ingrediente	Porcentaje en peso		
	Ej. 8	Ej. 9	Ej. 10
Leche	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 41047 (1E10 UFC/g)	4	5	6

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> The IAMS Company  
 Alimentary Health Ltd  
 Boileau, Thomas  
 Ceddia, Michael  
 Davenport, Gary  
 Kiely, Barry  
 O'Mahony, Liam  
 10 Sunvold, Greg  
 Tetrick, Mark  
 Vickers, Robert

15 <120> Métodos de uso de Lactobacilli probióticos para animales de compañía

<130> P150&

<140> No concedida todavía  
 <141> 2004-12-15

20 <150> 60/531,210  
 <151> 2003-12-19

<160> 6

25 <170> Versión patentada 3.1

<210> 1  
 <211> 231  
 30 <212> ADN  
 <213> Lactobacillus murinus

<220>  
 <221> característica\_var  
 35 <222> (230)..(230)  
 <223> n es a, g, c o t

<400> 1  
 40 atcgaccgcc tttctgtgaa cttgttttag tttgagagg tctactctca aactgttct 60  
 ttgaaaacta gataatatct tttatttctt tgtaattaa aataaccgag aacaccgcgt 120  
 tftaaagagt ttaaacatt aatgtttaat cgctaaactc ataaccatta tcgtaagata 180  
 45 atataggtta agttattaag ggcgcatggt ggatgccttg gccaccagan a 231

<210> 2  
 50 <211> 234  
 <212> ADN  
 <213> Lactobacillus murinus

<220>  
 55 <221> característica\_var  
 <222> (7)..(7)  
 <223> n es a, g, c o t

<400> 2  
 60 atttcgnacc gccttttctg aaactttgtt tagttttgag aggtctactc tcaaactgt 60  
 tctttgaaaa ctagataata tcttttattt cttgtttaat taaaataacc gagaacaccg 120  
 65 cgttttaaag agtttaaacc attaatgttt aatcgctaaa ctcataacca ttatcgtaag 180



ES 2 381 112 T3

<212> ADN  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> artificial

<400> 6  
ctggcgccaa ggcattcca

18

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cepa probiótica de *Lactobacillus* en donde dicho *Lactobacillus* probiótico es la especie *Lactobacillus murinus*; la cepa seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus murinus* NCIMB 41194 (AHC 1222); *Lactobacillus murinus* NCIMB 41195 (AHC 3133), *Lactobacillus murinus* NCIMB 41196 (AHC 5323); *Lactobacillus murinus* NCIMB 41197 (AHC 6331), obtenida mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal de mamífero diseccionado y lavado para usar en un método para el tratamiento de un animal de compañía seleccionado de entre regulación del sistema inmunológico de un animal de compañía, comprendiendo dicha regulación tratar o prevenir la enfermedad autoinmune en un animal de compañía; tratar o prevenir la inflamación en un animal de compañía o mezclas de los mismos, mantener o mejorar la salud de la piel y/o del sistema de recubrimiento de un animal de compañía, comprendiendo tratar o prevenir la enfermedad atópica de la piel en los animales de compañía; prevenir la pérdida de peso durante y después de una infección en un animal de compañía, tratar o prevenir afecciones del tracto urinario en animales de compañía, prevenir o tratar la infección del tracto gastrointestinal de un animal de compañía, o mezclas de los mismos; en donde dicho animal de compañía se selecciona del grupo que consiste en caninos y felinos.
2. Una composición para usar según la reivindicación 1, en la que dicha cepa probiótica de *Lactobacillus* se aísla a partir de tejido gastrointestinal diseccionado y lavado obtenido de humanos, caninos o felinos.
3. Una composición para usar según la reivindicación 1, para tratar o prevenir afecciones del tracto urinario en animales de compañía, en donde dicha afección del tracto urinario comprende infección del tracto urinario, cálculos renales o mezclas de los mismos.
4. Una composición para usar según la reivindicación 3, en donde dichas cepas probióticas de *Lactobacillus murinus* aumentan la degradación de ácido oxálico *in vitro*.
5. Una composición para usar según la reivindicación 1, para la prevención o tratamiento de infección del tracto gastrointestinal, comprendiendo dicha prevención o tratamiento reducir el número de bacterias patógenas presentes en las heces de dicho animal de compañía o mezclas de los mismos.
6. Una composición para usar según la reivindicación 5, en la que dichas bacterias patógenas se seleccionan del grupo que consiste en *Clostridia*, *Escherichia*, *Salmonella*, y mezclas de las mismas.