

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 159**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74	(2015.01)
A23C 9/12	(2006.01)
C12Q 1/24	(2006.01)
A23L 1/03	(2006.01)
C12R 1/225	(2006.01)
C12R 1/25	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2008 E 08760355 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2162143**

54 Título: **Microorganismos de la leche de mamíferos, composiciones que los contienen y su uso para el tratamiento de la mastitis**

30 Prioridad:

31.05.2007 EP 07380158

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.12.2015

73 Titular/es:

**BIOSEARCH S.A. (100.0%)
Camino de Purchil 66
18004 Granada, ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍN JIMÉNEZ, ROCÍO;
OLIVARES MARTÍN, MÓNICA;
JIMÉNEZ QUINTANA, ESTHER ANTONIA;
MARÍN MARTÍNEZ, MARÍA LUISA;
SIERRA ÁVILA, SALETA;
MALDONADO BARRAGÁN, ANTONIO;
MARTÍN MERINO, VIRGINIA;
BLANCH MARTELL, FRANCESC;
TORRE LLOVERAS, CELINA;
LARA VILLOSLADA, FEDERICO;
ARROYO RODRÍGUEZ, REBECA;
BOZA PUERTA, JULIO;
JIMÉNEZ LÓPEZ, JESUS;
FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, LEÓNIDES;
SOBRINO ABUJA, ODÓN JULIÁN;
XAUS PEI, JORDI;
RODRÍGUEZ GÓMEZ, JUAN MIGUEL y
DELGADO PALACIO, SUSANA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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).

ES 2 555 159 T3

DESCRIPCIÓN

Microorganismos de la leche de mamíferos, composiciones que los contienen y su uso para el tratamiento de la mastitis

5

Campo de la invención

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

10

Antecedentes de la invención

15

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

20

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

25

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

35

Un enfoque alternativo para el tratamiento de la mastitis es el uso de probióticos. Por ejemplo Sytnik, S.I. *et al.* (Vrach Delo., 1990, 3:98-100) intentaron usar *Bifidobacterium* para prevenir la mastitis pero no observaron ninguna inhibición en el tiempo de permanencia de la microflora de las mamas. Greene, W.A. *et al.* (J. Dairy Sci., 1991, 74:2976-2981) describieron el uso de una preparación de lactobacilo comercial para el tratamiento del recuento elevado de células somáticas (SSC) cuando se administra mediante inyección intramamaria directa pero concluyen que el producto de *Lactobacillus* usado en el ensayo no era eficaz como tratamiento intramamario de la mastitis subclínica basada en SCC. La patente estadounidense US4591499 describe un método para tratar la mastitis usando una inyección intramamaria de una emulsión de aceite en agua que contiene una cepa o una mezcla de cepas de lactobacilos no patógenos. Sin embargo, las cepas descritas en este documento parecen actuar por medio de una disminución no específica en el pH de la glándula mamaria y, debido a su formulación particular como emulsiones, es necesario administrarlas mediante inyección intramamaria directa. La patente rusa RU2134583 describe el uso de una composición tópica que contiene lactobacterin (masa microbiana de lactobacterias que se han liofilizado/secado vivas en medio de cultivo) o bifidobacterin (una biopreparación liofilizada inmovilizada sobre carbón activado especial) para el tratamiento de la diseminación microbiana masiva de la leche materna. Sin embargo, esta preparación es sólo adecuada para la administración tópica y forma parte de un tratamiento de múltiples etapas que incluye masajes de relajación y la aplicación de una suspensión de microorganismos derivados de la microflora normal del intestino que contiene adicionalmente un medio formador de una película protectora. La solicitud de patente internacional WO05/34970 describe el tratamiento de la mastitis mediante inyección intramamaria directa de una cepa de *Lactococcus lactis*.

45

50

55

Heikkilä *et al.*, (J Applied Microbiol, 2003, 95:471-8) describe que bacterias de ácido láctico tal como *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus lactis*, y *Leuconoctoc mesenteroides* inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, que se sabe produce infecciones mamarias maternas. Sin embargo, este documento no describe la posible vía de administración para el uso terapéutico de estas cepas.

60

Ha habido un número de enfoques para obtener probióticos con la capacidad de transferirlos a la leche materna. La solicitud internacional WO05/117532 describe un método para seleccionar una cepa bacteriana de ácido láctico para

65

la administración oral a una mujer para mejorar la leche materna de la mujer, que comprende seleccionar una cepa de *Lactobacillus* que aumenta el nivel de IL-10 antiinflamatoria y disminuye el nivel de TGF-β2 en leche materna, reduciendo de esta manera el riesgo de que la madre lactante desarrolle mastitis. Sin embargo, no se muestra que la cepa de ácido láctico tenga un efecto antibacteriano sobre estafilococos y/o estreptococos. La solicitud internacional WO04/003235 describe un método para la selección de cepas microbianas probióticas de leche materna y/o líquido amniótico con la capacidad de transferirse a leche materna y/o órganos internos excepto mucosas. Estas cepas microbianas probióticas tienen propiedades antibacterianas contra bacterias patógenas, incluyendo *Salmonella choleraesuis* y *Staphylococcus aureus* (Olivares et al., J Applied Microbiol 2006, 101:72-9, Martín R et al., J Hum Lact, 2005, 21(1):8-17).

Además, se han usado probióticos para el tratamiento de trastornos gastrointestinales. La solicitud internacional WO97/461104 describe el tratamiento de diarrea inducida por rotavirus mediante administración oral de *Lactobacillus reuteri*. La solicitud europea EP 0577904 describe una cepa de bifidobacteria para la producción de alimentos o fármacos para tratar trastornos gastrointestinales. Sin embargo, no se muestra que esta cepa se transfiera a la glándula mamaria después de la ingestión oral. Kaur et al. (Eur J Pharm Sci, 2002, 15:1-9) describe probióticos de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* como suplementos alimenticios que se pueden usar terapéuticamente para prevenir diarrea, mejorar la tolerancia a lactosa, modular la inmunidad, que afectan beneficiosamente al huésped mejorando su equilibrio microbiano intestinal, y que también pueden tener potencial para prevenir cáncer y niveles menores de colesterol en suero.

Por tanto, existe un deseo en la técnica de enfoques adicionales que permitan la prevención y el tratamiento de la mastitis y otras patologías de las glándulas mamarias, en mujeres y en otras hembras de mamífero, que puedan aplicarse más fácilmente y a través de medios menos invasivos.

Compendio de la invención

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

Se divulga un procedimiento para la selección de probióticos que comprende las etapas de:

- (i) aislar las cepas de bifidobacterias o bacterias del ácido láctico presentes en la leche fresca de una especie de mamífero mediante selección en medios de cultivo de ácido láctico,
- (ii) seleccionar aquellas cepas de la etapa (i) que pueden transferirse a la glándula mamaria tras la ingestión oral y/o colonizar la glándula mamaria tras su aplicación tópica,
- (iii) seleccionar aquellas cepas de la etapa (ii) que pueden reducir las tasas de supervivencia y/o las tasas de adhesión a las células epiteliales de *Staphylococcus aureus* y
- (iv) seleccionar aquellas cepas de la etapa (iii) que pueden proteger a los animales frente a la mastitis.

En un aspecto, la invención proporciona cepas probióticas seleccionadas del grupo de *Bifidobacterium breve* depositada en el CECT con el número de acceso 7263, *Bifidobacterium breve* depositada en el CECT con el número de acceso 7264, *Lactobacillus reuteri* depositada en el CECT con el número de acceso 7260, *Lactobacillus plantarum* depositada en el CECT con el número de acceso 7262, *Lactobacillus fermentum* depositada en el CECT con el número de acceso 7265 y *Lactobacillus reuteri* depositada en el CECT con el número de acceso 7266.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición, un producto farmacéutico, un alimento o un producto nutricional que comprende al menos una cepa probiótica de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de las cepas probióticas de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de una infestación o infección aguda o crónica, o de una colonización microbiana no deseada, en el que la infección, infestación o colonización está producida por parásitos, bacterias, levaduras, hongos o virus, que afectan cualquier mucosa o superficie corporal en un sujeto o animal que lo necesite.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una cepa probiótica o de una mezcla de cepas probióticas de la invención o el sobrenadante de cultivo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de reacciones de hipersensibilidad frente a alimentos e intolerancia metabólica; de estreñimiento y otros trastornos gastrointestinales; de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios seleccionados del grupo de la EII (enfermedad inflamatoria del intestino), colitis ulcerosa, artritis, aterosclerosis, esclerosis múltiple, psoriasis o sarcoidosis; y del crecimiento tumoral, la metástasis y el cáncer en un sujeto o animal que lo necesite.

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

- 5 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una cepa probiótica o de una mezcla de cepas probióticas de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de niveles inmunitarios temporalmente deprimidos en individuos o animales sometidos a estrés fisiológico y derivado de un tratamiento médico.

10 Breve descripción de las figuras

La figura 1 proporciona las secuencias de las secuencias de ARNr de 16S de las bacterias de las cepas probióticas descritas en el presente documento, incluyendo las de esta invención y su perfil de PCR-RADP.

- 15 La figura 2 es un gráfico de barras que muestra la capacidad de transferencia a la glándula mamaria de y la colonización del intestino por las cepas descritas en el presente documento, incluyendo las de la presente invención en ratones. El número de lactobacilos (barras grises), bifidobacterias (barras negras) y enterococos (barras blancas) en las muestras fecales y de leche extraída en ratones lactantes con aporte complementario diario durante 14 días con 10^8 ufc de las cepas marcadas genéticamente se analizó mediante cultivo en placas de colonias bacterianas. Las muestras de leche y fecales se recogieron el día 0, 5 y 10 de aporte complementario probiótico. Las colonias positivas para la PCR en leche se indican como %.

- 25 La figura 3 es un gráfico de barras que muestra la inhibición de la adhesión y la supervivencia de los estafilococos producidas tras el cocultivo de los estafilococos con las cepas descritas en el presente documento, incluyendo las de esta invención. A) Se evaluó el efecto inhibitorio de estos probióticos sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus in vitro* mediante un ensayo de difusión en pocillos de agar en placas de TSA. El diámetro del halo de inhibición (en milímetros) producido por los sobrenadantes bacterianos determina el efecto antimicrobiano. B) Se evaluó la adhesión de la cepa de *Staphylococcus aureus* patógena a células Caco-2 en presencia de las cepas probióticas de esta invención. Se contaron diez campos aleatorizados y se expresaron los resultados como la media del % de bacterias Gram-negativas adheridas unidas a las células en comparación con el número de bacterias patógenas adheridas en ausencia de probióticos.

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

- 40 La figura 5 es un gráfico de barras que muestra la adhesión de las cepas probióticas a las células intestinales. Se evaluó la adhesión de las cepas probióticas descritas en el presente documento, incluyendo las de esta invención usando líneas de células intestinales HT-29 (barras negras) o Caco-2 (barras grises). Se contaron veinte campos aleatorizados y se expresaron los resultados como la media del número de bacterias unidas a las células por campo \pm DE.

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

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

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

65 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un nuevo método para el tratamiento terapéutico y profiláctico de la mastitis infecciosa tanto en mujeres como en otras hembras de mamífero que lo necesitan. El método se basa en el uso de cepas probióticas específicas como se divulga en la reivindicación 1, seleccionadas especialmente para esa aplicación en particular.

- 5 Se divulga un procedimiento para la selección de probióticos que comprende las etapas de:
- (i) aislar las cepas de bifidobacterias o bacterias del ácido láctico presentes en la leche fresca de una especie de mamíferos mediante selección en medios de cultivo de ácido láctico,
 - 10 (ii) seleccionar aquellas cepas de la etapa (i) que pueden transferirse a la glándula mamaria tras la ingestión oral y/o colonizar la glándula mamaria tras su aplicación tópica,
 - (iii) seleccionar aquellas cepas de la etapa (ii) que pueden reducir las tasas de supervivencia y/o las tasas de adhesión a las células epiteliales de *Staphylococcus aureus* y
 - 15 (iv) seleccionar aquellas cepas de la etapa (iii) que pueden proteger a los animales frente a la mastitis.

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

En la etapa (ii), las cepas aisladas en la etapa (i) se seleccionan basándose en su capacidad para transferirse a la glándula mamaria tras la ingestión oral y/o colonizar la glándula mamaria tras la aplicación tópica. Para detectar la capacidad para transferirse a la glándula mamaria, puede utilizarse un ensayo tal como se describe en el documento WO2004003235 para detectar la transferencia de un microorganismo a la leche tras la ingestión oral.

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

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

En un aspecto, la invención proporciona una cepa probiótica seleccionada del grupo de *Bifidobacterium breve* depositado en el CECT con el número de registro 7263, *Bifidobacterium breve* depositado en la CECT con el número de registro 7264, *Lactobacillus reuteri* depositado en la CECT con el número de registro 7260, *Lactobacillus plantarum* depositado en el CECT con el número de registro 7262, *Lactobacillus fermentum* en la CECT con el número de registro 7265 y *Lactobacillus reuteri* depositado en la CECT con el número de registro 7266.

Se divulga además un sobrenadante de un cultivo de una o más de las cepas según la invención. El sobrenadante puede obtenerse a partir del cultivo por cualquier medio disponible para el experto, incluyendo centrifugación, filtración, flotación y similares.

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

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

representado en la composición en una proporción de desde el 0,1% hasta el 99,9%, más preferiblemente desde el 1% hasta el 99% e incluso más preferiblemente desde el 10% hasta el 90%.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una cepa o una composición de la invención. La preparación farmacéutica puede adoptar la forma de comprimidos, cápsulas, suspensiones bacterianas líquidas, aportes complementarios orales en seco, aportes complementarios en húmedo, alimentación por sonda seca o una alimentación por sonda húmeda. Preferiblemente el probiótico, la composición y el producto farmacéutico que contienen probióticos o que contienen sobrenadantes se dirige a la superficie de la mucosa oral, gástrica y/o intestinal; sin embargo, podría dirigirse también a la mucosa nasofaríngea, respiratoria, reproductora o glandular, y/o a la glándula mamaria y podría administrarse a mujeres y animales por vía oral, nasal, ocular, rectal, tópica y/o vaginal.

En otro aspecto, la invención proporciona un alimento o un producto nutricional que comprende al menos una cepa probiótica según la invención. También se divulga un alimento o un producto nutricional que comprende al menos un sobrenadante de un cultivo de una o más cepas según la invención. Ejemplos no limitantes de productos alimenticios adecuados que pueden usarse en la presente invención son leche, yogur, queso, cuajada, leches fermentadas, productos fermentados a base de leche, productos a base de cereales fermentados, productos cárnicos fermentados, otros polvos a base de cereales o a base de leche, leche maternizada de nutrición clínica, helados, zumos, pan, tartas o golosinas, formulaciones de pienso para animales, formulaciones dietéticas semisintéticas o sintéticas, leche maternizada para lactantes, fórmulas de nutrición clínica, helados, zumos, harinas, pan, tartas, golosinas o chicles.

La cantidad de dosificación requerida de las cepas probióticas en la composición, alimento o composición farmacéutica descritos anteriormente variará según la naturaleza del trastorno o del uso propuesto de la composición, ya se use profiláctica o terapéuticamente y el tipo de organismo implicado.

Puede usarse cualquier dosis adecuada de los probióticos o combinaciones de los mismos en la presente invención siempre que los efectos tóxicos no superen los efectos terapéuticos. Pueden determinarse la toxicidad y eficacia terapéutica mediante procedimientos farmacéuticos convencionales con animales de experimentación, tal como calculando la estadística de DE, (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) o DL (la dosis letal para el 50% de la población). La razón de dosis de los efectos tóxicos con respecto a los terapéuticos es el índice terapéutico, que puede expresarse como la razón DL/DE. No obstante, la actividad de los nuevos microorganismos en el individuo depende naturalmente de la dosis. Es decir, cuanto más se incorporan los microorganismos novedosos por medio de la ingestión o administración del material alimenticio o de la composición farmacéutica anteriores, mayor será la actividad protectora y/o terapéutica de los microorganismos. Puesto que los microorganismos de esta invención no son perjudiciales para los seres humanos y animales y se han aislado finalmente a partir de leche materna de seres humanos sanos, puede incorporarse una alta cantidad de los mismos de manera que se colonizará esencialmente una alta proporción de la mucosa del individuo por los microorganismos novedosos. Se prefieren las composiciones que muestran grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos a partir de estudios en animales se usan para formular un intervalo de dosis para el uso en animales o seres humanos. La dosis contenida en tales composiciones está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE, con poca o ninguna toxicidad. La dosis varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración. La dosis exacta la determinará el médico, a la luz de los factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. Por ejemplo, para preparar una composición alimenticia según la presente invención, se incorpora al menos una de las cepas probióticas de la presente invención en un soporte adecuado, en una cantidad de desde 10^5 ufc/g hasta aproximadamente 10^{12} ufc/g de material soporte, preferiblemente desde aproximadamente 10^6 ufc/g hasta aproximadamente 10^{11} ufc/g de material soporte, más preferiblemente desde aproximadamente 10^6 ufc/g hasta aproximadamente 10^{10} ufc/g de material soporte.

En el caso de una composición farmacéutica, la dosis de la cepa probiótica debe ser de desde 10^5 ufc/g hasta aproximadamente 10^{14} ufc/g de material soporte, preferiblemente desde aproximadamente 10^6 ufc/g hasta aproximadamente 10^{13} ufc/g de material soporte, más preferiblemente desde aproximadamente 10^7 ufc/g hasta aproximadamente 10^{12} ufc/g de material soporte. Para el fin de la presente invención, la abreviatura ufc designará una "unidad formadora de colonias" que se define como el número de células bacterianas reveladas mediante recuentos microbiológicos sobre placas de agar.

Se ajustan la dosis y administración para proporcionar niveles suficientes de la fracción activa o para mantener el efecto deseado. Los factores que pueden tenerse en cuenta incluyen la gravedad del estado patológico, la salud general del sujeto, la edad, peso y sexo del sujeto, tiempo y frecuencia de administración, combinación(es) de fármacos, sensibilidades de reacción y respuesta al tratamiento. Las composiciones de acción prolongada pueden administrarse cada 3 a 4 días, cada semana, o dos veces a la semana dependiendo de la semivida y la tasa de depuración de la formulación en particular.

En una realización preferida, la invención se refiere también a composiciones de las cepas de esta invención en forma liofilizada, deshidratada por congelación o deshidratada, que pueden obtenerse mediante cualquier método convencional conocido en la técnica.

- 5 También se divulga una composición, producto farmacéutico, alimento o producto nutricional en los que la cepa probiótica o mezcla de la misma está en forma parcial o totalmente inactivada.

10 Muchas personas tienen una microflora intestinal alterada, es decir, el equilibrio entre las bacterias intestinales nocivas y útiles está alterado. Varios factores, entre otros el estrés, la presencia de sales biliares, y especialmente la dieta, influyen en la flora bacteriana. En estas situaciones, el proceso de fermentación podría alterarse y reducirse el número de bacterias útiles, con la consecuencia de que la mucosa del colon se atrofia y deja de funcionar al mismo tiempo que crece rápidamente el número de bacterias potencialmente malignas. Las cepas probióticas de la invención pueden prevenir la adhesión de *S. aureus* a las células epiteliales, así como reducir las tasas de supervivencia de las células de *S. aureus* y de otros muchos patógenos. Por tanto, las cepas probióticas de la invención son particularmente útiles para el tratamiento de dichas enfermedades ya que contribuyen eficazmente a destruir los patógenos mientras que, al mismo tiempo, contribuyen a la repoblación de la superficie de la mucosa con la microflora fisiológica.

20 Por este motivo, un aspecto de esta invención es el uso de probióticos de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento terapéutico o profiláctico de infestación, o infección crónica o aguda o de la colonización microbiana no deseada, de una superficie mucosa o cualquier otra ubicación en seres humanos, en la que la infestación, infección o colonización está producida por parásitos, bacterias, levaduras, hongos o virus, que afectan a cualquier mucosa o superficie corporal, dicho tratamiento terapéutico comprende la administración de una cantidad eficaz de un probiótico o composición que contiene probióticos, a un sujeto que lo necesita. En una realización preferida, la infección o colonización está producida por parásitos, bacterias, levaduras, hongos o virus, de cualquier mucosa o superficie corporal en un sujeto o animal que lo necesite.

30 Los probióticos de la invención se han seleccionado basándose en su capacidad para colonizar la glándula mamaria tras la ingestión oral y para prevenir la adhesión a células epiteliales y para disminuir la supervivencia de *S. aureus*. Por tanto, las cepas son adecuadas para el tratamiento de la mastitis. En consecuencia, en un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de cepas probióticas de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la profilaxis de la mastitis infecciosa en seres humanos y animales. Este procedimiento consiste en el uso de cepas probióticas seleccionadas de leche fresca homóloga y en la capacidad de estas cepas para transferirse a la glándula mamaria y ejercer allí sus beneficios, tales como la inhibición de la infección estafilocócica.

40 Además, las cepas probióticas de la invención han mostrado también tener algunas de las características atribuidas a una posible cepa probiótica, es decir seguridad y buena resistencia al proceso de digestión y la capacidad de colonización del intestino. Por tanto, las cepas pueden alcanzar el tracto intestinal tras la ingestión oral y ejercer allí sus propiedades terapéuticas. En consecuencia, en una realización preferida, la invención proporciona el uso de las cepas probióticas de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de diarrea neonatal.

45 Se sabe que las cepas probióticas reducen la producción de citocinas proinflamatorias por macrófagos activados durante trastornos inflamatorios crónicos. En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona el uso de las cepas bacterianas y composiciones de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios. Ejemplos no limitantes de tales enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias de este tipo incluyen EII, colitis ulcerosa, artritis, arteriosclerosis, esclerosis múltiple, psoriasis o sarcoidosis.

50 Las cepas probióticas según la invención pueden repoblar la barrera intestinal inmunitaria tras la ingestión oral y así, son también particularmente adecuadas para la mejora de la barrera intestinal inmunitaria en un sujeto o animal que lo necesite. En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona el uso de una o más cepas probióticas de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de reacciones de hipersensibilidad frente a alimentos e intolerancia metabólica tal como intolerancia a la lactosa; de estreñimiento y otros trastornos gastrointestinales.

60 Se sabe que los probióticos son útiles para contrarrestar el cáncer debido a sus efectos en la inhibición de toxinas carcinogénicas en los intestinos tales como nitrosaminas pero también por el efecto de estos probióticos en la modulación de la respuesta inmunitaria natural. En consecuencia, en un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de las cepas expuestas en esta para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento terapéutico o profiláctico de algunos tipos de cáncer y para inhibir el crecimiento tumoral, la metástasis y el cáncer en un sujeto o animal que lo necesite.

65 Las cepas de la invención pueden modular la respuesta inmunitaria y el equilibrio entre las citocinas Th1 y Th2. En consecuencia, en un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de la cepa y composiciones de la invención

en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de trastornos alérgicos, asma y trastornos relacionados con el desarrollo de tolerancia frente a proteínas ingeridas.

5 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de las cepas y composiciones de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de niveles inmunitarios temporalmente deprimidos en individuos tales como los producidos durante el envejecimiento o en individuos sanos que se someten a un esfuerzo intenso o en general a un gran estrés o tensión fisiológica.

10 En otro aspecto, la invención proporciona el uso terapéutico de la cepa probiótica y de las combinaciones de cepas en el que la cepa o cepas se administran por vía oral, tópica, nasal, enteral, ocular, genitourinaria, rectal o vaginal.

15 Además, debido a la presencia de las cepas seleccionadas en la leche materna, los sujetos que necesitan tratamiento podrían ser no sólo los que ingieren directamente las cepas seleccionadas sino también el feto o recién nacidos en periodo de lactancia. En consecuencia, todavía en un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de las cepas y composiciones de la invención en la fabricación de un medicamento diseñado para administrarse a mujeres en periodo de lactancia para el tratamiento terapéutico o profiláctico de su feto y/o recién nacidos lactantes.

Los siguientes métodos y ejemplos ilustran la invención.

20 Ejemplos

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

25 Se obtuvieron muestras de leche fresca (2 ml excepto en el caso de las perras en el que solamente se recogieron 0,5 ml) a partir de 23 mujeres sanas en el día 6-14 después del parto; 8 cerdas en el día 5 después del parto, 9 perras el día 2-10 después del parto y 4 vacas el día 2 después del parto. Ni las mujeres ni los animales tuvieron complicaciones durante el parto y no se administró ningún tratamiento con antibióticos en las dos últimas semanas previas a la recogida de la muestra de leche. Todas las muestras de leche se congelaron inmediatamente a -80°C.

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

35 Estos 68 aislados seleccionados se caracterizaron adicionalmente tanto fenotípica (API CH50, APIZYM y evaluación de resistencia a antibióticos) como genéticamente (secuenciación del ARNr 16S y perfil de PCR-RADP). Esta caracterización dio como resultado 59 cepas diferentes que se evaluaron adicionalmente a través del procedimiento de selección descrito en esta invención con el fin de obtener posibles candidatos probióticos que puedan proteger frente a la mastitis.

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

- *Bifidobacterium breve* obteniéndose dicha bacteria de leche humana
- *Bifidobacterium breve* obteniéndose dicha bacteria de leche humana
- 50 • *Lactobacillus reuteri* obteniéndose dicha bacteria de leche porcina
- *Lactobacillus plantarum* obteniéndose dicha bacteria de leche porcina
- *Lactobacillus reuteri* obteniéndose dicha bacteria de leche canina
- *Lactobacillus fermentum* obteniéndose dicha bacteria de leche canina
- *Lactobacillus salivarius* obteniéndose dicha bacteria de leche porcina
- 55 • *Enterococcus hirae* obteniéndose dicha bacteria de leche felina
- *Enterococcus faecalis* obteniéndose dicha bacteria de leche felina
- *Lactobacillus plantarum* obteniéndose dicha bacteria de leche felina
- *Lactobacillus reuteri* obteniéndose dicha bacteria de leche felina

60 Ejemplo 2: Caracterización fisiológica y genética

Todos estos aislados se caracterizaron fisiológica y genéticamente. Para la identificación de cada cepa probiótica, se realizó un análisis de fermentación API 50CH (BioMerieux) de las cepas a 37°C en condiciones anaerobias durante 24 y 48 horas, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados de 24 horas se resumieron en la tabla I. Un sustrato fermentable positivo es aquel con un valor superior a 3.

Debido a la baja especificidad de la caracterización API, se realizó también el análisis de las secuencias del ARNr 16S de las cepas bacterianas seleccionadas. La secuencia del ARN 16S de las bacterias seleccionadas y su perfil de PCR-RADP se muestran en la figura 1. Los resultados obtenidos condujeron a la clasificación de las cepas bacterianas tal como se indicó anteriormente. Con esta clasificación, las cepas bacterianas de la invención se depositaron según el Tratado de Budapest en la CECT -*Colección Española de Cultivos Tipo*-, Valencia (España) el 17 de abril de 2007 y se les concedieron los siguientes números de acceso:

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

Las siguientes cepas bacterianas descritas en el presente documento se depositaron según el Tratado de Budapest en la CECT -*Colección Española de Cultivos Tipo*-, Valencia (España) el 30 de mayo de 2008

- *Lactobacillus salivarius* CELA200
- *Enterococcus faecalis* EFG1
- *Lactobacillus plantarum* LG14
- *Lactobacillus reuteri* PDA3

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

Ejemplos comparativos

PRUEBA	7263	7264	7260	7262	7265	7266	PDA3	LG14	CELA200	EFG1	EHG11
Glicerol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eritritol	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
D-Arabinosa	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	5
L-Arabinosa	0	0	0	5	0	5	5	5	0	1	0
Ribosa	5	0	0	5	5	5	5	5	4	0	0
D-Xilosa	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
L-Xilosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5
Adonitol	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	5
□-Metil-xilósido	0	0	0	0	0	5	5	0	0	5	5
Galactosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
D-Glucosa	5	5	5	5	5	5	0	5	5	0	0
D-Fructosa	5	5	0	5	5	0	5	5	5	0	0
D-Manosa	1	0	0	5	5	0	0	5	5	0	0
L-Sorbosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Ramnosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Dulcitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inositol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Manitol	4	0	0	5	5	0	4	5	5	5	5
Sorbitol	5	0	0	5	0	0	0	5	5	5	5
□ Metil-D-manósido	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
□ Metil-D-glucósido	2	0	0	0	5	0	5	0	0	5	5
N Acetilglucosamina	2	1	0	5	5	0	5	5	5	5	5
Amigdalina	0	1	0	5	0	0	5	5	0	5	5
Arbutina	0	0	0	5	0	0	5	5	4	5	5
Esculina	5	5	0	5	0	0	0	5	5	5	5
Salicina	1	0	0	5	0	0	5	5	0	0	5
Celobiosa	5	0	0	5	0	0	5	5	4	5	5
Maltosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Lactosa	5	0	5	5	5	5	5	5	5	0	0
Melibiosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0
Sacarosa	5	0	5	0	5	5	5	0	5	0	0
Trehalosa	0	0	0	5	0	0	0	5	5	1	5
Inulina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Melecitosa	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
D-Rafinosa	5	0	5	5	5	5	0	5	6	0	0
Amidón	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucógeno	5	4	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Xilitol	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
□ Gentiobiosa	0	2	0	5	0	0	0	5	0	0	0
D-Turanosa	5	4	0	5	0	0	0	5	0	0	0
D-Lixosa	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
D-Tagatosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
D-Fucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
L-Fucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Arabitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Arabitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gluconato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2 Ceto-gluconato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 Ceto-gluconato	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

5

Ejemplo 3: Selección selectiva de las cepas

Ejemplo 3a: Transferencia a la mama tras la ingestión oral

Una vez que se obtuvieron las diferentes cepas candidatas a partir de leche de mamífero tal como se indicó en el primer criterio de selección, la siguiente etapa en el procedimiento de selección tal como se describe en la presente invención es que las bacterias deben poder transferirse a la leche tras la ingestión oral o la aplicación tópica. Con el fin de someter a prueba esta capacidad, las supuestas cepas se marcaron genéticamente tal como se describió previamente (documento WO 2004/003235) y se administraron por vía oral a ratas preñadas como modelo animal. Se midieron los lactobacilos, bifidobacterias y enterococos totales en muestras fecales neonatales y de leche. Además, la transferencia específica de bacterias se analizó mediante selección por PCR de las colonias obtenidas a partir de la leche de ratas en periodo de lactancia y de heces neonatales.

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

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

Se evaluaron las cepas probióticas de esta invención para determinar su capacidad para producir metabolitos bactericidas que pueden reducir la supervivencia de *Staphylococcus aureus* usando en ensayo de difusión en pocillos de agar. Se prepararon placas de agar TSA que contenían 10^6 ufc/ml de *S. aureus*. Se cortaron pocillos con un diámetro de 5 mm en el agar usando un sacabocados estéril. Luego, se añadieron 50 μ l de un sobrenadante concentrado 2 veces de cada disolución de cepa probiótica a los pocillos y se dejó difundir en el agar durante un periodo de preincubación de 2 horas a 4°C, seguido de incubación aerobia de las placas a 37°C durante 16-18 horas. Tras el periodo de incubación, se observó un halo de inhibición y se midió (en milímetros) para evaluar el efecto bactericida de los candidatos probióticos (figura 3A).

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

Se cultivaron líneas de células intestinales Caco-2 hasta confluencia en placas de plástico de 35 mm que contenían 2 ml de medio sin antibióticos. En el día 10-14 posterior a la confluencia, se sustituyó 1 ml del medio por 1 ml de una suspensión de 10^8 bacterias probióticas en DMEM. Se incubaron los cultivos durante 1 hora a 37°C. Después de eso, se añadió 1 ml de una suspensión de 10^9 bacterias patógenas (*S. aureus*) en DMEM a los cultivos y se incubó durante 1 hora más a 37°C. Se lavaron las células dos veces con PBS y se fijaron con metanol al 70% enfriado con hielo durante 30 minutos. Las placas se secaron al aire y se realizó tinción de Gram. Las bacterias unidas se visualizaron usando un microscopio óptico Axiovert 200 (Zeiss) a aumento de 1000x en inmersión en aceite. Se contó el número de bacterias Gram-negativas en 10 campos aleatorizados y los resultados se expresaron como la media del % de bacterias patógenas unidas a las células en comparación con los cultivos control sin cepas probióticas (figura 3B).

45 Ejemplo 3d: Protección frente a la mastitis

Para evaluar la eficacia de los candidatos probióticos para proteger frente a la mastitis, se usó un modelo de ratones de esta patología. En resumen, se administró un aporte complementario a 10 ratas Wistar preñadas por grupo diariamente mediante sonda nasogástrica de 10^8 ufc/día de cada cepa probiótica en un vehículo de 200 μ l de leche durante dos semanas después del parto. Una semana tras el parto, se indujo la infección de mastitis en los animales mediante la inyección de 10^6 ufc de *S. aureus* en el cuarto par de glándulas mamarias. Se recogió la leche extraída los días 0, 5 y 10 posteriores a la infección para medir la carga bacteriana (figura 4A); y se sacrificaron 5 animales de cada grupo los días 5 y 10 posteriores a la infección con el fin de obtener biopsias de glándulas mamarias para evaluar el proceso inflamatorio mediante examen histológico.

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

- 60 – Puntuación 0: Sin infiltración
- Puntuación 1: Infiltración intersticial leve de células PMN en zonas aisladas de secciones de tejido, epitelio tubular no dañado
- Puntuación 2: Infiltración intersticial que cubre la mayoría de los campos, zonas dispersas de daño tisular con pérdida de estructura tisular, y escasas imágenes de formación de abscesos

- Puntuación 3: Infiltración severa que cubre la mayoría de los campos, zonas frecuentes de daño tisular con pérdida de la arquitectura tisular, e imágenes frecuentes de formación de abscesos.

5 **Ejemplo 4: Potencial probiótico de las cepas**

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

10

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

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

15

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

20

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

25

30

Ejemplo 4b: Resistencia a las sales biliares y ácido

Para analizar la resistencia de las cepas probióticas de esta invención al contenido en sales biliares alto y ácido, condiciones que se encontrarán estas bacterias durante el tránsito digestivo, se cultivaron bacterias en medio de caldo MRS a pH 3,0 o con sales biliares al 2% (Sigma) durante 90 minutos. Se calculó la supervivencia mediante siembra en placas de agar MRS de diluciones seriadas y se comparó con el número de colonias obtenidas en las condiciones control (caldo MRS, pH 5,8). Se cultivaron las placas durante 24 horas a 36°C en condiciones anaerobias extremas. El experimento se repitió tres veces (figura 6).

35

40 **Ejemplo 4c: Resistencia a antibióticos**

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

45

Para analizar la resistencia de las cepas probióticas de esta invención, se usó un ensayo de difusión en pocillos de agar. Se prepararon placas de agar Müller-Hinton que contenían 10⁶ ufc/ml de cada cepa probiótica. Luego se añadieron discos comerciales con antibióticos a los pocillos y se les permitió difundir en el agar durante un periodo de preincubación de 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de incubación anaerobia extrema de las placas a 36°C durante 16-18 horas.

50

55

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

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

	7263	7264	7260	7262	7265	7266	7413	7412	7409	7411	7410
Penicilina	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S
Ampicilina	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S

Ciprofloxacino	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Eritromicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Clindamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Tetraciclina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Vancomicina	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S
Gentamicina	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Cloranfenicol	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Rifampicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R

Ejemplo 4d: Producción de metabolitos antimicrobianos

5 Se ha sugerido que el mecanismo principal usado por los probióticos es controlar el equilibrio entre las bacterias intestinales útiles y perjudiciales es el intestino. Cuando se reduce el número de bacterias útiles, las bacterias oportunistas podrían crecer excesivamente y alterar el bienestar del huésped o incluso inducir una infección. La mayoría de los organismos bacterianos han adquirido características o mecanismos que reducen las capacidades de crecimiento de otros microorganismos que cohabitan con ellos y así, permite su crecimiento selectivo. La reducción de pH a través de la producción de ácido por bacterias del ácido láctico es uno de tales mecanismos. Además, algunas bacterias del ácido láctico también producen componentes de péptidos bioactivos y otros metabolitos que inhiben de manera selectiva el crecimiento de otras bacterias, levaduras u hongos. Este es el caso de reuterina (un aldehído) o bacteriocinas (péptidos, tales como nisina o pediocina PA-1).

10 Se evaluaron las cepas probióticas de esta invención para determinar su capacidad para producir metabolitos bactericidas usando un ensayo de difusión en pocillos de agar. Se prepararon placas de agar TSA que contenían 10⁶ ufc/ml de diferente cepa de bacterias patógenas y se sometieron a ensayo tal como se indicó previamente en el ejemplo 3b para *S. aureus*. Los resultados obtenidos se describieron en la tabla III.

15 **Tabla III: potencial inhibidor patógeno de las diferentes cepas probióticas descritas en el presente documento incluyendo las de la invención**

20

Ejemplos comparativos

	PDA3	LG14	CELA200	EGF1	EHG11	7263	7264	7260	7262	7265	7266
<i>E. faecium</i> P21	+	+	+	-	-	+++	+++	+	+	+++	+++
<i>E. faecalis</i> TAB28	+++	+++	+++	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+/-
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	++	+/-	+	+/-	+/-	+++	++	++	+/-	+	+++
<i>L. innocua</i> RdC	+	+/-	+	+/-	+/-	++	++	+/-	+	+/-	+/-
<i>E. coli</i> CECT 4076	+++	+++	+++	+	+	+++	+	+++	+++	+++	+++
<i>E. coli</i> RJM1	+++	+++	+++	+	+	+	+++	++	+++	+++	+/-
<i>S. enteritidis</i> 4396	+++	+++	+++	++	++	+/-	++	++	+++	+++	++
<i>K. pneumoniae</i> CECT142	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+	+++	++
<i>K. oxytoca</i> CECT860T	+/-	+	+++	++	++	+++	+++	+/-	+/-	+/-	++
<i>P. vulgaris</i> CECT484	++	++	++	+	+	+/-	+	+++	+++	+++	+/-
<i>S. aureus</i> CECT5191	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++
<i>S. epidermidis</i> CECT231	++	++	+++	++	++	++	+++	+++	++	++	++

25 **Ejemplo 5: Efecto de las cepas probióticas sobre la translocación de *Salmonella typhimurium* en ratones tras la inmunización con vacunas de *Salmonella* inactivadas**

La translocación de bacterias Gram-negativas a través del epitelio intestinal puede producirse especialmente en sujetos tras cirugía, enfermedad o infección gastrointestinal. Si no se trata puede conducir a endotoxemia. En este

ejemplo, se examinó el efecto de alimentar las cepas probióticas de esta invención sobre la translocación del patógeno intestinal *Salmonella typhimurium*.

Se sometieron a ayuno ratones Balb/c macho (de 6-8 semanas de edad) con 1×10^8 ufc en 0,2 ml de leche o leche sola durante dos semanas. Después de eso, los ratones se inmunizaron o bien por vía oral o no con una vacuna de *Salmonella* inactivada (10^8 ufc inactivadas con paraformaldehído en 0,2 ml de leche). Tras la inmunización, los ratones se sometieron a ayuno durante dos semanas más con las preparaciones probióticas en días alternos durante dos semanas más. Dos semanas después de la inmunización oral, todos los ratones se expusieron por vía oral a *S. typhimurium* viva (10^{10} ufc en 0,2 ml de leche). Luego, tras 24-48 horas, se determinó el nivel de colonización de *S. typhimurium* en el bazo en la mitad de los animales. Se siguió al resto de los animales durante dos semanas adicionales con el fin de evaluar la supervivencia de los animales tras la infección por *Salmonella*.

Los resultados obtenidos demuestran que la mayoría de los probióticos probados potencian el efecto beneficioso de la vacunación de ratones con la vacuna de *Salmonella* inactivada tal como se muestra en la figura 7.

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

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

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

Se comparó el efecto de la administración de 3×10^9 ufc/día de *L. reuteri* CECT7260 y *L. plantarum* CECT7262 frente a la administración de una formulación de pienso animal que contenía 3000 ppm de ZnO y 40 ppm de colistina en dos grupos de 48 y 45 cerdos destetados, respectivamente, durante un periodo de 34 días.

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

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

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

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

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

Lista de secuencias

<110> PULEVA BIOTECH S.A.

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

<130> P2922ES00

5

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.3

10

<210> 1

<211> 481

<212> ADN

<213> *B. breve* CECT 7263

15

<220>

<221> característica mezcla

<222> (4)..(4)

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

20

<220>

<221> característica mezcla

<222> (7)..(8)

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

25

<220>

<221> característica mezcla

<222> (13)..(13)

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

30

<220>

<221> característica mezcla

<222> (25)..(25)

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

35

<220>

<221> característica mezcla

<222> (131)..(131)

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

40

<220>

<221> característica mezcla

<222> (147)..(147)

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

45

<400> 1

ES 2 555 159 T3

tcngntnnga agnacaataa acacntaagt gccttgctcc ctaacaaaag aggtttacaa 60
cccgaaggc ctccatccct cacgcggcgt cgctgcatca ggcttgccgc cattgatgca 120
atattcccca ntgctgcctc ccgatangag tctgggcccgt atctcagtcc caatgtggcc 180
ggtcgcctc tcaggccggc taccgcgoga agccatggtg ggccgttacc ccgccaataa 240
gctgatagga cgcgaccca tccatgccg caaaggcttt cccaacacac catgcggtgt 300
gatggagcat ccggcattac caccgcttc caggagctat tccggtgcat ggggcaggtc 360
ggtcacgcat tactcaccgg ttcgccactc tcaccaccag gcaaagcccg atggatcccg 420
ttcgacttgc atgtgtaag cacgcccga gcgttcatcc tgagccagga tcaaactcta 480
a 481

5 <210> 2
<211> 476
<212> ADN
<213> *B. breve* CECT 7264

10 <220>
<221> característica mezcla
<222> (2)..(2)
<223> n es a, c, g, o t

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

20 <220>
<221> característica mezcla
<222> (63)..(63)
<223> n es a, c, g, o t

25 <220>
<221> característica mezcla
<222> (72)..(72)
<223> n es a, c, g, o t

30 <220>
<221> característica mezcla
<222> (80)..(80)
<223> n es a, c, g, o t

35 <220>
<221> característica mezcla
<222> (83)..(83)
<223> n es a, c, g, o t

40 <220>
<221> característica mezcla
<222> (87)..(87)
<223> n es a, c, g, o t

ES 2 555 159 T3

<220>
 <221> característica mezcla
 <222> (114)..(114)
 5 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica mezcla
 <222> (141)..(141)
 10 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica mezcla
 <222> (159)..(159)
 15 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica mezcla
 <222> (161)..(161)
 20 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica mezcla
 <222> (355)..(355)
 25 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica mezcla
 <222> (358)..(358)
 30 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica mezcla
 <222> (369)..(369)
 35 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica mezcla
 <222> (444)..(444)
 40 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica mezcla
 <222> (455)..(456)
 45 <223> n es a, c, g, o t

<400> 2
 tncgcganga agaaataaaa caaagtgcct tgctccctaa caaaagaggt ttacaaccg 60

aangcctcca tncctcacgn gngtncat gcatcaggct tgcgccatt gtgnaatatt 120

ES 2 555 159 T3

ccccactgct gcctcccgta ngagtctggg ccgtatctna ntccaatgt ggccggtcgc 180
 cctctcaggc cggctaccog tcgaagccat ggtggggcgt taccocgcca tcaagctgat 240
 aggacgcgac cccatcccat gccgcaaagg ctttcccaac acaccatgog gtgtgatgga 300
 gcatccggca ttaccaccog tttccaggag ctattccggt gcatggggca ggtcngtnac 360
 gcattactna cccgttcgcc actctacca ccaggcaaag cccgatggat cccgttcgac 420
 ttgcatgtgt taagcacgcc gccngcgttc atccnnaac aggatcaaac tctaaa 476

5 <210> 3
 <211> 515
 <212> ADN
 <213> *L. fermentum* CECT 7265

10 <220>
 <221> característica mezcla
 <222> (17)..(17)
 <223> n es a, c, g, o t

15 <220>
 <221> característica mezcla
 <222> (35)..(35)
 <223> n es a, c, g, o t

20 <220>
 <221> característica mezcla
 <222> (313)..(313)
 <223> n es a, c, g, o t

25 <220>
 <221> característica mezcla
 <222> (510)..(510)
 <223> n es a, c, g, o t

30 <400> 3

ES 2 555 159 T3

tacacgatat gaacagntta cctctcatac ggtgnttctt cttaacaac agagctttac 60
gagccgaac ccttcttcac tcacgcggtg ttgctccatc aggcttgccg ccattgtgga 120
agattcccta ctgctgcctc ccgtaggagt atgggcccgtg tctcagtcce attgtggccg 180
atcagtctct caactcggct atgcatcatc gccttggtag gccgttacc caccaacaag 240
ctaatgcacc gcaggccat ccagaagtga tagcgagaag ccatcttita agcgttggtc 300
atgcgaacaa cgntggtatg cggatttagc atctgtttcc aaatgttgtc ccccgcttct 360
gggcaggtta cctacgtgtt actcaccctg ccgccactcg ttggcgacca aaatcaatca 420
ggtgcaagca ccatcaatca attgggcaa cgcgttcgac ttgcatgtat taggcacacc 480
gccggcgttc atcctgagcc aggatcaaan tctaa 515

5 <210> 4
<211> 526
<212> ADN
<213> *L. reuteri* CECT 7266

10 <220>
<221> característica mezcla
<222> (5)..(5)
<223> n es a, c, g, o t

15 <220>
<221> característica mezcla
<222> (9)..(10)
<223> n es a, c, g, o t

20 <220>
<221> característica mezcla
<222> (23)..(23)
<223> n es a, c, g, o t

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

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

35 <220>
<221> característica mezcla
<222> (46)..(46)
<223> n es a, c, g, o t

40 <220>
<221> característica mezcla
<222> (521)..(521)

ES 2 555 159 T3

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

<400> 4

accgnggggnn aacgacactg cgnnacagn ttactctcac gcacgnttct tctccaacaa 60

cagagcttta cgagccgaaa cccttcttca ctcacgcggt gttgctccat caggcttgcg 120

cccattgtgg aagattccct actgctgcct ccgtaggag tatggaccgt gtctcagttc 180

cattgtggcc gatcagtctc tcaactcggc tatgcatcat cgccttggtgta agccgttacc 240

ttaccaacta gctaatgcac cgcaggtcca tcccagagtg atagccaaag ccatctttca 300

aacaaaagcc atgtggcttt tggtgttatg cggattagc atctgtttcc aaatgttacc 360

ccccgtccg gggcaggta cctacgtggt actcaccggt ccgccactca ctggtgatcc 420

atcgtcaatc aggtgcaagc accatcaatc agttgggcca gtgcgtacga cttgcatgta 480

ttaggcacac cgccggcggt catcctgagc caggatcaaa ntctaa 526

5

<210> 5

<211> 524

<212> ADN

<213> *L. reuteri* CECT 7260

10

<220>

<221> característica mezcla

<222> (3)..(3)

15 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica mezcla

<222> (8)..(8)

20 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica mezcla

<222> (507)..(507)

25 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica mezcla

<222> (515)..(515)

30 <223> n es a, c, g, o t

<400> 5

ES 2 555 159 T3

gcntggnga acggctactg cggaacagtt actctcacgc acgttcttct ccaacaacag 60
 agctttacga gccgaaacc ttcttcactc acgcgggtgtt gctccatcag gcttgcgccc 120
 attgtggaag attccctact gctgcctccc gtaggagtat ggaccgtgtc tcagttccat 180
 tgtggccgat cagtctctca actcggctat gcatcatcgc cttggtaagc cgttacctta 240
 ccaactagct aatgcaccgc aggtccatcc cagagtgata gccaaagcca tctttcaaac 300
 aaaagccatg tggcttttgt tgttatgcgg tattagcatc tgtttccaaa tgttatcccc 360
 cgctccgggg caggttacct acgtgttact caccgcgccc cactcactg gtgatccatc 420
 gtcaatcagg tgcaagcacc atcaatcagt tgggccagtg cgtacgactt gcatgtatta 480
 ggacacccgc cggcgttcat cctgagncag gatcnaaact ctaa 524

- 5 <210> 6
- <211> 519
- <212> ADN
- <213> *L. plantarum* CECT 7262

- 10 <220>
- <221> característica mezcla
- <222> (11)..(11)
- <223> n es a, c, g, o t

15 <400> 6
 ggccctgggaa nccggtcata cctggaacag gttacctctc agatatggtt cttctttaac 60
 aacagagttt tacgagccga aacccttctt cactcacgcg gcggttctcc atcagacttt 120
 cgtccattgt ggaagattcc ctactgctgc ctcccgtagg agtttgggccc gtgtctcagt 180
 cccaatgtgg ccgattacc tctcaggctg gctacgtatc attgccatgg tgagccgta 240
 cctcaccatc tagctaatac gccgcgggac catccaaaag tgatagccga agccatcttt 300
 caaactcgga ccatgcggtc caagttgta tgcggtatta gcatctgttt ccaggtgta 360
 tccccgcctt ctgggcaggt ttcccacgtg ttactcacca gttcgccact cactcaaag 420
 taattcatga tgcaagcacc aatcattacc agagttcgtt cgacttgcat gtattaggca 480
 cggccgcagc gttcgtctctg agacaggatc aaaactcta 519

- <210> 7
- <211> 474

ES 2 555 159 T3

<212> ADN
 <213> Enterococcus hirae EHG11

<400> 7

gacagttact ctcacoccttg ttctttctcta acaacagagt tttacgatcc gaaaaccttc 60
 ttcactcacg cggcgttgct cggtcagact ttcgtccatt gccgaagatt ccctactgct 120
 gcctcccgta ggagtttggg ccgtgtctca gtcccaatgt ggccgatcac cctctcaggt 180
 cggctatgca tcgtcgcctt ggtgagccgt tacctcacca actagctaät gcaccgcggg 240
 tccatccatc agcgacaccc gaaagcgcct ttcaaatcaa aaccatgcgg tttcgattgt 300
 tatacggat tagcacctgt ttccaagtgt tatccccttc tgatgggcag gttaccacg 360
 tgttactcac ccgttcgcca ctctctttt tccggtggag caagctccgg tggaaaaaga 420
 agcgttcgac ttgcatgtat taggcacgcc gccagcgttc gtcttgagcc aggt 474

5

<210> 8
 <211> 469
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus plantarum LG14

<400> 8

ttactctcag atatgttctt ctttaacaac agagttttac gagccgaaac ctttcttcac 60
 tcacgcggcg ttgctccatc agactttcgt ccattgtgga agattcccta ctgctgcctc 120
 ccgtaggagt ttgggccgtg tctcagtcct aatgtggccg attacctct caggtcggct 180
 acgtatcatt gccatggtga gccgttaccy caccatctag ctaatacgcc gcgggacat 240
 ccaaaagtga tagccgaagc catctttcaa gctcggacca tgcggtcaa gttgttatgc 300
 ggtattagca tctgtttcca ggtgttatcc cccgcttctg ggcaggtttc ccacgtgtta 360
 ctcaccagtt cgccactcac tcaaagttaa atcatgatgc aagcaccaat caataccaga 420
 gttcgttcga cttgcatgta ttaggcacgc cgccagcgtt cgtcctgag 469

15

<210> 9
 <211> 493
 <212> ADN
 <213> Enterococcus faecalis EFG1

20

<400> 9

ES 2 555 159 T3

ctatcatgca agtcgaacgc ttctttcctc ccgagtgcct gcaactcaatt ggaaagagga 60
 gtggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctacccatc agagggggat aacacttgga 120
 aacaggtgct aataccgcat aacagtttat gccgcatggc ataagagtga aaggcgcttt 180
 cgggtgctgc tgatggatgg acccgcggtg cattagctag ttggtgaggt aacggctcac 240
 caaggccacg atgcatagcc gacctgagag ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg 300
 gccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcgg caatggacga aagtctgacc 360
 gagcaacgcc gcgtgagtga agaaggtttt cggatcgtaa aactctgttg ttagagaaga 420
 acaaggacgt tagtaactga acgtcccctg acggtatcta accagaaagc cacggctaac 480
 tacgtgccca gca 493

- 5 <210> 10
- <211> 524
- <212> ADN
- <213> Lactobacillus salivarius CELA200:
- 10 <220>
- <221> característica mezcla
- <222> (9)..(9)
- <223> n es a, c, g o t
- 15 <220>
- <221> característica mezcla
- <222> (12)..(12)
- <223> n es a, c, g o t
- 20 <220>
- <221> característica mezcla
- <222> (51)..(51)
- <223> n es a, c, g o t
- 25 <220>
- <221> característica mezcla
- <222> (113)..(113)
- <223> n es a, c, g o t
- 30 <220>
- <221> característica mezcla
- <222> (297)..(297)
- <223> n es a, c, g o t
- 35 <220>
- <221> característica mezcla
- <222> (345)..(345)
- <223> n es a, c, g o t
- 40 <220>
- <221> característica mezcla
- <222> (503)..(503)
- <223> n es a, c, g o t

ES 2 555 159 T3

<400>10
 ggggtgggng ancagaacat gaaatgaaca gtttacetot cacctcgtg nttcttctc 60
 taacaacaga gcttttacga ctccgaagga cttcttctac atcacgcggc gnttgctoca 120
 tcagacttgc gtccattgtg gaagattccc tactgctgcc tcccgtagga gtttgggccc 180
 tgtctcagtc ccaatgtggc cgatcaacct ctgagattcg gctacgtatc atcaccttgg 240
 taggcccgtta cccaccaac tagttaatac gccgcgggtc catctaaaag cgatagnaga 300
 accatcttct atctaaggat catgcatcc ttagagatat acggnattag cacctgttct 360
 caagtgttat ccccttcttt taggcaggtt acccacgtgt tactcaccgc tccgccactc 420
 aacttcttac ggtgaatgca agcattcggc gtaagaaagt ttcgttcgac ttgcatgtat 480
 taggcacgcc gccagcgttc gtnatgagcc aggatcaaac tcta 524

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

<400> 11
 gcntgggnga acggtcactg cggaacagtt actctcacgc acgttcttct ccaacaacag 60
 agctttacga gccgaaacct ttcttctactc acgcggtgtt gctccatcag gcttgcgccc 120

ES 2 555 159 T3

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un cepa probiótica seleccionada del grupo de *Bifidobacterium breve* depositado en la CECT con el número de registro 7263, *Bifidobacterium breve* depositado en la CECT con el número de registro 7264, *Lactobacillus reuteri* depositado en la CECT con el número de registro 7260, *Lactobacillus plantarum* depositado en la CECT con el número de registro 7262, *Lactobacillus fermentum* en la CECT con el número de registro 7265 y *Lactobacillus reuteri* depositado en la CECT con el número de registro 7266.
- 10 2. Una cepa probiótica según la reivindicación 1 o una mezcla de cepas según la reivindicación 1 para su uso como un medicamento.
- 15 3. Una composición, un producto farmacéutico, un alimento o un producto nutricional que comprende al menos una cepa probiótica según la reivindicación 1.
- 20 4. Una composición, producto farmacéutico, alimento o producto nutricional como se ha definido en la reivindicación 3 que está en forma congelada, liofilizada o seca.
- 25 5. Uso de una cepa probiótica según la reivindicación 1 o una mezcla de la misma para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de una infestación o infección aguda o crónica, o de una colonización microbiana no deseada, en donde la infección, infestación o colonización está producida por parásitos, bacterias, levaduras, hongos o virus, que afectan a cualquier mucosa o superficie corporal en un sujeto o animal que lo necesite.
- 30 6. Uso según la reivindicación 5 en donde la infección es mastitis.
- 35 7. Uso según la reivindicación 5 en donde la infección es diarrea neonatal.
- 40 8. Uso de una cepa probiótica según la reivindicación 1 o una mezcla de la misma para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de reacciones de hipersensibilidad frente a alimentos e intolerancia metabólica; de estreñimiento y otros trastornos gastrointestinales; de trastornos autoinmunitarios o inflamatorios seleccionados del grupo de EII, colitis ulcerosa, artritis, aterosclerosis, esclerosis múltiple, psoriasis o sarcoidosis; y de crecimiento tumoral, metástasis y cáncer en un sujeto o animal que lo necesite.
- 45 9. Uso de una cepa probiótica según la reivindicación 1 o una mezcla de la misma para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de trastornos alérgicos y asma en un sujeto o animal que lo necesite.
10. Uso según las reivindicaciones 5 a 9 en donde la cepa o composición se administra por vía oral, tópica, nasal, enteral, ocular, urogenital, rectal o vaginal.
11. Uso según las reivindicaciones 5 y 7, en donde la cepa, composición, producto farmacéutico, alimento o producto nutricional está diseñado para administrarse a mujeres o animales en periodo de lactancia para el tratamiento terapéutico o profiláctico de los fetos y/o sus bebés o crías lactantes.

***Bifidobacterium breve* (CECT con el número de registro 7263)**

TCGNGTNNGAAGNACAATAAACACNTAAGTGCCTTGCTCCCTAACAAAAGA
 GGTTTACAACCCGCAAGGCCCTCCATCCCTCACGCGGCGTGCCTGCATCAG
 GCTTGCGCCCATGATGCAATATTTCCCAANTGCTGCCTCCCGATANGAGT
 CTGGGCCGTATCTCAGTCCCAATGTGGCCGGTGCCTCTCAGGCCGGC
 TACCCGTGCAAGCCATGGTGGGCCGTTACCCCGCCATCAAGCTGATAGGA
 CGCGACCCCATCCCATGCCGCAAAGGCTTTCCCAACACACCATGCGGTGT
 GATGGAGCATCCGGCATTACCACCCGTTTCCAGGAGCTATTCCGGTGCAT
 GGGGCAGGTTCGGTACGCATTACTCACCCGTTCCGCACTCTCACCACCAG
 GCAAAGCCCGATGGATCCCGTTGCACTTGATGTGTTAAGCACGCCGCCA
 CGGTTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTAA

***Bifidobacterium breve* (CECT con el número de registro 7264)**

TNCGCGANGAAGAAAATAAAACAAAGTGCCTTGCTCCTAACAAAAGAGGTT
 TACAACCCGAANGCCTCCATNCCTCACGNGGNGTCNCATGCATCAGGCTT
 GCGCCCATGTGNAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTANGAGTCTGGGC
 CGTATCTNANTCCCAATGTGGCCGGTGCCTCTCAGGCCGGCTACCCGT
 CGAAGCCATGGTGGGCCGTTACCCCGCCATCAAGCTGATAGGACGCGAC
 CCCATCCCATGCCGCAAAGGCTTTCCCAACACACCATGCGGTGTGATGGA
 GCATCCGGCATTACCACCCGTTTGCAGGAGCTATTCCGGTGCATGGGGCA
 GGTCTGNGTACGCATTACTNACCCGTTCCGCACTCTCACCACCAGGCAAAG
 CCCGATGGATCCCGTTGCACTTGATGTGTTAAGCACGCCGCCNCGGTTT
 ATCCNNAACAGGATCAAACCTCTAAA

***Lactobacillus reuteri* (CECT con el número de registro 7260)**

GCNTGGGNGAACGGTCACTGCGGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACA
 GAGCTTTACGAGCCGAAACCTTCTTCACTCACGCGGTGTGCTCCATCAGGCTTGCGC
 CCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTTC
 CATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTTAC
 CTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTATAGCCAAAGCCATCTTT
 CAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTT
 ATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTTCCGCCACTCAGTGGT
 ATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCCTACGACTTGC
 ATGTATTAGGCACACCCGCCGCTTCATCCTGAGNCAGGATCNAAACTCTAA

***Lactobacillus plantarum* (CECT con el número de registro 7262)**

GGCCTGGGAANCCGGTCATACCTGGAACAGGTTACCTCTCAGATATGGTTCTTCTTTAA
 CAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTGCCTCCATCAGACT
 TTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGCTC
 AGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCC
 GTTACCTCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCA
 TCTTTCAAACCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAG
 GTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCACGTGTTACTCACCCAGTTCGCCACTCAC
 TCAAATGTAATTCATGATGCAAGCACCAATCATTACCAGAGTTCGTTGCACTTGATGT
 ATTAGGCACGCCCGCAGCGTTTCGTCCTGAGACAGGATCAAACCTCTAA

Figura 1A

***Lactobacillus fermentum* (CECT con el número de registro 7265)**

TACACGATATGAACAGNTTACCTCTCATAACGGTGNITCTTCTTTAACAACAGAGCTTTA
 CGAGCCGAAACCCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCCATTTG
 GAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTTGTTG
 CCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAGGCCGTTACCCACCAA
 CAAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAGAAGTGATAGCGAGAAGCCATCTTTTAAGCGT
 TGTTTCATGCGAACAACGNITGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTGTCCCC
 GCTTCTGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCGTTGGCGACCAAAA
 TCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAATTGGGCCAACGCGTTCGACTTGCATGTATTA
 GGCACACCGCCGGCTTCATCCTGAGCCAGGATCAAANTCTAA

***Lactobacillus reuteri* (CECT con el número de registro 7266)**

ACCGNGGGNNAACGACACTGCGNGNACAGNTTACTCTCACGCACGNTTCTTCTCCAACA
 ACAGAGCTTTACGAGCCGAAACCCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTG
 CGCCCATTTGTTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAG
 TTCCATTTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGT
 TACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATC
 TTCAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAAT
 GTTATCCCCCGTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCACTG
 TGATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACT
 TGCATGTATTAGGCACACCGCCGGCTTCATCCTGAGCCAGGATCAAANTCTAA

***Enterococcus hirae* EHG11:**

GACAGTTACTCTCATCCTTGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTT
 CTTCACTCACGCGCGTGTGCTCGGTACAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTG
 CTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCTCTCA
 GGTGCGCTATGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCG
 CGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGCGGTTTCG
 ATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCTTCTGATGGGCAGGTTA
 CCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCCACTCCTCTTTTTCCGGTGGAGCAAGCTCCGGTGG
 AAAAAAGAGCGTTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAG
 GT

***Lactobacillus plantarum* LG14:**

TTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCCTTCTTCA
 CTCACGCGCGGTTGCTCCATCAGACTTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCC
 TCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCG
 GCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCYACCATCTAGCTAATACGCCCGGGGA
 CCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGT
 TATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCAC
 GTGTTACTCACAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCATCAA
 TACCAGAGTTCGTTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCAGCGTTCGTCTGAG

Figura 1B

Enterococcus faecalis EFG1:

CTATCATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGG
 AGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTG
 GAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGC
 TTTCCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
 TCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
 ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGT
 CTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTA
 GAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACCTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCA
 CGGCTAACTACGTGCCAGCA

Lactobacillus salivarius CELA200:

GGGTGGGGNGANCAGAACATGAAATGAACAGTTTACAATCTCACCTCGCTGNTTCTTCCCT
 CTAACAACAGAGCTTTTACGACTCCGAAGGACCTTCTTACATCACGCGCGTNTGCTC
 CATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGG
 CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGATTCCGGCTACGTATCATCACC
 TTGGTAGGCCGTTACCCCACTAGTTAATACGCCGCGGGTCCATCTAAAAGCGATA
 GNAGAACCATCTTTCATCTAAGGATCATGCGATCCTTAGAGATATACGGNATTAGCACC
 TGTTTCCAAGTGTATCCCCTTCTTTTAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTC
 GCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTCCGGTGAAGAAAGTTTCGTTGACTT
 GCATGTATTAGGCACGCCCGCCAGCGTTCGTNATGAGCCAGGATCAAACCTCTA

Lactobacillus reuteri PDA3:

GCNTGGGNGAACGGTCACTGCGGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACA
 GAGCTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGC
 CCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTTC
 CATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCGTTAC
 CTTACCAACTAGCTAATGCACCGCAGGTCCATCCCAGAGTGATAGCCAAAGCCATCTTT
 CAAACAAAAGCCATGTGGCTTTTGTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTT
 ATCCCCCGCTCCGGGGCAGGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCACTGGTG
 ATCCATCGTCAATCAGGTGCAAGCACCATCAATCAGTTGGGCCAGTGCGTACGACTTGC
 ATGTATTAGGCACACCGCCGGGTTTCATCCTGAGNCAGGATCNAACCTCTAA

Figura 1C

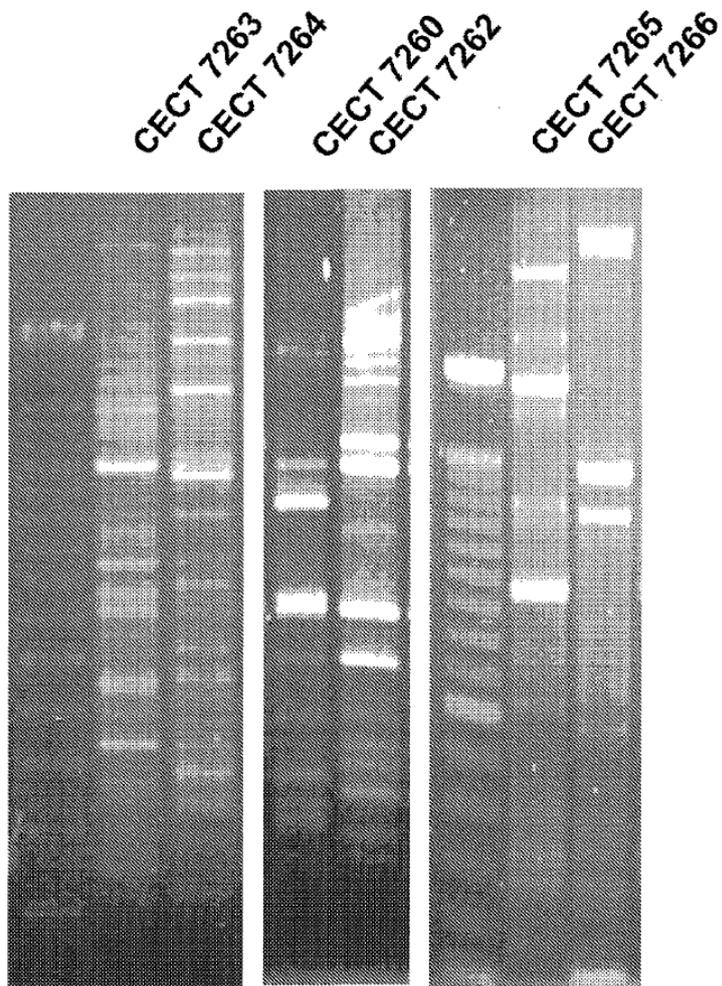


Figura 1D

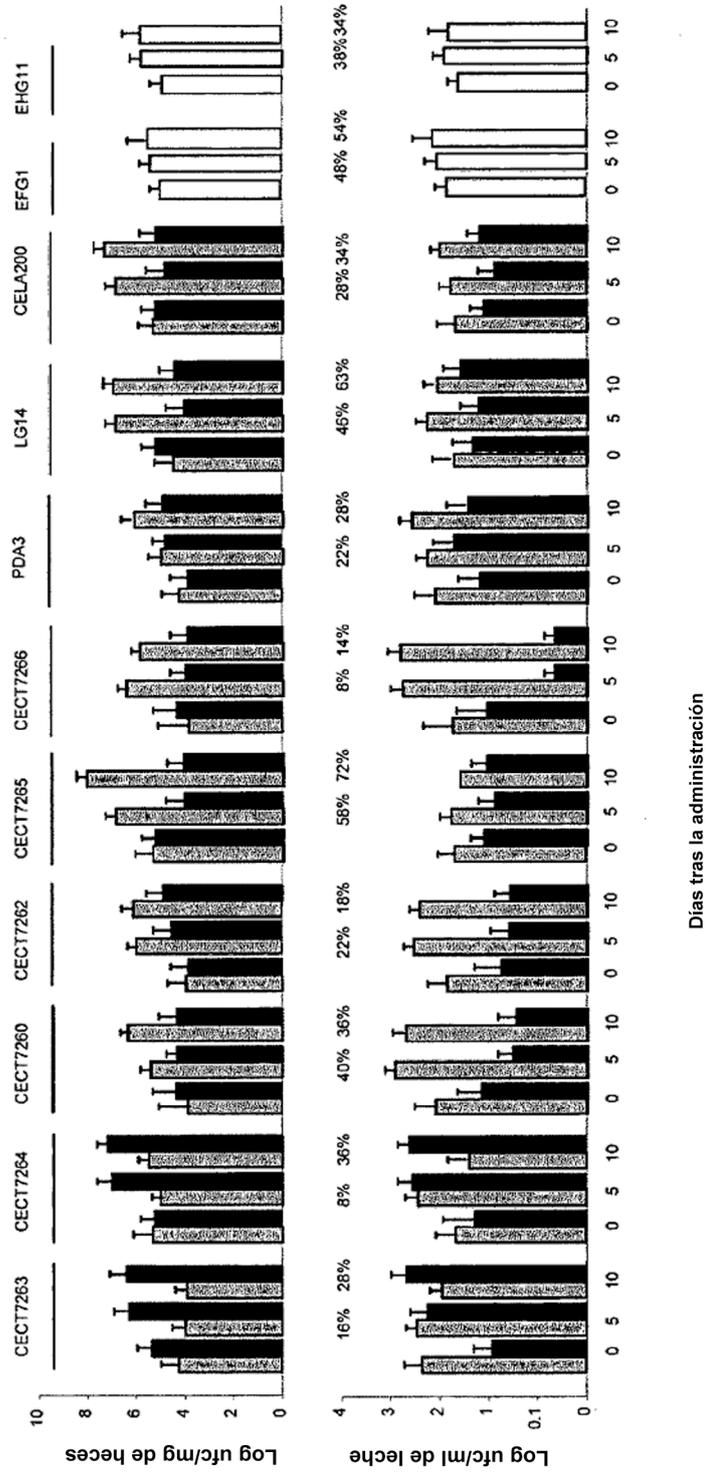


Figura 2

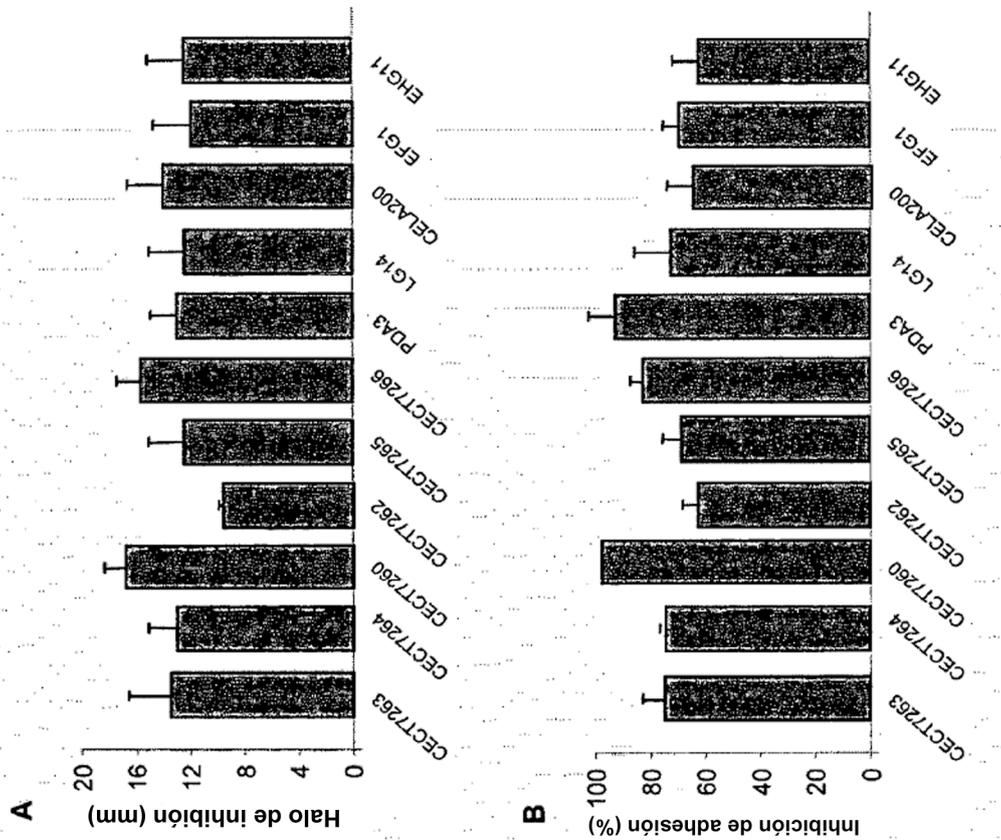


Figura 3

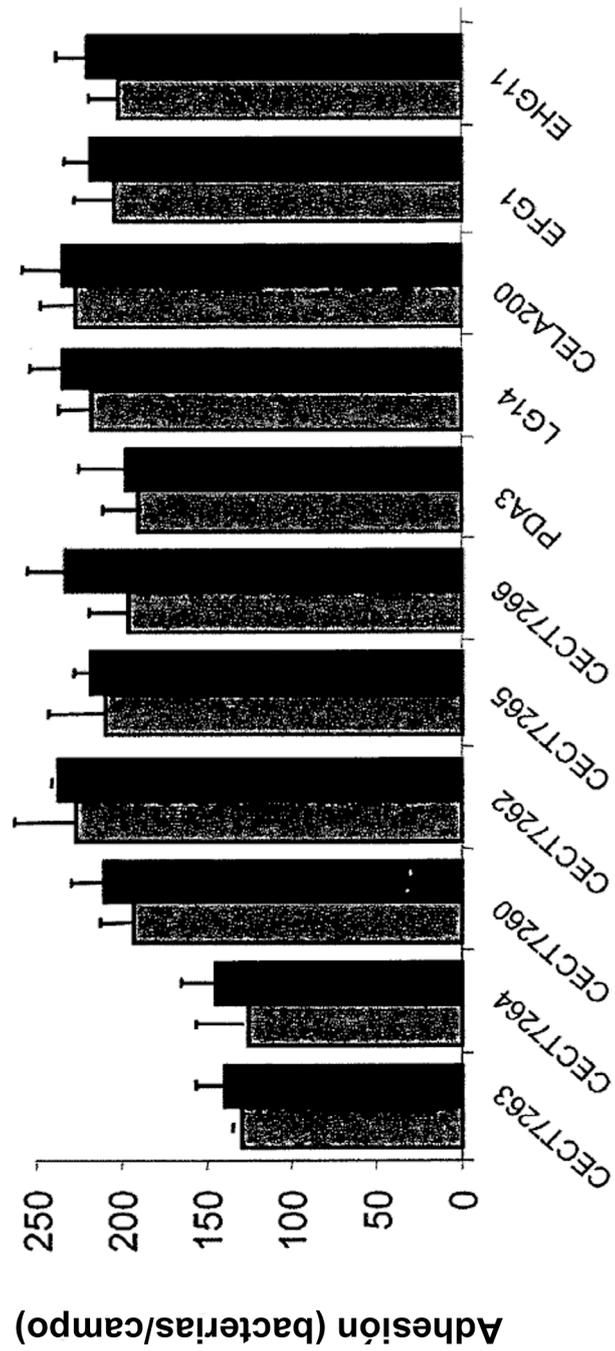


Figura 5

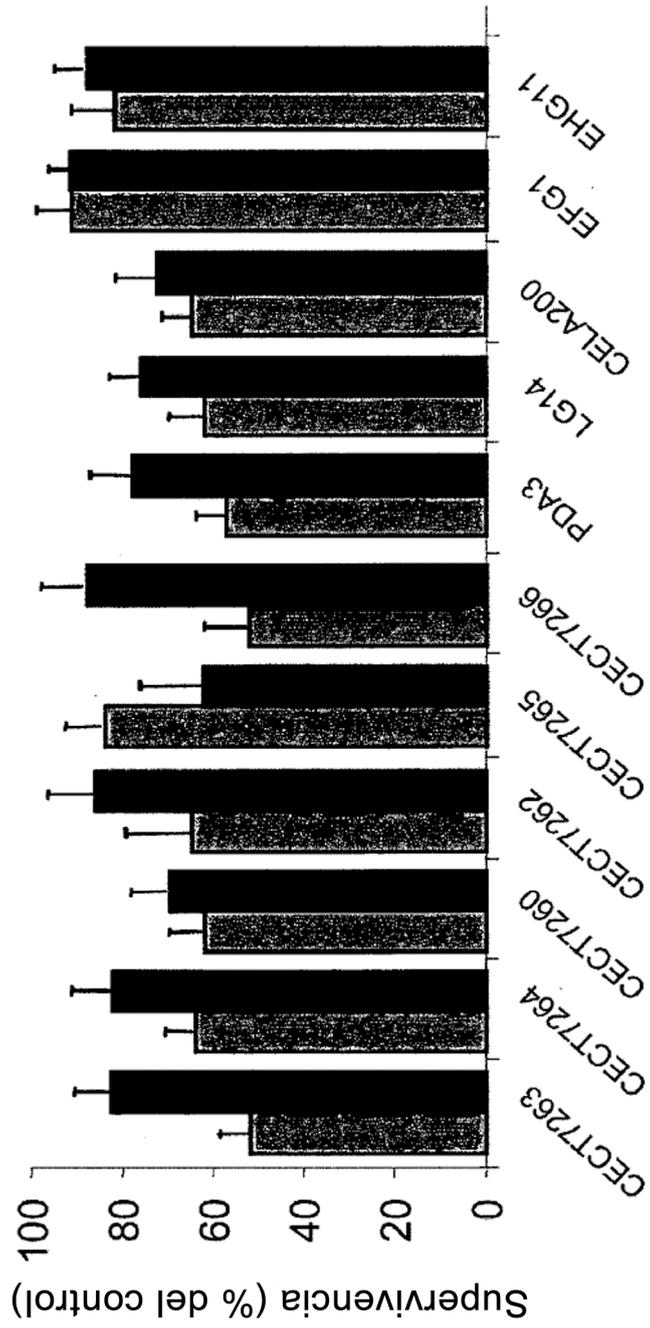


Figura 6

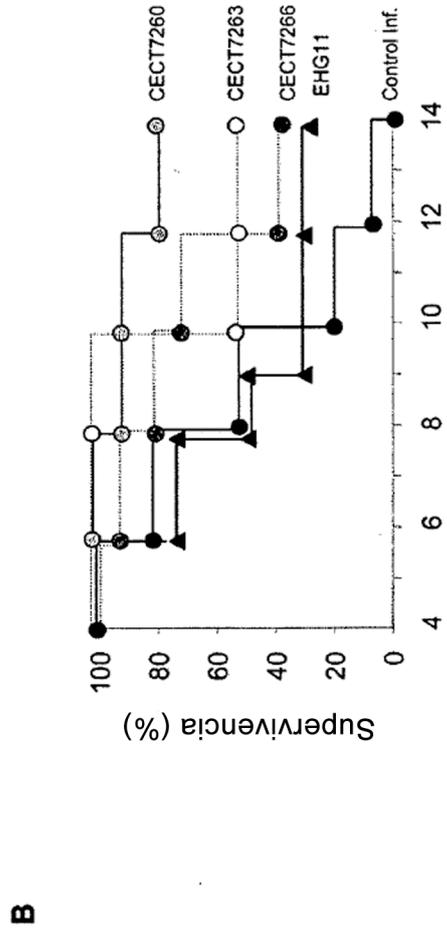
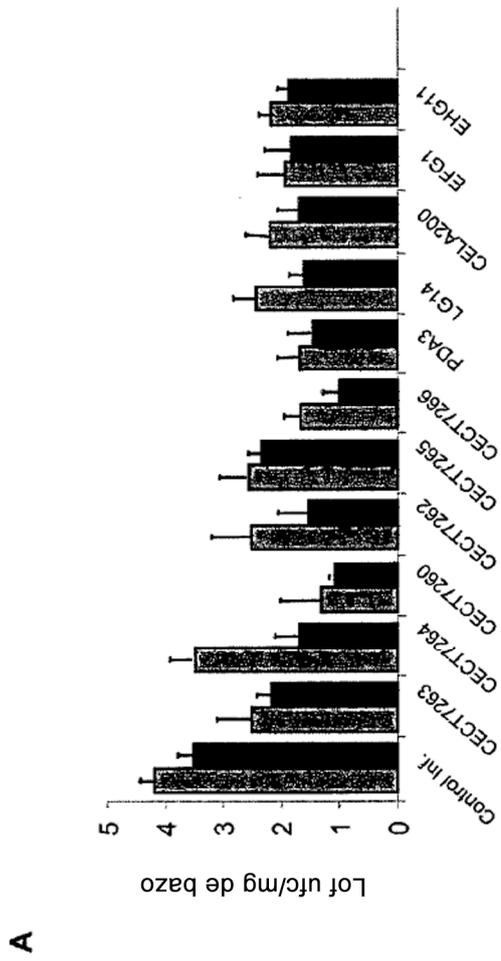


Figura 7

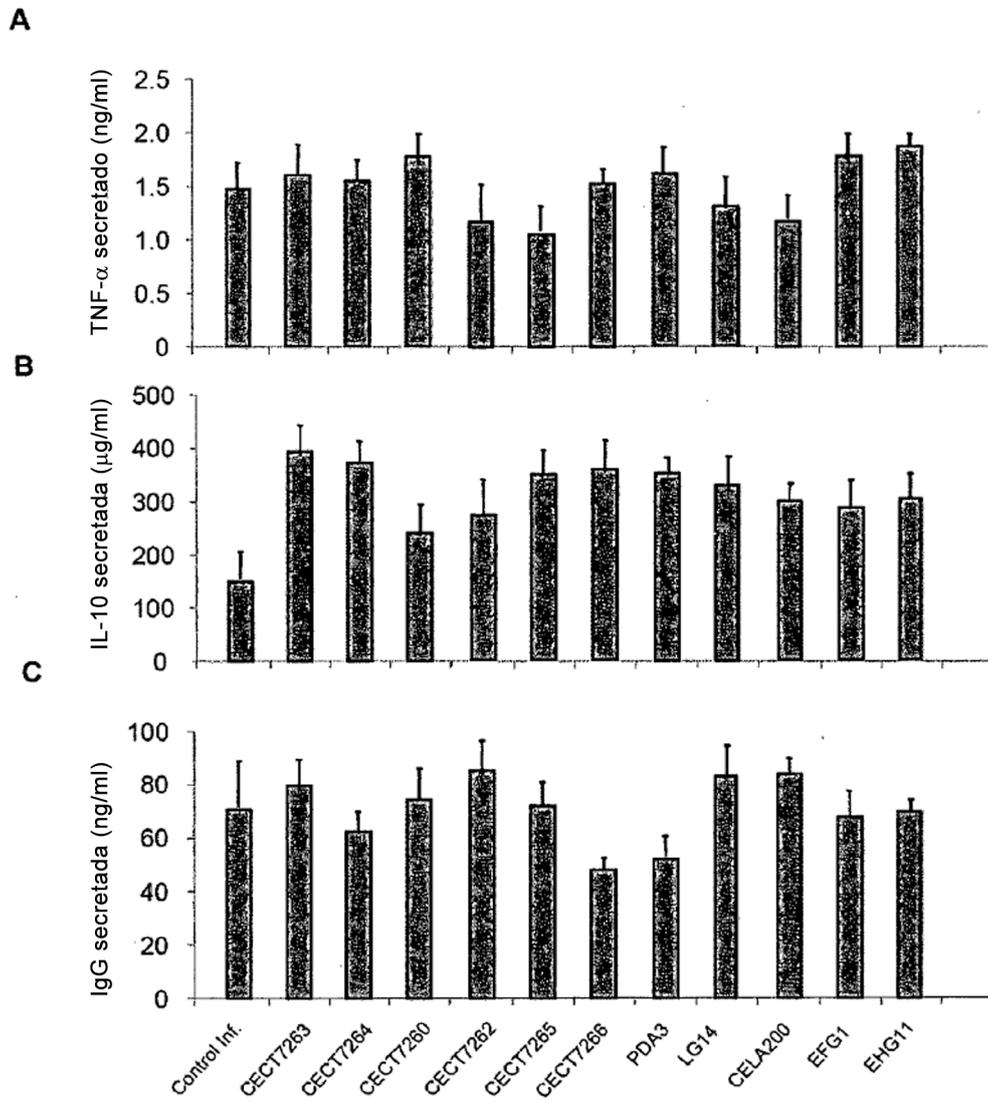


Figura 8