(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 605 733**

(51) Int. CI.:

A23K 10/18 (2006.01)
A23K 50/40 (2006.01)
A61K 39/125 (2006.01)
A61K 39/245 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2008 PCT/US2008/006057**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2008 WO08153655**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2008 E 08754373 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2164333**

(54) Título: **Composiciones y métodos útiles para modular la inmunidad, incrementar la eficacia de las vacunas, reducir la morbididad asociada a las infecciones crónicas por el FHV-1, y prevenir o tratar la conjuntivitis**

(30) Prioridad:

24.05.2007 US 805813

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2017

(73) Titular/es:

NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH

(72) Inventor/es:

KNORR, RUTH;
CAVADINI, CHRISTOPH;
BENYACOUB, JALIL y
SATYARAJ, EBENEZER

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) 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).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos útiles para modular la inmunidad, incrementar la eficacia de las vacunas, reducir la morbididad asociada a las infecciones crónicas por el FHV-1, y prevenir o tratar la conjuntivitis

Fundamento de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a la cepa *Enterococcus bacteria E. faecium* NCIM 10415 (SF68) y en particular al uso de dichos probióticos para prevenir o tratar la conjuntivitis.

Descripción del método relacionado o afín

Los probióticos se pueden definir como microorganismos vivos que confieren un efecto saludable o beneficioso para la salud de un huésped cuando se administran en las cantidades adecuadas. Existen teorías acerca de que los probióticos pueden impartir sus efectos beneficiosos aumentando la resistencia a la colonización de las superficies mucosas por bacterias patógenas (resistencia a la colonización) o bien ejerciendo un efecto directo sobre el tejido linfoide asociado a los intestinos o tripas (GLAT) que promueve la producción de inmunomoduladores.

Los probióticos se han utilizado para modular el curso de una variedad de enfermedades infecciosas en la medicina humana. En contraste con ello se han realizado pocos estudios en la medicina veterinaria. La mayoría de estudios veterinarios se han llevado a cabo en animales grandes donde los probióticos se han utilizado para intentar alterar el derramamiento de los patógenos fecales o bien mejorar los parámetros en la producción como el incremento de peso, la tasa de conversión en alimentos y la mortalidad reducida.

En un estudio animal, un grupo de cachorros de perro se alimentaba con la cepa *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68) que se habían vacunado contra el virus (CDV) es decir el moquillo canino y se habían comparado con un grupo de control que recibía vacunas solamente. Los cachorros que recibían un suplemento de SF68 habían incrementado sus concentraciones en suero e IgA total fecal, las concentraciones en suero de IgG e IgA específicas del CDV y asimismo incrementado el porcentaje de linfocitos B circulantes en comparación con los cachorros de control que demostraban tener un efecto inmuno mayor inducido por el probiótico.

La infección en gatos por el virus FHV-1 es frecuente en gatos y extremadamente contagiosa entre gatos. El virus FCV-1 da lugar a una enfermedad clínica seria en gatos de todo el mundo. En la fase aguda de la invención, pueden aparecer fiebre, estornudos, descarga nasal, conjuntivitis, tos, disnea y muerte. El FHV-1 persiste como infección latente después de una infección primaria. Mientras que los gatos infectados por el herpesvirus FHV-1 pueden estar normales desde el punto de vista clínico durante largo tiempo, la infección se puede activar por otras enfermedades concurrentes y otras formas de estrés. La conjuntivitis recurrente, la queratitis, los estornudos y la descarga nasal son manifestaciones frecuentes. Además, durante periodos de activación, los índices de derramamiento de FHV-1 son altos, y pueden llegar a infectar a otros gatos.

La Panleucopenia felina (FPV) es un virus que da lugar a viremia debido a una enfermedad gastrointestinal grave. Se ha demostrado que los gatitos vacunados de forma apropiada tienen una inmunidad esterilizante. La rinotraqueitis felina (FHV-1) y la calcivirus felina (FCV) son los dos patógenos víricos implicados en el síndrome. Mientras que las vacunas para la FCV tienen una eficacia relativa >95% si se comparan con los controles que no reciben vacuna después de ser inoculados con una cepa de estímulo patogénico, las vacunas para FHV-1solamente inducen aproximadamente un 60% de protección relativa. Por consiguiente, el FHV-1 sigue siendo un problema importante a pesar de que exista su vacuna. Se han hecho intentos para mejorar la eficacia de la vacunación que incluyen su administración por vía intranasal. Pero dicha administración tiende a producir efectos secundarios importantes y a la manipulación genética de cepas virulentas que a cambio conduce a que disminuya la gravedad de la enfermedad pero no reduce la prevalencia del estado portador. El estado portador puede llevar a que se recrudezca o reinfecte el huésped así como a la transmisión a compañeros de hogar. Se han intentado múltiples terapias para las infecciones por FHV-1 que incluyen interferón alfa, trepanación, fármacos antivirales, rinotomía, glucocorticoides, descongestivos tópicos y antibióticos dirigidos a las infecciones bacterianas secundarias. Sin embargo, la administración de vacunas que contienen FHV-1 no impide la infección y en la actualidad no existen fármacos que eliminen el FHV-1 del cuerpo. Los fármacos utilizados por vía oral para el tratamiento son caros, pueden ser ineficaces y pueden ser tóxicos. Ninguno de estos tratamientos ha sido capaz de eliminar la infección vírica crónica. Por lo tanto las recurrencias de derramamiento vírico y de enfermedad clínica son frecuentes. Tanto las respuestas mediadas por las células como las respuestas inmunes en la mucosa de la IgA se consideran importantes en la prevención y en el control de las infecciones por el herpesvirus alfa.

La conjuntivitis (“pinkeye” o “Madras Eye”) es una inflamación de la conjuntiva. Normalmente es causada por reacciones alérgicas o infecciones por bacterias o agentes víricos. La blefaroconjuntivitis es la combinación de la conjuntivitis con la blefaritis (inflamación de los párpados). La queratoconjuntivitis es la combinación de la conjuntivitis con la keratitis (inflamación de la córnea).

SE Andrew (“Ocular manifestations of feline herpesvirus” Journal of Medicine & Surgery, vol. 3, nº1, March 2001(2001-2003), pages 9-16) revela que el virus FHV-1 es responsable de una serie de manifestaciones oculares distintas que incluyen la keratitis, la keratitis del estroma, keratoconjuntivitis sicca, ophtalmia neonatorium, symblepharon, corneal sequestrum, keratitis eosinofílica y uveítis anterior, es decir, evalúa los detalles de las nueve manifestaciones oculares que pueden ser causadas por el herpesvirus -1 felino (FHV-1). SE Andrew carece de una información acerca del aumento de la eficacia de la terapia administrando probióticos de una o más enterococos.

La patente americana 2007(0098744 A1 revela composiciones y métodos para modular la eficacia de la vacuna en animales contra el virus FHV-1 utilizando un organismo probiótico, cepas de enterococos probióticas. La patente americana 2007/0098744 A1 no dice nada acerca de un posible tratamiento de la conjuntivitis pero se centra en las infecciones de gatos por el virus FHV-1.

Mientras que existen varios métodos conocidos relacionados con la inmunidad, la eficacia de la vacuna y las infecciones por FHV-1, siguen faltando composiciones y métodos nuevos para mejorar la inmunidad innata y de adaptación, incrementar la eficacia de la vacuna y reducir la morbididad asociada a las infecciones por FHV-1 crónico. Adicionalmente, existe la necesidad de composiciones y métodos para prevenir o tratar la conjuntivitis en animales.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Un objetivo de la presente invención es disponer de composiciones que modulen la inmunidad, incrementen la eficacia de la vacuna, reduzcan la morbididad asociada a las infecciones crónicas por FHV-1 e impidan o traten la conjuntivitis.

Este objetivo se consigue mediante una composición que comprenda enterococos y que se use para impedir o tratar la conjuntivitis en un animal.

El probiótico en la presente invención es el *Enterococcus spp.* Es el *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68).

Otros objetivos, ventajas y características de la presente invención son evidentes para los expertos en la materia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Pesos corporales (a) y datos fecales (b) respecto al tiempo de gatitos que reciben un suplemento de 150 mg de pollo digest PO (Placebo, n=9) o 150 mg de pollo digest mezclado con $5x10^8$ cfu/día de *Enterococcus faecium* NICMB 10415 (SF68)(tratamiento, n=9) diariamente, empezando a las siete semanas de nacer hasta las 27 semanas. Los gatitos son vacunados por vía subcutánea con una vacuna disponible en el mercado, la FHV-1 in vivo modificada, a las 9 y 12 semanas de nacer. El gráfico representa los porcentajes máximo, mínimo, medio y del 35% y del 75%,p>0,05 en cualquier momento.

Figura 2. Resultados del IgA específico de FHV-1 en suero(a) y saliva (b) de gatitos con (tratamiento) o sin (Placebo) suplemento de SF68. El gráfico representa los porcentajes máximo, mínimo, medio y del 35% y del 75%,p>0,05 en cualquier momento.

Figura 3. Resultados del IgG específico del FHV-1 en suero de gatitos con (tratamiento) o sin (placebo) suplemento de SF68. El gráfico representa los porcentajes máximo, mínimo, medio y del 35% y del 75%,p>0,05 en cualquier momento.

Figura 4. Resultados del IgG específico del FCV de gatitos con (tratamiento) o sin (placebo) suplemento de SF68. El gráfico representa los porcentajes máximo, mínimo, medio y del 35% y del 75%,p>0,05 en cualquier momento.

Figura 5. Resultados del IgG específico de FPV en suero de gatitos con (tratamiento) o sin (placebo) suplemento de SF68. El gráfico representa los porcentajes máximo, mínimo, medio y del 35% y del 75%,p>0,05 en cualquier momento.

Figura 6. IgG (a) e IgA (b) en extractos fecales de gatitos con (tratamiento) o sin (placebo) suplemento de SF68. El gráfico representa los porcentajes máximo, mínimo, medio y del 35% y del 75%, p>0,05 en cualquier momento.

Figura 7. Porcentaje de linfocitos regulados positivos para CD4(a) y CD8 (b) en sangre periférica por citometría de flujo en gatitos con (tratamiento) o sin (placebo) suplemento de SF68. El gráfico representa los porcentajes máximo, mínimo, medio y del 35% y del 75%. * indica los momentos en los que el grupo de tratamiento era significativamente superior al grupo placebo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

Las siguientes abreviaciones se pueden utilizar en la especificación y ejemplos: FHV-1, virus de la rinotraqueititis en felinos; FCV, calcivirus felino; FPV, virus de la panleucopenia felina; especie spp; ELISA, análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas; DM, materia seca; CFU, unidades que forman una colonia; kg, kilogramo; y BW, peso corporal.

"Animal" significa cualquier animal que pueda beneficiarse de una inmunidad innata y adaptativa mejorada, de una eficacia incrementada de la vacuna, o de una morbididad reducida asociada a las infecciones crónicas por FHV-1 o bien cualquier animal susceptible o que padece conjuntivitis. Los métodos y las composiciones de la invención son útiles para una variedad de animales humanos y no humanos, que incluyen las especies aviar, bovina, canina, equina, felina, ovina y porcina, y son especialmente útiles como animales de compañía como caninos y felinos, que incluye a gatos y perros.

"inmunidad adaptativa" o bien "respuesta inmunitaria adaptativa" son dos términos utilizados de forma intercambiada y en un sentido amplio y significan la respuesta inmunitaria al reto o estímulo antigénico, lo que incluye el desarrollo de la memoria inmunológica. La respuesta inmunitaria adaptativa incluye, sin limitación alguna, la inmunidad humoral y celular.

La "inmunidad celular" o bien "respuesta inmunitaria celular" o "inmunidad mediada por células" son términos utilizados de forma indistinta y equivalen a la activación de los T-linfocitos citotóxicos o helper, células mononucleares y citoquinas en respuesta a un estímulo antigénico. El término incluye o envuelve toda inmunidad adaptativa que no pueda ser transferida a un receptor primitivo con anticuerpos.

"Animal de compañía" equivale a todo animal domesticado e incluye, sin limitación alguna, perros, gatos, conejos, cobayas, hámsteres, hurones, ratones, jerbos, caballos, vacas, cabras, ovejas, burros, cerdos son los preferidos y aquí ponemos como ejemplo a los gatos

"Comida para animal o mascota completa y equilibrada desde el punto de vista nutricional" significa una comida que contiene todos los nutrientes conocidos en las cantidades y proporciones apropiadas en base a las recomendaciones de autoridades reconocidas en el campo de la nutrición animal, y son por lo tanto capaces de servirse como fuente única de ingesta dietética para mantener la vida o promover la producción, sin la adición de fuentes nutricionales suplementarias. Comida para mascotas equilibrada desde el punto de vista nutricional y composiciones alimenticias para animales ampliamente conocidas y utilizadas.

"Medicación para la conjuntivitis" equivale a cualquier compuesto, composición o fármaco útil para prevenir o tratar la conjuntivitis, distinta de la composición de la presente invención.

"Suplemento dietético" equivale a un producto que pretende ser ingerida adicionalmente a la dieta normal de un animal.

"Cantidad efectiva" equivale a una cantidad de un compuesto, material o composición efectiva para lograr un resultado biológico determinado. Dichos resultados incluyen, pero no se limitan a modular la inmunidad, incrementar la eficacia de las vacunas, o reducir la morbididad asociada a las infecciones crónicas por FHV-1 en un animal. Dicha actividad efectiva se puede conseguir, por ejemplo, administrando las composiciones de la presente invención al animal.

"Producto alimenticio formulado para el consumo humano" equivale a aquella composición prevista para su ingestión por parte de un ser humano.

"Inmunidad humoral" o bien "respuesta inmunitaria humoral". Ambos términos se utilizan de forma intercambiada y significan la producción de moléculas de inmunoglobulina como respuesta al estímulo antigénico.

"En conjunto" significa que uno o más probióticos u otros compuestos o composiciones de la presente invención son administrados a un animal, (1) juntos en una composición alimenticia o suplemento o bien (2) por separado a la misma frecuencia o a una distinta usando las mismas vías de administración o unas distintas en el mismo momento o de forma periódica. "Periódicamente" significa que la medicación es administrada en una proporción aceptable para una medicación específica y que el probiótico es administrado a un animal de forma rutinaria y apropiada para dicho animal en particular.
"Alrededor del mismo momento" en general se refiere a que el probiótico y la medicación son administrados en el mismo momento o dentro de las 72 horas. "En conjunto" incluye específicamente los unos esquemas de administración en los cuales la medicación se administra durante un periodo prescrito y los probióticos se administran de forma indefinida.

“Inmunidad innata” hace referencia a los mecanismos no específicos del cuerpo para la resistencia a los patógenos que no se ven aumentados por el estímulo con un antígeno en particular.

“Modular la inmunidad” o “modulación de la inmunidad” equivale a cualquier incremento o inhibición de la habilidad corporal por generar una respuesta inmunitaria innata o adaptativa al estímulo antigénico, tal como se mide por cualquier medio adecuado.

“Alimento para mascotas” o “composición del alimento para mascotas” o “alimento para animales” o “composición alimenticia para animales” equivale a una composición que se ha previsto para ser ingerida por un animal, en particular por los animales de compañía.

“Probiótico(s)” significa aquel organismo, en particular microorganismos, que ejerce un efecto beneficioso sobre el animal huésped, como mejor salud o resistencia a la enfermedad. Los probióticos pueden presentar una o más de las siguientes características no restrictivas: no patógenos o no tóxicos frente al huésped; están presentes como células viables, preferiblemente en grandes números; capaces de sobrevivir, metabolizar y persistir en el entorno intestinal (por ejemplo, resistencia a un ph bajo y a los ácidos y secreciones gastrointestinales); adherencia a las células epiteliales, en particular a las células epiteliales del tracto gastrointestinal; actividad microbicida o microbioestática efecto hacia las bacterias patógenas; actividad anti carcinogénica; actividad de modulación inmunitaria, en particular incremento inmunitario; actividad moduladora hacia la flora endógena; salud incrementada del tracto urogenital; actividad antiséptica en o alrededor de las heridas y curación elevada de las heridas; reducción de la diarrea; reducción de las reacciones alérgicas; reducción de la enterocolitis necrotizante neonatal; reducción de la enfermedad inflamatoria del intestino; y reducción de la permeabilidad intestinal.

“Paquete o envase individual” significa que los componentes de un kit están asociados físicamente dentro o con uno o más recipientes y se consideran una unidad para la fabricación, distribución, venta o uso. Los recipientes incluyen, pero no se limitan a bolsas, cajas, botellas, envases de papel film, componentes apilados o fijados de otra manera, o combinaciones de los mismos. Un envase individual pueden ser recipientes de probióticos individuales, composiciones alimenticias, y similares asociados físicamente, de manera que se consideren una unidad para su fabricación, distribución, venta o uso.

“Eficacia de la vacuna” significa la habilidad de una vacuna para producir un efecto terapéutico o protector deseado en un animal frente a un patógeno determinado. La “eficacia incrementada de la vacuna” hace referencia a una mejoría en la capacidad de una vacuna para producir un efecto terapéutico o protector deseado en un animal frente a un patógeno específico, todo ello medido por el medio adecuado.

“Envase o paquete virtual” significa que los componentes de un kit están asociados por las instrucciones sobre uno o más componentes de un estuche virtual o físico, que indican al usuario como obtener los demás componentes, por ejemplo, en una bolsa que contiene un componente y las instrucciones que indican al usuario como ir a una página web, contactar con un mensaje grabado, ver un mensaje visual, o contactar con un cuidador o instructor para obtener instrucciones sobre cómo utilizar el kit.

Todos los porcentajes aquí expresados son en peso de la composición sobre una base de materia seca a menos que se especifique lo contrario. El término “base de materia seca” significa que una concentración de un ingrediente en una composición se mide una vez retirada la humedad de la composición.

La invención no se limita a la metodología en particular, a los protocolos y reactivos aquí descritos porque pueden variar. Además, la terminología utilizada aquí tiene como objetivo describir únicamente configuraciones determinadas y no pretende limitar el alcance de la presente invención. Tal como aquí y en las reivindicaciones adjuntas se ha utilizado, las formas singulares “un”, “una” y “el, la” incluyen referencias en plural a menos que el contexto claramente indique lo contrario. Del mismo modo, las palabras “comprende” y “que comprenda” se pueden interpretar más bien de forma inclusiva que exclusiva.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos y aquellos acrónimos aquí utilizados tienen los mismos significados que los frecuentemente utilizados por un experto habitual en la materia de la invención; Aunque algunas composiciones, métodos, artículos de fabricación u otros medios o materiales similares o equivalentes a los aquí descritos se pueden utilizar en la práctica de la presente invención, aquí se describen las composiciones preferidas, los métodos, artículos de fabricación u otros medios o materiales.

La invención

En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones adecuadas para modular la inmunidad, incrementar la eficacia de la vacuna, reducir la morbididad asociada a las infecciones crónicas por FHV-1 y/o prevenir o tratar la conjuntivitis en animales. Las composiciones comprenden como probiótico la *Enterococcus bacteria E. faecium cepa NCIMB 10415 (SF68*) en una cantidad eficaz para prevenir o tratar la conjuntivitis en los animales.

Se cree que administrar probióticos como la *Enterococcus faecium NCIMB 10415 (SF68)* a un animal aumenta el número de linfocitos CD4+ y afecta a la inmunidad y progresión de ciertas infecciones y enfermedades.

Los probióticos aquí mencionados comprenden al menos una de las cepas o subespecies adecuadas de enterococos. Las especies de enterococos, sin limitación alguna, la *Enterococcus faecium,* en particular la *cepa NCIMB 10415 (SF68)* así como otros enterococos como la *E. faecium* DSM 10663(M74), la *E. faecium* GHR 017 DSM 7134, la *E. faecium* CECT 4515, la *E. faecium* CL15/ATCC 19434, la *E. faecium* NCIMB 11181/DSM 5464, la *E. faecium* IMB 52/DSM 3530, la *E. faecium* CNCMMA 17/5U, la *E. faecium* 202 DSM 4788/ATCC53519, *E. faecium* 301 DSM 4789/ATCC 55593, *E. faecium* CL15/ATCC 19434, *E. faecium* EF-101 ATCC 19434, y *E. faecium* AK 2205 BCCM/LMG S-16555.

En una configuración, las composiciones de la invención son composiciones alimenticias para animales domésticos o animales de todo tipo. Estas incluyen alimentos previstos para proporcionar los requisitos dietéticos necesarios y alimentos aditivos a la dieta. Opcionalmente, las composiciones alimenticias para los animales domésticos pueden ser una composición seca, semihúmeda, húmeda o una mezcla de las mismas. En configuraciones especiales, las composiciones se formulan para ser consumidas por un felino, que incluye pero no se limita a un animal doméstico.

En otra configuración, las composiciones de la invención son productos alimenticios formulados para el consumo humano. Estas incluyen preferiblemente alimentos y nutrientes previstos para proporcionar los requisitos dietéticos necesarios de un ser humano así como otros suplementos para la dieta humana. En una configuración detallada, los productos alimenticios formulados para el consumo humano son completos y equilibrados desde el punto de vista nutricional.

En otra configuración, la composición es un suplemento dietético, como el jugo de carne, el agua potable, las bebidas, los concentrados líquidos, el yogur, los polvos, gránulos, pasta, suspensión, las golosinas, los trozos de comida, snack, bolitas, cápsulas, pastillas o cualquier otra forma de suministro. Los suplementos dietéticos pueden tener una fórmula especial para ser consumidos por un animal en particular, como un animal de compañía o no de compañía, en particular un felino, o un humano. En una configuración detallada, el suplemento dietético puede comprender una concentración elevada de probióticos de manera que el suplemento se pueda administrar en cantidades pequeñas, o bien de un modo alternativo, pueda ser diluido antes de ser administrado a un animal. El suplemento dietético puede requerir su mezcla con agua antes de la administración al animal. En una configuración, el suplemento está en una bolsita, solo o mezclado con otros probióticos o bien otros materiales.

La composición puede estar congelada. Los probióticos se pueden premezclar con los demás componentes de la composición para proporcionar las cantidades necesarias, se pueden revestir en una composición alimenticia, suplemento dietético o se pueden formular como producto alimenticio para el consumo humano, o bien se pueden añadir a la composición antes de ofrecérsela al animal, por ejemplo, usando un polvo o mezcla.

Las composiciones de la invención comprenden probióticos en una cantidad eficaz para prevenir o tratar la conjuntivitis. Los alimentos para mascotas y los productos alimenticios formulados para el consumo humano se pueden formular para contener probióticos en el intervalo de 10^2 a 10^{11} unidades formadoras de colonias (CFU) por gramo de composición. Los suplementos dietéticos se pueden formular para contener varias concentraciones de probiótico varias veces superiores, dispuestos para su administración a un animal en forma de un comprimido, tableta, cápsula, concentrado líquido u otra forma de dosificación similar, o bien ser diluidos antes de su administración, mediante su dilución en agua, pulverizado o bien su administración en forma de gotas en la comida para mascotas, y otros tipos de administración similares.

En una configuración, la concentración de probióticos en la composición es una función de la cantidad requerida para modular las funciones inmunitarias, lo que incluye un incremento en la proporción y/o cifras de linfocitos CD4+ en la sangre del animal. En otra configuración, la concentración de probióticos en la composición está en función de una cantidad requerida para incrementar la concentración de inmunoglobulinas reactivas frente a los antígenos de un patógeno especificado en el suero sanguíneo, las heces y las secreciones como la leche, las lágrimas y la saliva. El nivel de linfocitos CD4+ y la concentración de inmunoglobulinas en el suero sanguíneo, las heces y las secreciones como la leche, las lágrimas y la saliva del animal se puede determinar mediante cualquier método indicado por el experto en la materia.

Las composiciones de la invención pueden comprender opcionalmente sustancias suplementarias como vitaminas, sales, condimentos, colorantes y conservantes. Ejemplos no restrictivos de los minerales complementarios incluyen calcio, fósforo, potasio, sodio, hierro, cloro, boro, cobre, zinc, magnesio, manganeso, yodo, selenio y similares. Ejemplos no restrictivos de las vitaminas complementarias incluyen vitamina A, varias vitaminas B, vitamina C, vitamina D, vitamina E y vitamina K. Los suplementos dietéticos adicionales pueden estar incluidos, por ejemplo, niacina, ácido pantoténico, inulina, ácido fólico, biotina, aminoácidos y similares.

Las composiciones de la invención pueden comprender opcionalmente una o más sustancias suplementarias que promuevan o mantengan un sistema inmunitario sano. En una configuración, las composiciones de la invención comprenden además una o más sustancias eficaces para modular la inmunidad, incrementar la eficacia de la

vacuna, o reducir la morbididad asociada a las infecciones crónicas por FHV-1 en los animales. Dichas sustancias incluyen sin limitación alguna, la L-arginina, los esteroides como la 7-oxo dehidroepiandrosterona (7-oxy DHEA), carotenoides como alfa- y beta-caroteno, antioxidantes y extractos de hierbas como el astragalus y la equinacea.

En diversas configuraciones, el alimento animal o las composiciones del complemento dietético de la invención pueden comprender sobre una base de materia seca, entre un 15% y un 50% aproximadamente de proteína cruda, por peso de la composición. El material de proteína cruda puede comprender proteínas vegetales como la soja, semilla de algodón y los cacahuetes o proteínas animales como la caseína, albúmina y proteínas de la carne. Ejemplos no restrictivos de las proteínas de la carne aquí útiles incluyen cerdo, cordero, carne de caballo, ave, pescado y mezclas de las mismas.

Las composiciones pueden comprender además, sobre una base de materia seca, entre un 5% de grasa y aproximadamente un 40% de grasa, respecto al peso de la composición. Las composiciones pueden comprender además una fuente de carbohidrato. Las composiciones pueden comprender, sobre una base de materia seca, entre un 15% y un 60% de carbohidrato, respecto al peso de la composición. Los ejemplos no restrictivos de dichos carbohidratos incluyen granos o cereales como arroz, maíz, sorgo, alfalfa, cebada, soja, canela, trigo, avena y mezclas de todo ello. Las composiciones pueden comprender opcionalmente otros materiales como suero de leche deshidratado y otros productos lácteos.

Las composiciones pueden comprender también al menos una fuente de fibra que no exceda el 1% de la composición alimenticia final. Se puede utilizar una variedad de fibras solubles e insolubles conocidas por los expertos. La fuente de fibra puede ser pulpa de remolacha (de remolacha azucarera), goma arábiga, goma talha, pectina, fructooligosacáridos adicionales a la oligofructosa de cadena corta, fibra de soja, fibra de lupino, arabinogalactano, galactooligosacáridos, arabinoxilano o mezclas de los mismos. Alternativamente, la fuente de fibra puede ser una fibra fermentable. La fibra fermentable se ha descrito con anterioridad para aportar un beneficio al sistema inmunitario de los animales de compañía. La fibra fermentable o bien otras composiciones conocidas por los expertos que aportan una composición prebiótica que podría incrementar el crecimiento de los microorganismos probióticos dentro del intestino también se puede incorporar a la composición para ayudar a incrementar el beneficio aportado por la presente invención al sistema inmunitario de un animal.

En una configuración, la composición es un alimento para animales o mascotas completo y nutricionalmente equilibrado. En este contexto, el alimento para el animal doméstico puede ser una comida hidratada o deshidratada, o bien un alimento de un contenido intermedio en humedad, tal como reconocerían los expertos para la formulación y fabricación de dicho alimento. El “alimento húmedo o hidratado” describe un alimento que se vende habitualmente en latas o bolsas y tiene un contenido en humedad del orden del 70% al 90%. La “comida seca” describe el alimento que tiene una composición similar a la de la comida hidratada pero contiene un contenido en humedad limitado, en general del 5% al 15%, y por tanto se presenta como pienso para mascota a modo de galletas pequeñas. Las composiciones y los suplementos dietéticos se pueden formular para animales adultos, o para animales mayores o jóvenes, por ejemplo, “papeo para cachorros de perro”, “papeo para cachorros de gato” o fórmulas para animales mayores. En general, estas fórmulas contienen requisitos energéticos y nutricionales apropiados para animales en las distintas etapas de su crecimiento.

Ciertos aspectos de la invención se han usado preferiblemente en combinación con un alimento equilibrado y completo (por ejemplo, tal como se describe en el National Research Council, 2006, Nutritional Requirements for Dogs and Cats, National Academy Press, Washington D.C., o Association of American Feed Control Officials, Official Publication 1996). Es decir, se utilizan preferiblemente composiciones que comprenden probióticos de acuerdo con ciertos aspectos de la invención con un alimento de alta calidad. Tal como aquí se indica, el “alimento comercial de alta calidad” se refiere a una dieta fabricada para producir la digestibilidad de los nutrientes clave de un 80% o superior, tal como se ha establecido en las recomendaciones del National Research Council para perros y gatos, o en las directrices fijadas por la Association of American Feed Control Officials. También se podrían utilizar niveles altos de nutrientes similares para otros animales.

El experto entiende como determinar la cantidad apropiada de probióticos que debe añadirse a una composición determinada. Dichos factores que se pueden tener en cuenta incluyen el tipo de composición (por ejemplo, composición del alimento para mascotas, suplemento dietético, o producto alimenticio formulado para el consumo humano), el consumo medio de distintos tipos de composiciones por parte de animales distintos y las condiciones de fabricación bajo las cuales se prepara la composición. Las concentraciones de probióticos que se van a añadir a la composición se pueden calcular sobre la base de los requisitos de energía y nutrientes del animal. De acuerdo con ciertos aspectos de la invención, los probióticos se pueden añadir en cualquier momento durante la fabricación y/o el procesamiento de la composición. Esto incluye, sin limitación alguna, como parte de la formulación de la composición del alimento para la mascota, el suplemento dietético o el producto alimenticio formulado para el consumo humano, o bien como un revestimiento que se aplica a la composición de la comida para animales domésticos, un suplemento dietético, o un producto alimenticio formulado para el consumo humano.
Las composiciones pueden preparase de acuerdo con cualquier método adecuado, por ejemplo, que se haya descrito en el libro de Waltham de la Nutrición para gatos y perros, Ed. ATB Edney, capítulo por A. Rainbird, titulado “Una dieta equilibrada” en las páginas 57 a 74, Pergamon press Oxford.

En varias configuraciones de la composición, los probióticos están en la composición como un ingrediente o como un aditivo o están en la composición, por ejemplo, pulverizados por la composición.

Los probióticos se administran usando cualquier método para administrar probióticos a un animal. En una configuración, los probióticos son administrados por vía oral usando una composición de la presente invención, que incluye una composición de alimento para animales domésticos, un suplemento dietético o un producto alimenticio formulado para el consumo humano.

Siempre que una persona pretenda proporcionar la composición a un animal, su actuación deberá ser tal que instruya e informe al ser humano que el uso de la composición puede y/o proporcionará las ventajas mencionadas, por ejemplo, la modulación de la inmunidad o el incremento de la eficacia de la vacuna en el animal. Dicha instrucción puede ser una instrucción oral (es decir, la instrucción oral de un médico, veterinario u otro profesional de la salud, o los medios de radio o televisión (es decir, anuncios), o bien una instrucción por escrito (por ejemplo, a través de la receta escrita por un médico, veterinario u otro profesional de la salud (por ejemplo, recetas), artículos de venta profesional (por ejemplo, folletos de marketing, panfletos u otro tipo de parafernalia instructiva), medios escritos (por ejemplo, internet, correo electrónico u otros medios relacionados con el ordenador), y/o envase asociado a la composición (por ejemplo, una etiqueta presente en el envase de la composición).

La administración se puede realizar sobre una base deseada o mensual, por ejemplo, una vez al mes, una vez a la semana, diariamente o más de una vez al día. Del mismo modo, la administración puede ser otro día, semana o mes, cada tercer día, semana o mes, cada cuarto día, semana o mes. La administración puede ser varias veces al día. Cuando se utiliza como suplemento a los requisitos dietéticos ordinarios, la composición se puede administrar directamente al animal o bien mezclada con la comida diaria. Cuando se utiliza como alimentación diaria dicha administración debe ser conocida por los expertos habituales.

La administración también se puede llevar a cabo sobre una base regular, por ejemplo, como parte de un régimen dietético en el animal. Un régimen dietético puede consistir en la ingesta regular por parte del animal de una composición que comprenda uno o más probióticos en una cantidad eficaz para modular la inmunidad o bien incrementar la eficacia de la vacuna en el animal. La ingesta regular puede ser una vez al día o a la semana. Del mismo modo, la administración regular puede ser cada día o semana, cada tercer día o semana, cada cuarto día o semana, cada quinto día o semana, cada sexto día o semana y según el régimen dietético la administración puede ser varias veces al día. El objetivo de la administración regular es dar al animal la dosis diaria de probióticos preferida, tal como se indica más adelante.

Tal como aquí se ha descrito, la administración de las composiciones que consiste en uno o más probióticos, incluye la administración como parte de un régimen dietético, que se puede extender un periodo de tiempo desde la gestación hasta toda la vida del animal.

En una configuración, los probióticos modulan una inmunidad innata en el animal. En otra, los probióticos modulan la respuesta inmunitaria adaptativa en el animal. En otra, los probióticos incrementan la eficacia de las vacunas administradas a un animal. En otra, los probióticos reducen la morbidad asociada a las infecciones crónicas por FHV-1. En una configuración preferida, los probióticos incrementan la eficacia de las vacunas frente a FHV-1, FCV y FPV en el animal.

En algunas configuraciones, la vacuna es para panleucopenia viral felina, la rinotraqueititis viral felina o el calcivirus felino.

La dosis diaria de probióticos se puede medir en términos de unidades que forman colonias (CFU) administradas por animal al día. La dosis diaria de probióticos puede oscilar entre 10^5 y 10^2 CFU/diarios. Más preferiblemente, la dosis diaria de probióticos oscilará entre 10^7 y 10^9 CFU/día. Más preferiblemente, la dosis diaria de probióticos es de 10^8 a aproximadamente 10^9 CFU/día. Más preferiblemente, la dosis diaria de probióticos es de 10^8 CFU/día. En una configuración, los probióticos son administrados junto a una o más medicaciones para la conjuntivitis.

En particular, la presente invención se refiere a los miembros de los félidos, la familia de los gatos, a los que se puede aplicar la invención en aquellos casos donde el gato está disponible para recibir la administración de la composición probiótica (por ejemplo, en un zoo, en unas instalaciones veterinarias, en una reserva animal y en algún otro lugar similar). Además del gato doméstico, *Felis cattus,* los félidos incluyen miembros de los géneros: (1) *Acinonyx,* como el guepardo (*A. fubatus),* (2) *Neofelis*, como el leopardo moteado *(N. nebulosa)*, (3) *Panthera*, como el león *(P. leo),* jaguar (*P.onca)*, leopardo *(P. pardus)*, tigre (*P. tigris)*; (3) *Uncia,* como el leopardo de nieve (*U. uncial)*; (4)*Puma*, como el puma, león de la montaña o puma *(P. concolor)* y (5) varias especies de gatos no domesticados *(Felis)*, que incluyen pero no se limitan al gato Bornean bay (*F. badia)*, Caracal *(F. caracal)*, gato del desierto chino /*F.bieti*), gato de la jungla(*F. chaus)*, gato de arena *(F. margarita)*, gato de patas negras *(F.nigripes)*, gatos salvajes (*F. sylvestris, F. lybica),* jaguarondi (*F. yagouraroundi)*, ocelote (*F. pardalis)*, oncilla (*F. tigrina)*, margay (*F. wieldi)*, serval (*F.serval)*, lince (*F. Lynx),* bobcat *(F. rufus),* pampas cat (*F. colocolo)*, el gato de Geoffroy *(F. geoffroyi)*, gato andino (*F. jacobita),* gato de Pallas *(F. manul),* F. kodkod o gato guiña *(F. guigna),* gato leopardo (*F. bengalensis, F. iriomotensis),* gato de cabeza plana */F. planiceps),* gato moteado (*F. rubuginosus)*, gato para

pescar *(F.viverrina).* y el gato dorado africano *(F. aurata).* Tal como aquí se utiliza, el término “felino” hace referencia a los miembros de la familia de los gatos a menos que se especifique otra cosa.

En otro aspecto, la presente invención permite el uso de una composición que comprenda microorganismos probióticos como el género de bacterias Enterococo *E. Faecium* cepa NCIMB 10415 (SF68) para preparar un medicamento. La invención también permite el uso de dicha composición para preparar un medicamento que prevenga o trate la conjuntivitis en los animales. En general, los medicamentos se preparan mezclando uno o más probióticos de la invención con excipientes, tampones, aglutinantes, plastificantes, colorantes, diluyentes, agentes de compresión, lubricantes, agentes humectantes, aromatizantes y otros ingredientes que se sabe son útiles para fabricar medicamentos y formular medicamentos útiles para ser administrados a un animal. El medicamento contiene los probióticos en cantidades útiles para prevenir o tratar la conjuntivitis en animales.

EJEMPLOS

La invención se puede ilustrar además por medio de los ejemplos siguientes, aunque se entiende que estos ejemplos se han incluido meramente para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención a menos que se indica de forma específica.

Ejemplo 1

Animales y parámetros experimentales

Población de estudio de felinos. Gatitos SPF de seis semanas de edad se compraron a los laboratorios Liberty (Liberty, NY), Los gatitos eran seronegativos para el antígeno del virus de leucemia felino y para los anticuerpos del virus de inmunodeficiencia felino por ELISA. (Snap Combo, IDEXX Laboratories, Portland, ME).

Diseño experimental. Después de un periodo de equilibrio de 10 días, los gatitos se distribuían aleatoriamente en dos grupos de diez gatitos cada uno y el estudio de tratamiento se iniciaba a la edad de 7 semanas. Se añadían entre 0,25 y 0,28 g (~$5x10^9$ CFU basado en ensayos de recuento por dilución) de LBC ME5 PET *E. faecium* NCIMB *10415* (SF68)(Cerbios-Pharma SA, Suiza) a tubitos de centrífuga individuales de 50 ml, de polipropileno, de base cónica y se guardaban a 4ºC durante el estudio. Preparaciones similares se utilizaban para partes alícuotas del producto que incrementa la palatabilidad (se usaba un revestimiento típico de alimento para mascota que comprende un digestivo hepático como componente principal) usando 150 mg por tubo. Las partes alícuotas se controlaban para la absorción de agua y se desechaban si aparecía algún grumo de probiótico o sustancia que incrementa la palatabilidad. Justo antes de la administración, una parte alícuota del producto que incrementa la palatabilidad se transfería a uno de los tubos SF68 guardados (grupo de tratamiento) o bien a un tubo vacío (grupo de placebo) y se diluía usando agua corriente a temperatura ambiente hasta un volumen total de 10 ml. El contenido se agitaba durante al menos tres minutos y se usaba una jeringa de 12 cc para su aspiración. Inmediatamente después de agitar la suspensión, los gatitos apropiados recibían por vía oral 1 ml de SF68 (dosis total diaria $5x10^8$ CFU al día) o de potenciador de la palatabilidad (gatitos placebo) hasta que éstos tenían 27 semanas. Ambos grupos se alimentaban con comida deshidratada *ad libitum* (se usaba una fórmula de crecimiento típica de los gatitos que cumple los requisitos de la AAFCO y se basa en arroz y pollo como ingredientes principales) y se colocaban en dos salas distintas para evitar la contaminación de cruce con el probiótico. A las 9 y 12 semanas de edad, todos los gatitos se habían vacunado por vía subcutánea con una vacuna modificada (Pfizer Animal Health, Exton, PA) para el herpesvirus-1 felino, el calcivirus y el virus de la panleucopenia, tal como recomendaba la American Association of Feline Practitioners (Richards J *et al.*(2001)).

Evaluación estadística. Para cada fecha de muestreo se calculaban los valores medios del grupo para todos los parámetros medidos. Las diferencias entre el grupo tratado con probióticos y el grupo de placebo se analizaban usando un modelo ANOVA mixto para un experimento de medidas reiterado. Se incluía el tiempo en el modelo como una variable continua. Los porcentajes de muestras de gato positivas para la enterotoxina *C. perfringens* o las toxinas *C. difficile* A ó B y los porcentajes de células positivas para los marcadores de la superficie celular se calculaban para cada grupo de gatos durante todo el estudio y se comparaban mediante una prueba o test t de doble cola (GRAPHPAD Prism, GRAPHPAD Software, Inc., San Diego, CA). La significancia estadística era $p<0,05$.

Ejemplo 2

Recogida de muestras y control clínico

Las actitudes y el comportamiento de los gatitos se controlaban diariamente durante el estudio. El peso corporal se medía cada semana. Se recogía la sangre, saliva y heces de todos los gatos antes de iniciar la suplementación probiótica o de potenciador de la palatabilidad a las 7 semanas de edad y a las 9, 15, 21 y 27 semanas. Además, se recogían las heces de los gatitos en el grupo de tratamiento a las 28 semanas de edad. Para cada grupo de gatitos se seleccionaban al azar 5 muestras fecales al día de la caja con la arena sanitaria compartida y se evaluaban usando una tarjeta de evaluación gráfica estandarizada y se determinaba la media del grupo diaria. Los extractos

fecales para la medición de la IgA total y la IgG total se trataban según el protocolo descrito por Benyacoub J *et al.*(2003). Todas las muestras se almacenaban a -80ºC hasta su evaluación en lotes.

Las heces de todos los gatitos eran normales al principio del periodo de suplementación (7 semanas de edad). Un gatito en cada grupo se retiraba del estudio por motivos no relacionados con el estudio y por lo tanto se retiraba del análisis final de datos. El peso corporal y los valores fecales no eran distintos estadísticamente entre los dos grupos con el tiempo o bien en cualquier momento en particular (figura 1).

Los recuentos de células sanguíneas, los parámetros bioquímicos y los pesos corporales eran similares entre los grupos de gatos durante el transcurso del estudio. Los valores fecales eran similares entre los grupos y eso sugería que el uso de SF68 en la dosificación aquí descrita no inducirá signos clínicos raros destacados.

Ejemplo 3

En cada fecha de muestreo, las heces de cada gatito se colocaban en ocho diluciones diluidas 10 veces en agar de streptococcus KF y se incubaban durante 48 horas a 37ºC aeróbicamente. Diez colonias de cada tipo de morfología se retiraban usando pinzas estériles y se colocaban en un medio de infusión (BHI) cerebro-corazón (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y se almacenaban a -80ºC. El RAPD-PCR se realizaba sobre aislados bacterianos de cada muestra para determinar si existía *E.faecium* NCIMB 10415 viable (SF68) en las heces de los gatos tratados y para evaluar si el probiótico era transmitido accdentalmente de los gatitos tratados a los gatos de control. Los parámetros del termociclador eran los siguientes: 30 ciclos de un minuto de desnaturalización a 95ºC, un minuto de recocido 40ºC, cuatro minutos a 72ºC. La mezcla de reacción de 25,5 µL incluía 2,45 µL de tampón sin magnesio* 10x (100 mMTris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), $MgCl_2$ 3.22 mM, 0,4 µL (1 unidad), polimerasa JumpStart Taq ADN (sigma D-4184, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO), 1,9 µL de mezcla de dNTP (2,5-mM), 1µL de primer (100µM), 15,47µL de agua PCR y 1 µL de cultivo bacteriano. La secuencia del primer usado era 5'-GGTTGGGTGAGAATTGCACG-3'. Cinco a diez µL del producto PCR se hacían pasar por gel de agarosa en un 2% y modelos de cinta se comparaban con un control positivo SF68. Se utilizaba ELISA, disponible en el comercio para determinar si las enterotoxinas Clostridum perfringens o bien las toxinas *C. difficile* A/B estaban presentes en las heces de todos los gatitos. *(C. Perfringens(*ELISA, kit nº 92-000-22) y *C. difficile* (ELISA, kit nº 94-0150-KT), Techlabs, Blacksburg, VA). Los cultivos fecales aeróbicos rutinarios para *Salmonella spp.* y *Campylobacter spp.* se realizaban en el laboratorio de diagnóstico de la universidad del estado de Colorado.

Las heces de siete de los nueve gatos de tratamiento daban positivo para SF68 en al menos un momento durante el estudio. Sin embargo, el ADN del SF68 no se amplificaba de las heces de ningún gato tratado 1 semana después de interrumpir la suplementación (semana 28). Ni *la Salmonella spp.* ni *Campylobacter spp.* crecían en las heces. Todas las muestras de gatos placebo eran negativas para SF68 mediante RAPD PCR. Los números de muestras positivas para toxinas *C.difficile* A/B ó C o la enterotoxina *C. perfringens* (tabla 1) no variaban entre los grupos durante todo el estudio.

Salmonella spp, y Campylobacter spp., su protección no se veía inducida por la suplementación de SF68. Varias muestras fecales. Varias muestras fecales en ambos grupos de gatitos eran positivas para las toxinas *C. difficile y C. Perfringens*; sin embargo no existía una diferencia significativa en el número de muestras positivas entre grupos y los resultados positivos no se correlacionaban con la presencia de diarrea. Se detectaba SF68 en las heces de la mayoría de gatos tratados durante el periodo de suplementación, pero ya no se volvía a detectar en las heces 1 semana después de interrumpir la suplementación lo que indicaba que el organismo persistía en los gatos únicamente de forma transitoria. Por consiguiente, la administración de SF68 usando la dosis aquí descrita no tiene efectos perniciosos y es segura para la administración en el periodo de tiempo estudiado.

Ejemplo 4

Ensayos inmunológicos

Los recuentos de sangre entera, los paneles bioquímicos de suero, paneles bioquímicos de suero y los análisis de orina se realizaban en el laboratorio de patología clínica en la universidad del estado de Colorado. Se estimaban respuestas inmunitarias humorales específicas al antígeno midiendo IgG específico del FHV-1 en suero, IgA específico del FHV-1, IgG específico del FCV y IgG específico de la panleucopenia felina en suero así como los niveles de IgG y IgA específicos del FHV-1 en saliva usando adaptaciones de ensayos ELISA anteriormente publicados. (Lappin MR *et al.(2002)*; y Ditmer DA et al. (1998). Tanto para IgG como IGa específicos del FHV-1 los resultados se calculaban tanto por la absorbancia media para los pozos de prueba por triplicado para cada muestra y mediante el cálculo del porcentaje de unidades ELISA (absorbancia media de la muestra de prueba menos la absorbancia media de la muestra de control negativo/absorbancia media de la muestra de control positiva menos la absorbancia media de la muestra de control negativa multiplicado por 100). Para FCV y FPV, se usaban absorbancias medias. Las concentraciones totales de IgG e IgA en suero, extractos fecales y saliva se calculaban usando ensayos ELISA disponibles en el comercio o bien la inmunodifusión radial (Bethyl Laboratories Inc. Montgomery, TX).

Las respuestas inmunitarias celulares se evaluaban por medio de citometría de flujo y ensayos de proliferación de la sangre entera. La citometría de flujo se realizaba en las 12 horas de la recogida de la sangre usando 500 µL de sangre (EDTA) anti coagulada incubada a temperatura ambiente en tampón de lisis de glóbulos rojos (0,155 M MH_4Cl/0,010 $MKHCO_3$/5 x 10^{-4}% de Fenol rojo (0,5%). Las células se lavaban dos veces con PBS y los gránulos celulares resultantes se volvían a suspender en tampón FACS que contenía PBS, un 0,1% de azida sódica y un 2% de suero bovino fetal para conseguir una concentración de $1x10^6$ células/100µL si era posible. Las muestras con células insuficientes para al menos 500 µL de la suspensión anterior se contaban y se registraba la concentración celular. Cien µL de cada suspensión celular se añadían a cultivos individuales en una placa de cultivo 96 de base redonda para su tinción inmunitaria. No se bloqueaba ningún enlace no específico al añadir un 10% de suero normal de gato. (Jackson InmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA). La tinción inmunitaria se realizaba a 4ºC en la oscuridad en el tampón FACS. Los linfocitos se teñían para la expresión del CD4 y CD8 (anticuerpos vpg34; anti-CD4-FITC, vpg9; anti-CD8-RPE ; Serotec, Raleigh, NC(Oxford, UK) y expresión de CD44 (IM7; anti-CD44-PE/CY5 anticuerpo; Pharmingen, Franklin Lakes, NJ). Para el análisis de las células B, se teñía la sangre entera lisiada con anticuerpos reactivos al B220 (ra3-b62; anti-H220-anticuerpo biotinilado; eBioscience, San Diego, CA), CD21 (b-ly4;anti-CD21-APC anticuerpo; BD-Biosciences, Franklin Lakes, NJ) y clase MHC II (anti-MHC class II-FITC anticuerpo; clone CAG5-3DI, Serotec, Raleigh, NC(Oxford, UK)). Las células para el análisis se cerraban en poblaciones de linfocitos in vivo en base a características de dispersión lateral y frontal. Los datos se recogían en un citómetro Cyan MLE y se analizaban usando Summi software. (Dako-Cytomation, Fort Collins,co).

Los ensayos de proliferación se realizaban por triplicado usando 10 µL de sangre entera heparinizada preacondicionada mediante la incubación en 100µL de medio tumoral completo a 37ºC con un 5% de CO_2 durante 30 minutos antes de la adición del mitógeno o antígeno. (Medio tumoral completo: medio de Eagle modificado complementado con aminoácidos esenciales y no esenciales + 10% FBS). Las células se mantenían en el medio sólo (no estimulado) o bien estimulado con concanavalin A (10 µg/ml:Con A, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) o bien un preparado de antígeno de FHV-1 (1 µL/placa, preparado antes de iniciar el estudio y almacenado en partes alícuotas a -80ºC) durante 96 horas a 37ºC con un 5% de CO_2 (Veir JK y cols. (2005)). Las células se trataban con 1 µ Ci de timidina por placa y se cultivaban 18 más tarde en esteras de filtro de fibra de vidrio (Wallac-Microbeta Perkin-Elmer, Boston, MA). Se leían las esteras usando un contador de escintilación líquido MicroBetas. El índice de estimulación medio (recuento máximo medio por muestra estimulada dividido por el recuento máximo medio por muestra no estimulada) se calculaba para todas las muestras.

Los recuentos de sangre entera y los perfiles bioquímicos estaban dentro de los límites normales para el grupo de edad para todos los gatos en todo momento. No existía diferencia significativa entre los grupos con el tiempo o en cualquier momento entre los ensayos analizados. A las 21 y 27 semanas de edad, los niveles medios de IgA específica del FHV-1 en suero y saliva eran numéricamente superiores en el grupo de tratamiento si se comparaban con el grupo placebo, pero las diferencias no eran significativas (figura 2). A las 15, 21 y 27 semanas de edad los niveles de IgG de suero específicos del FHV-1 eran numéricamente superiores en el grupo de tratamiento si se comparaban con el grupo placebo usando ambos ensayos, pero no eran diferentes desde el punto de vista estadístico (figura 3). No se detectaba IgG específico del FHV-1 en saliva. Los niveles de IgG específicos del FHV-1 en suero eran similares en ambos grupos (figura 4). A las 15 semanas, los niveles medios de IgG específico de FHV-1 en suero del grupo de tratamiento eran numéricamente superiores a los del grupo placebo pero las diferencias no eran significativas desde el punto de vista estadístico (figura 5).

Las concentraciones de IgG e IgA total en suero eran similares en los dos grupos (no se muestran datos). No se detectaba IgG total en saliva y las concentraciones totales de IgA en saliva eran similares en los dos grupos (no se muestran datos). A las 27 semanas de edad, las concentraciones medias del grupo de tratamiento del IgG total en extractos fecales eran numéricamente superiores a las del grupo placebo, pero las diferencias no eran estadísticamente distintas (figura 6). Las concentraciones de IgA total en extractos fecales eran similares entre grupos (figura 6).

Los ensayos de proliferación usando 10 µg/ml de concanavalin A o bien 1 µL de preparación de antígeno de FHV-1 como estimulantes no producían recuentos máximos medios distintos significativamente entre grupos en distintos momentos. No existían diferencias estadísticas entre los grupos para marcadores de superficie celular en los cuatro primeros tiempos (figura 7). A las 27 semanas de edad, el grupo de tratamiento (media de 13,87%) tenía un porcentaje notablemente superior de linfocitos positivos para CD4 que el grupo placebo (media 10,61%, p=0,0220). Ninguna otra comparación era significativa desde el punto de vista estadístico.

El aumento de recuentos de CD4+ en el grupo de tratamiento respecto al grupo placebo sin un aumento concurrente de recuentos de CD8+ a las 27 semanas de edad demuestra los efectos moduladores sistémicos del sistema inmunitario por los probióticos.

Después de las vacunaciones, los gatitos desarrollaban respuestas de anticuerpos en suero específicas del FHV-1, FCV y FPV que son similares a otros estudios indicando que eran inmunocompetentes y que la vacuna viva modificada usada era viable. (Lappin MR *y cols* (2002*)*). Algunos de los resultados reflejan también la alimentación usando probióticos y la respuesta inmunitaria mediada por las células de estos gatitos. Esto incluye la detección de recuentos de linfocitos CD4+ significativamente superiores desde el punto de vista estadístico a las 27 semanas y

valores medios numéricamente superiores para la IgA específica del FHV-1 en suero y saliva a las 21 y 27 semanas de edad, niveles de IgG específicos del FHV-1 en suero a las 15, 21 y 27 semanas de edad, niveles de IgG específicos del FPV en suero a las 15 semanas de edad en comparación con el grupo placebo.

Ejemplo 5

Efecto de la bacteria probiótica *Enterococcus* en la conjuntivitis

Gatos de ambos sexos adultos jóvenes con infección crónica por FHV-1 (n=12) se transferían de otro estudio y recibían SF68 o placebo durante un periodo de 5,5 meses. Diariamente se controlaba la conjuntivitis, la descarga nasal y los estornudos durante un periodo de equilibrio y después de la suplementación. Durante el periodo de suplementación, los gatos se trasladaban de jaulas en grupo a jaulas individuales y se esterilizaban quirúrgicamente para intentar activar la infección latente por FHV-1. Se controlaba la conjuntivitis en los animales.

Los resultados muestran que en general la conjuntivitis era frecuente apareciendo en 122 de 750 (16,3%) y 210 de 755(27,8%) de los puntos de observación para gatos tratados con SF68 y gratos placebo, respectivamente. Durante el periodo de equilibrio, las cifras en los puntos de observación donde la conjuntivitis era patente no variaban entre los dos grupos pero tras iniciar la administración de SF68 o placebo, los gatos que recibían SF68 tenían menos episodios de conjuntivitis que los gatos placebo en cada periodo de tratamiento. Los resultados muestran que el SF68 disminuía la morbididad asociada a las infecciones crónicas por FHV-1.

En la especificación se muestran las configuraciones típicas preferidas de la invención y aunque se emplean términos específicos, se han utilizado en un sentido genérico y descriptivo únicamente y no para fines de limitación y el alcance de la invención queda claro en las reivindicaciones.

LISTADO DE LA SECUENCIA

<110> Knorr, Ruth Cavadini, Christoph Benyacoub, Jalil Satyaraj, Ebenezer

<120> Composiciones que comprenden enterococos probióticos para mejorar la inmunidad

<130> 48509-1015-00-US (NO 7991 US)

<140> 11/544, 120
<141> 2006-10-06

<150> US 60/724, 214
<151> 2005-10-06

<160> 1

<170> Versión 3.3

<210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Primer

<400> 1
Ggttgggtga gaattgcacg

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende las bacterias probióticas *Enterococcus E.faecium* cepa NCIMB 10415 (SF68) para prevenir o tratar la conjuntivitis causada por el FHV-1 en un felino.

2. Composición para utilizar conforme a la reivindicación 1, donde la composición es una composición de alimento para animales o un suplemento dietético.

3. Composición para utilizar conforme a cualquiera de las reivindicaciones, donde la bacteria probiótica *Enterococcus* está presente en una cantidad de al menos 10^2 hasta 10^{11} unidades formadoras de colonias (CFU) por gramo de la composición.