

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 808**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2015.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2013** **E 13382407 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016** **EP 2862576**

54 Título: **Microorganismos y composiciones que los comprenden para su uso en el tratamiento o prevención de mastitis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.06.2017**

73 Titular/es:

**CASEN RECORDATI, S.L. (100.0%)**  
**Autovía de Logroño, km. 13,300**  
**50180 Utebo (Zaragoza), ES**

72 Inventor/es:

**BELLO NAVARRO, MARTA;**  
**TABUENCA NAVARRO, DANIEL;**  
**RODRÍGUEZ GÓMEZ, JUAN MIGUEL;**  
**FERNÁNDEZ ÁLVAREZ, LEÓNIDES y**  
**JIMÉNEZ QUINTANA, ESTHER ANTONIA**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

ES 2 615 808 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Microorganismos y composiciones que los comprenden para su uso en el tratamiento o prevención de mastitis.

- 5 La presente invención se refiere a nuevos enfoques para prevenir y tratar mastitis en animales, que incluyen seres humanos. La invención también se basa en nuevas cepas de *Lactobacillus* aisladas y en composiciones que las comprenden.

TÉCNICA ANTERIOR

10

La mastitis es la inflamación del tejido de la mama, concretamente de uno o más lóbulos de la glándula mamaria, es una enfermedad común durante la lactancia ya que su incidencia oscila entre el 3 y el 33% de las madres lactantes. La mastitis por lactancia normalmente tiene un origen infeccioso. Tradicionalmente, *Staphylococcus aureus* es el organismo etiológico más común responsable, pero *Staphylococcus epidermidis* y estreptococos también se aíslan ocasionalmente, siendo *Staphylococcus epidermidis* una causa emergente en la medicina y veterinaria.

15

La mastitis normalmente se desarrolla cuando la leche no se extrae adecuadamente de la mama. La ectasia de la leche puede hacer que los conductos galactóforos en las mamas se bloqueen, ya que la leche de la mama no se ha sacado apropiadamente y regularmente. En seres humanos también se ha sugerido que los conductos galactóforos bloqueados pueden producirse como resultado de presión sobre la mama, tal como ropas apretadas o un sujetador muy apretado, aunque hay escasas pruebas para esta suposición. La mastitis puede producirse cuando el bebé no se pega apropiadamente a la mama cuando se alimenta, cuando el bebé tiene tomas poco frecuentes o tiene problemas al succionar la leche de la mama.

20

El término mastitis varía dependiendo de la región geográfica. Fuera de los EE.UU. se usa comúnmente para casos puerperales y no puerperales, en los EE.UU. el término mastitis no puerperal se usa raramente y nombres alternativos tales como ectasia ductal, absceso subareolar y mastitis de células plasmáticas son usados más frecuentemente. La mastitis puerperal es la inflamación de la mama a propósito de un embarazo, lactancia o destete. El término mastitis no puerperal describe lesiones inflamatorias de la mama que se producen sin relacionar con el embarazo y la lactancia. Nombres para mastitis no puerperal no se usan muy coherentemente e incluyen mastitis, absceso subareolar, ectasia ductal, inflamación periductal, enfermedad de Zuska y otros.

30

Los síntomas más comunes de la mastitis incluyen dolor de mama con la palpación (calor al tacto), sensación de malestar, hinchazón de mama, dolor, rojez, fiebre (38,3 °C o más en ser humano), síntomas similares a la gripe que incluyen dolores, escalofríos y sensaciones de frío, ansiedad, estrés y fatiga.

35

La mastitis en animales también es una cuestión importante, en particular en ganado, en el que es una cuestión importante debido a que la leche de ubres afectadas de ganado puede entrar en el suministro de alimentos y plantear un riesgo para la salud. Además, es una afección importante en algunas especies, como las vacas lecheras, cabras y ovejas, teniendo un importante impacto económico sobre la industria lechera. También es de importancia para la salud pública.

40

El tratamiento de mastitis se realiza administrando antibióticos para infecciones normalmente producidas por bacterias de la piel o la boca de bebés amamantados que entran en los conductos galactóforos mediante lesiones o la apertura de los pezones.

45

Como comúnmente se conoce en la técnica, el uso de antibióticos implica varias desventajas, no solo debido a la baja especificidad del tratamiento, sino también, y en parte, en consecuencia, en términos de efectos adversos secundarios. Así, es común que los antibióticos de amplio espectro o dirigidos hacia Gram-positivas sean poco eficaces para algunas infecciones producidas por cepas estreptocócicas y estafilocócicas que causan mastitis. Además, el tratamiento con antibióticos puede producir el desequilibrio de la microbiota autóctona, y puede eliminar la flora protectora comensal del tejido de la mama o leche de la mama, al igual que de los intestinos y otros tejidos, promoviendo la colonización de algunos patógenos.

50

Por estos motivos se han estudiado composiciones alternativas y activas con el fin de sustituir en la medida de lo posible el uso de antibióticos. Entre ellas se han probado varios probióticos para el tratamiento de mastitis en mujeres.

55

A modo de ejemplo se menciona el documento de Arroyo y col., "Treatment of Infectious Mastitis during Lactation: Antibiotics versus Oral Administration of Lactobacilli Isolated from Breast Milk", *Clinical Infectious Disease* – 2010, vol. nº 50(12), pág.: 1551-1558. Este documento desvela el uso de dos cepas de *Lactobacillus*, *Lactobacillus fermentum* (CECT 5716) y *Lactobacillus salivarius* (CECT 5713), ambas aisladas de leche de mama humana, como

60

una buena alternativa a antibióticos para tratar la mastitis. Sin embargo, como se indica en Arroyo et al., *Lactobacillus fermentum* (CECT 5716) produjo flatulencia en muchas de las mujeres tratadas.

Otro documento en el que se describen diferentes especies de *Lactobacillus* para el tratamiento de mastitis es la solicitud de patente EP1997499 (Puleva Biotech). Esta solicitud de patente desvela un procedimiento para aislar cepas probióticas de leche de mama de mamífero. El documento también menciona, entre otras, algunas cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* para su uso en el tratamiento de mastitis producida por *Staphylococcus aureus* en un modelo animal. Aunque se menciona para este uso, no se proporcionan datos en un ensayo de mastitis humana real.

Aunque se han hecho varios esfuerzos en este campo, aun así hay una necesidad de compuestos alternativos y composiciones para el tratamiento de la mastitis, y en particular, de compuestos que, aunque tengan un efecto terapéutico o profiláctico, puedan administrarse viablemente, y no lleven los efectos adversos secundarios de antibióticos.

#### DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

Los inventores han encontrado que las especies *Lactobacillus paraplantarum* pueden emplearse para mejorar, prevenir o tratar toda la sintomatología asociada a mastitis en animales, que incluyen seres humanos. Sorprendentemente, cuando se administra a seres humanos que padecen mastitis, el uso de *Lactobacillus paraplantarum* permite una curación más rápida que la promovida por el uso de antibióticos (antibióticos de estrecho y amplio espectro). Además, *Lactobacillus paraplantarum* permite una mejor y mayor eliminación de patógenos de la mama, al mismo tiempo que se minimizan los efectos adversos secundarios, asociados y no asociados a la administración de antibióticos. Según el conocimiento de los inventores, es la primera vez que se ha demostrado que *Lactobacillus paraplantarum* es eficaz en mastitis.

Además, por primera vez una cepa de *Lactobacillus paraplantarum* ha sido aislada de leche de mama humana.

Aunque se han aislado algunas cepas de *Lactobacillus plantarum* de leche de mama y de heces de madres y bebés, éstas se corresponden con una especie diferente (Albesharat R y col. "Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies", Syst Appl Microbiol. - 2011 vol. N° 34(2), pág.:148-55). Las cepas más frecuentemente aisladas pertenecen a las siguientes especies: *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus fermentum*.

Así, en un primer aspecto la invención se refiere a una cepa de *Lactobacillus paraplantarum* depositada en la "Colección española de Cultivos Tipo (CECT)" bajo el número de acceso CECT 8394 aislada, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de mastitis. La cepa aislada para su uso en el tratamiento de mastitis es para su uso en cualquier mamífero, que incluye seres humanos.

Este aspecto puede formularse como el uso de la cepa aislada de *Lactobacillus paraplantarum*, depositada en la "Colección española de Cultivos Tipo (CECT)" bajo el número de acceso CECT 8394, para la fabricación de un medicamento, una composición comestible o nutritiva para el tratamiento y/o la prevención de mastitis en un animal, que incluye un ser humano. La presente descripción también se refiere a un procedimiento para el tratamiento o la prevención de mastitis, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la cepa de *Lactobacillus paraplantarum*, depositada en la "Colección española de Cultivos Tipo (CECT)" bajo el número de acceso CECT 8394, o una composición farmacéutica, o una composición nutritiva que comprende al menos esta cepa de *Lactobacillus paraplantarum*, junto con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables, o componentes comestibles, en un sujeto o individuo en necesidad del mismo, que incluye un ser humano.

Usando composiciones que comprenden la mayoría de los microorganismos no perjudiciales, tales como *Lactobacillus*, muchas de ellas también útiles como probióticos tienen la ventaja adicional de minimizar el uso indiscriminado de antibióticos. Si las cepas tienen adicionalmente comportamiento probiótico, también pueden ser beneficiosas para el tubo gastrointestinal animal (incluyendo humano).

Otro aspecto de la invención es entonces una cepa aislada de *Lactobacillus paraplantarum* depositada en la "Colección española de Cultivos Tipo (CECT)" bajo el número de acceso CECT 8394.

La cepa de *Lactobacillus paraplantarum* de la invención, aislada de leche de mama humana de una mujer de España, se depositó, según el Tratado de Budapest, el 3 de julio de 2013 en la "Colección española de Cultivos Tipo (CECT)" en la Universidad de Valencia C.P 46980, Catedrático Agustín Escardino N° 9 Paterna, Valencia (España), por el depositante Laboratorios Casen Fleet S.L.U.(Autovía de Logroño, Km. 13,300 50180 Utebo (Zaragoza) - España). La cepa de *Lactobacillus paraplantarum* se identificó por el depositante con la referencia LC29, y recibió el número de acceso de CECT 8394. Además, fue declarada viable.

Como se ilustrará en los ejemplos más adelante, la cepa de *Lactobacillus paraplantarum* CECT 8394 también puede usarse como probiótica según las pautas de la FAO, que son las pautas emitidas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Cuando se administró a mujeres que padecían mastitis, esta cepa pudo promover una curación más rápida que los antibióticos comúnmente usados para el tratamiento de mastitis. Las mujeres tratadas con la cepa tuvieron menos efectos adversos secundarios que las mujeres que recibieron antibióticos, y la percepción del dolor también fue menor después del tratamiento con la cepa que con los antibióticos. Las reapariciones también fueron menores en mujeres tratadas con *Lactobacillus paraplantarum* que en mujeres que recibieron antibióticos, implicando así una función preventiva de la cepa. Así, esta cepa de *Lactobacillus paraplantarum* CECT 8394 es para su uso en el tratamiento y/o la prevención de mastitis en mamíferos, que incluye seres humanos.

Además, la cepa de *Lactobacillus paraplantarum* CECT 8394 proporciona la ventaja de tener una actividad antimicrobiana superior a otras especies de *Lactobacillus* también útiles en el tratamiento de mastitis.

La cepa de la invención puede suministrarse como un componente de una composición que comprende vehículos u otros componentes. También puede estar en forma de un cultivo puro que va a combinarse adicionalmente (si se requiere) con otros compuestos.

Entonces es otro aspecto de la invención es un cultivo puro bacteriano que comprende la cepa CECT 8394.

Si se suministra en forma de una composición, otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la cepa como se ha definido anteriormente (CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*) como principio activo, junto con cantidades apropiadas de excipientes y/o vehículos aceptables farmacéuticos. Estas composiciones pueden usarse en el tratamiento y/o la prevención de mastitis.

Otro aspecto de la invención es un producto comestible que comprende una cantidad eficaz de la cepa como se ha definido anteriormente (CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*) como principio activo, junto con cantidades apropiadas de otros componentes comestibles.

Tanto la composición (de cualquier tipo) que comprende la cepa de *Lactobacillus paraplantarum* CECT 8394, o el cultivo puro de dicha cepa, puede estar en forma de una preparación secada por congelación o liofilizada.

Todavía otro aspecto de la invención es un dispositivo médico que comprende una cantidad eficaz de la cepa como se ha definido anteriormente. Es decir, una cantidad eficaz de la cepa CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*, o un cultivo puro de la misma.

Como también se ilustrará en los ejemplos, la cepa de *Lactobacillus paraplantarum* CECT 8394 es una cepa segura y muestra propiedades probióticas. Por este motivo, puede administrarse en forma de un producto comestible que comprende una cantidad eficaz de la cepa de la invención (CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*) junto con cantidades apropiadas de otros componentes comestibles (es decir, compuestos que pueden comerse con seguridad). Así, otro aspecto de la invención es un producto o composición comestible que comprende una cantidad eficaz de la cepa de la invención (CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*) junto con cantidades apropiadas de otros componentes comestibles. Este producto comestible puede ser, en particular, una comida (yogurt, refrigerio, carne, etc.) o una bebida, como se indica más adelante.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es una gráfica que muestra, en el eje Y, los cambios en el recuento bacteriano total (cambio, como el logaritmo de las unidades de formación de colonias por ml (log UFC/ml)) de muestras de leche de mama de mujeres con mastitis que reciben la cepa CECT 8394 (grupo P) y mujeres que reciben tratamiento con antibióticos (grupo A). Las diferencias en los cambios experimentados se evaluaron con la prueba de Kruskal-Wallis. Las diferencias se muestran en líneas horizontales dentro de cada gráfica (\*P<0,05; \*\*P<0,001).

La FIG. 2 ilustra en el eje Y para las mismas muestras de la FIG. 1 los cambios en la puntuación de dolor de la mama (unidades de puntuación) informada por mujeres con mastitis que reciben la cepa CECT 8394 (grupo P) y mujeres que reciben tratamiento con antibióticos (grupo A). La puntuación de dolor de la mama osciló de 0 (extremadamente doloroso) a 10 (sin dolor), y se evaluó por la prueba de ANOVA unilateral. Las diferencias se muestran en líneas horizontales dentro de cada gráfica (\*P<0,05; \*\*P<0,001).

La FIG. 3 es una gráfica con los cambios de recuentos bacterianos (eje Y, Cambio (log UFC/ml)) de las especies del grupo de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus salivarius* determinadas también en mujeres de los grupos P y A, como se ha definido anteriormente. Como en la FIG. 1,

diferencias en los cambios experimentados se evaluaron con la prueba de Kruskal-Wallis para *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus salivarius*; o ANOVA unilateral para *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mitis*, y se muestran en líneas horizontales dentro de cada gráfica (\*P<0,05; \*\*P<0,001).

## 5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Todos los términos que se usan en la presente solicitud, a menos que se establezca de otro modo, deben entenderse en su significado común como se conoce en la técnica. Otras definiciones más específicas para ciertos términos que se usan en la presente solicitud son como se exponen más adelante y pretenden aplicarse  
10 uniformemente en toda la memoria descriptiva y reivindicaciones, a menos que una definición explicada expresamente de otra forma proporcione una definición más amplia. Las definiciones siguientes están incluidas con el fin de facilitar su entendimiento.

En el sentido de la invención, el término "mastitis" engloba mastitis puerperal y no puerperal, es decir, inflamación de  
15 tejido de la mama debido a cualquier etiología, pero en particular debido a infecciones microbiológicas de dicho tejido de la mama. También se refiere a ectasia ductal, absceso subareolar, inflamación periductal y enfermedad de Zuska. La mastitis puede sufrirse por seres humanos (hombres y mujeres), además de cualquier otro mamífero, tal como vacas, cabras, ovejas y caballos.

El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que están dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, ser humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, excipiente, etc., debe también ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros  
20 componentes de la formulación. Vehículos, excipientes adecuados, etc. puede encontrarse en textos farmacéuticos convencionales e incluyen, a modo de ejemplo, conservantes, aglutinantes, humectantes, emolientes y antioxidantes.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, significa  
30 una cantidad de un agente activo (componente; es decir, una cepa bacteriana) suficientemente alta para administrar el beneficio deseado, tanto el tratamiento como la prevención de la enfermedad, pero suficientemente baja para prevenir efectos secundarios graves dentro del alcance del criterio médico. La dosis particular de compuesto administrada según la presente invención se determinará por supuesto por las circunstancias particulares que rodean el caso, que incluyen el compuesto administrado, la vía de administración, la afección particular que está  
35 tratándose, y consideraciones similares.

El término "suplemento alimenticio" o "suplemento dietético" se usan en el presente documento como sinónimos y se refieren a composiciones comestibles previstas para proporcionar nutrientes que pueden de otro modo no ser consumidas en cantidades suficiente. Estos suplementos suelen incluir, entre otros, vitaminas, minerales, ácidos  
40 grasos, fibra y aminoácidos.

El término "dispositivo médico" significa como se define por la Directiva europea 2007/47/CE cualquier producto, instrumento, dispositivo, aparato, programa informático, material o artículo usado en el campo sanitario médico y que está regulado por la Directiva europea 90/385/CEE de dispositivo médico implantable activo, 98/79/CE de  
45 dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro* y 93/42/CEE para dispositivos médicos generales. Los dispositivos médicos están incluidos en las tecnologías sanitarias. Se usan en seres humanos para el diagnóstico, prevención, control, tratamiento o alivio de una enfermedad, para la compensación de una deficiencia; para investigar, sustituir o la modificación de la anatomía o un proceso fisiológico; y para la regulación de contracepción. Los dispositivos médicos de la presente invención se refieren a composiciones o formulaciones ("composiciones de dispositivo  
50 médico"), o a productos o dispositivos que comprenden dichas composiciones o formulaciones, que comprenden una cantidad eficaz de la cepa como se ha definido anteriormente (CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*) como principio activo. El término "composición de dispositivo médico" se usa en el presente documento para identificar las composiciones según la invención, composiciones que, como tales (por sí mismas), están catalogadas por las autoridades sanitarias competentes como dispositivos médicos.

El término "probiótico" debe entenderse en el sentido de la presente invención como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud al huésped. Los beneficios conocidos de la administración enteral de microorganismos probióticos incluyen defensas potenciadas del huésped a enfermedad mejorando las propiedades de la microbiota indígena y aumentando la resistencia a la colonización a la  
60 microbiota perjudicial. Se han sugerido probióticos que desempeñan una función importante en la formación o establecimiento de una microbiota intestinal bien equilibrada en tanto lactantes como adultos que reciben altas dosis de antibióticos. Las bacterias de ácido láctico y bifidobacterias, especialmente cepas específicas de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium*, se han recomendado para su uso como probióticos.

La leche de mama humana es la fuente particular del *Lactobacillus paraplantarum* depositado en la “Colección española de Cultivos Tipo (CECT)” bajo el número de acceso CECT 8394. Otras fuentes también englobadas con la presente invención incluyen la piel de la mama humana, que incluye areolas mamarias y pezones.

5 Como se indica, esta es la primera vez que una cepa de *Lactobacillus paraplantarum* ha sido aislada de leche de mama humana.

La cepa de *Lactobacillus paraplantarum* CECT 8394 puede, como comúnmente se hace con productos microbiológicos, suministrarse en forma de un cultivo puro bacteriano de la cepa. Este cultivo, además de cualquiera  
10 de las bacterias aisladas del mismo, puede usarse como componente de una composición farmacéutica, además de un componente de cualquier producto comestible, tal como un suplemento alimenticio.

En una realización particular, en cualquiera de las composiciones o productos comestibles que comprenden una cantidad eficaz de la cepa como se ha definido anteriormente, la cepa comprende de  $10^8$  ufc/dosis de composición o  
15 producto comestible a  $10^{10}$  ufc/dosis de composición o producto comestible. Para los fines de la invención, cualquier intervalo dado incluye tanto los puntos extremos inferiores como los superiores del intervalo. Así, cantidades eficaces en realizaciones particulares son cualquier múltiplo de 1 a 9 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9) de  $10^8$  ufc/dosis, de  $10^9$  ufc/dosis y de  $10^{10}$  ufc/dosis. La cantidad indicada como ufc/dosis se refiere a las unidades formadoras de  
20 colonias de la cepa de la invención por dosis de composición farmacéutica o producto comestible (en particular suplemento alimenticio).

En otra realización particular, la “cantidad eficaz” de la cepa de la invención comprende de  $10^8$  ufc/dosis a  $10^{10}$  ufc/dosis, y se administra o se recomienda en una pauta de dosificación de 2 a 3 dosis que contiene la “cantidad eficaz” por día.  
25

Por tanto, en una realización particular, las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de la cepa como se ha definido anteriormente (*Lactobacillus paraplantarum* CECT 8394) como principio activo. En una realización particular, dicha cantidad terapéuticamente eficaz de la cepa comprende de  $10^8$  ufc/dosis de composición a  $10^{10}$  ufc/dosis de composición. En una realización particular, la composición  
30 farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la cepa que consiste en CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*. En otra realización particular, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de  $10^8$  ufc/dosis de composición a  $10^{10}$  ufc/dosis de composición de la cepa que consiste en CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*.

35 La composición farmacéutica puede estar en forma de una disolución, suspensión, composiciones liofilizadas u otras composiciones orales secas (que van a reconstituirse con un vehículo líquido o consumirse directamente), comprimidos, píldoras, cápsulas, etc. En una realización particular, la composición farmacéutica es para administración por vía oral. En otra realización particular, la composición farmacéutica puede formularse como una composición tópica que va a aplicarse directamente al área de la mama con inflamación debido a mastitis. El experto  
40 en la materia seleccionará vehículos y/ o excipientes apropiados con el fin de formular la composición farmacéutica según se desee. Otras realizaciones incluyen composiciones para vía vaginal, rectal o nasal.

De hecho, la cepa de *Lactobacillus paraplantarum* CECT 8394 puede ser un componente de cualquier producto comestible o composición. En este producto comestible o composición, la cepa de *Lactobacillus paraplantarum*  
45 estará en una cantidad eficaz para promover el efecto deseado. Como se ha indicado anteriormente, la cantidad eficaz comprende en particular de  $10^8$  ufc/dosis de producto comestible a  $10^{10}$  ufc/dosis de producto comestible. En una realización particular, el producto comestible está seleccionado del grupo que consiste en un producto lácteo, un yogurt, una cuajada, un queso, una leche fermentada, una leche en polvo, un producto fermentado basado en leche, un producto fermentado basado en carne, un helado, un producto fermentado basado en cereal, una bebida, una  
50 harina, un chicle, un dulce, un alimento dulce, un alimento para mascotas, un suplemento dietético o alimentario, un alimento funcional, una fórmula de nutrición clínica o un complemento nutricional. Los suplementos dietéticos intentan suministrar nutrientes (vitaminas, minerales, ácidos grasos o aminoácidos) que se pierden o no se consumen en cantidad suficiente en la dieta de una persona (lactantes, mujeres embarazadas, ancianos, etc.).

55 En una realización particular, el producto comestible es un suplemento alimenticio que comprende una cantidad eficaz de la cepa como se ha definido anteriormente (CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*) como principio activo. En una realización particular, dicha cantidad eficaz de la cepa comprende de  $10^8$  ufc/dosis de composición a  $10^{10}$  ufc/dosis de composición. En otra realización particular, el suplemento alimenticio comprende una cantidad eficaz de la cepa que consiste en CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*. En otra realización particular, el  
60 suplemento alimenticio comprende una cantidad eficaz de  $10^8$  ufc/dosis de composición a  $10^{10}$  ufc/dosis de composición de la cepa que consiste en CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*.

- Adicionalmente, la cepa como se ha definido anteriormente, es decir, CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*, además de cultivos puros de la misma, también puede usarse como dispositivo médico una vez formulado como componente en un producto considerado por las autoridades como dispositivo médico o composición de dispositivo médico. Así, la cepa como se ha definido anteriormente puede aplicarse directamente o como un componente de un dispositivo médico. El dispositivo médico comprende una cantidad eficaz de la cepa de la invención de la invención junto con cualquier excipiente y/o vehículo aceptable y/o cualquier otro componente que defina el dispositivo médico (es decir: cualquier soporte, o tela tejida o no tejida). En una realización particular, el dispositivo médico comprende una cantidad eficaz de la cepa que consiste en CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*.
- 10 Un dispositivo médico permite la aplicación o administración de la cepa de la invención a una superficie de tejido deseada, por ejemplo, con el fin de tratar farmacéuticamente y/o mediante el propio dispositivo médico o cuidar la superficie a la que se aplica. En algunas realizaciones, la composición que comprende la cepa de la invención está por sí catalogada por las autoridades como un dispositivo médico. En otras realizaciones particulares de los dispositivos médicos, se corresponden con artículos sanitarios que incluyen telas tejidas o no tejidas, en las que la
- 15 cepa de la invención está homogéneamente distribuida a lo largo de la superficie de la tela. Esta distribución puede realizarse, opcionalmente, con la ayuda de un disolvente. El disolvente también puede secarse opcionalmente después de que la capa o el recubrimiento de la composición que comprende la cantidad eficaz de la cepa se distribuya totalmente o parcialmente sobre la superficie de la tela, obteniéndose así tejidos con las propiedades conferidas por la cepa según la invención.
- 20 En el caso particular de la cepa de *Lactobacillus paraplantarum* CECT 8394, se ha determinado que comporta propiedades probióticas. Entonces es una cepa probiótica con la capacidad para tratar y/o prevenir mastitis. Como probiótica, la cepa de *Lactobacillus paraplantarum* CECT 8394, puede resistir el entorno del tubo gastrointestinal, adherirse bien al epitelio intestinal (como se demuestra con la adhesión a células Caco-2 y células HT-29), no
- 25 producir compuestos tóxicos y competir con enteropatógenos por la superficie del epitelio. Además, tiene actividad antimicrobiana y no es tóxica para los animales (en términos de no translocalización al bazo, hígado y sangre, y no causa infecciones sistémicas).
- En toda la descripción y reivindicaciones, la palabra “comprender” y variaciones de la palabra no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Además, la palabra “comprender” engloba el caso de “que consiste en”. Objetivos, ventajas y características adicionales de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia tras el examen de la descripción o pueden aprenderse por la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden ser limitantes de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y
- 35 preferidas descritas en el presente documento.

#### EJEMPLOS

- 40 A) Aislamiento y caracterización taxonómica de CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*
- Se aisló CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* de leche de mama humana. Las mujeres cumplieron los siguientes criterios: a) mujeres sanas que habían sufrido mastitis; b) embarazo normal; y c) problemas no perinatales en la madre o en el bebé. Se recogieron muestras en tubos estériles por medio de presión manual. Previamente se
- 45 aplicó un antiséptico (clorhexidina) en las areolas y los pezones. Las muestras se diluyeron en peptona y se sembraron en espiral en placas con diferentes medios.
- Se aisló CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* de un medio de Man Rogosa Sharpe (MRS) complementado con L-cisteína (MRS-Cys) incubado a 37 °C en anaerobiosis (85% de nitrógeno, 10% de hidrógeno y 5% de dióxido
- 50 de carbono) en una estación de trabajo anaerobia MACS-MG-1000 (DW Scientific, RU). La cepa aislada se visualizó por medio del microscopio para analizar la morfología (bacilos en colonias blanco crema de MRS). Usando técnicas de tinción Gram se determinó que la cepa era Gram-positiva, pero negativa para las actividades enzimáticas de oxidasa y catalasa.
- 55 La cepa se identificó al nivel de especie por la amplificación del gen 16S ARN usando los siguientes cebadores:
- Directo, pbl16: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (SEC ID N°: 1); y  
Inverso, mlb16: 5'-GGCTGCTGGCACGTAGTTAG-3' (SEC ID N°: 2).
- 60 Las condiciones de PCR fueron: 35 ciclos de 96°C, 30 segundos (s); 50 °C, 30 s; y 72 °C, 45 s; y una etapa de extensión final a 72 °C, 4 minutos (min).

El fragmento amplificado se purificó con el kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel Gmb, Düren, Alemania) y se secuenció en un secuenciador ABI 377A (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.). La secuencia obtenida se comparó con la depositada en la base de datos EMBL usando el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Este fragmento se correspondió con la SEC ID N°: 3. Esta tecnología permitió clasificar la cepa en el grupo *Lactobacillus plantarum*-*Lactobacillus paraplantarum*-*Lactobacillus pentosus*. Con el fin de determinar en qué especie se emplazaba la cepa, se realizó una PCR múltiplex específica. Esto permitió determinar que la cepa era de la especie *Lactobacillus paraplantarum*. La cepa también se caracterizó por amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) con el fin de diferenciarla de otras cepas de *Lactobacillus paraplantarum*, usando ADN genómico del caldo MRS (10 ml) y el kit de tejido DNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania).

10 Los cebadores para RAPD fueron:

Cebador directo, ArgDei: 5'-ACCYTRGAAGGYGGYGATGTB-3' (SEC ID N°: 4)  
Cebador inverso, OPL5: 5'-ACGCAGGCAC-3' (SEC ID N°: 5)

#### 15 B) Resistencia al tubo gastrointestinal de CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*

Con el fin de investigar si la cepa según la invención podría resistir el entorno gástrico e intestinal,  $10^9$  ufc/ml en 25 ml de leche desnatada se diluyeron en un tampón que contenía 6,2 g/l de NaCl, 2,2 g/l de KCl, 0,22 g/l de  $\text{CaCl}_2$  y 1,2 g/l de  $\text{NaHCO}_3$  para simular saliva. A continuación se añadieron 5 ml de jugo gástrico porcino y la muestra se incubó a 37 °C. Se hizo una curva de pH que simulaba la del pH del estómago después de hacer una ingestión de yogurt (al principio pH 5,0, a 20 minutos pH 4,1, a 40 minutos pH 3,0 y a 60 minutos pH 2,1). Las fracciones se recogieron a 20, 40, 60 y 80 minutos. Las fracciones se ajustaron a pH 6,5 ( $\pm 2$ ) con  $\text{NaHCO}_3$  1 M y luego se mezclaron con una disolución que contenía 5 g/l de NaCl, 0,6 g/l de KCl, 0,3 g/l de  $\text{CaCl}_2$ , 4% de bilis porcina y 7% de pancreatina (Sigma) para simular el jugo duodenal. Después de 120 minutos, la tasa de supervivencia de la cepa se determinó sembrando las muestras en placas de MRS (37 °C en anaerobiosis 48 h). Los ensayos se realizaron por triplicado.

Como puede deducirse de la Tabla 1, la viabilidad de la cepa para las condiciones del tubo gastrointestinal fue alta y similar a algunas cepas comerciales de otras especies.

30

Tabla 1. Porcentaje de supervivencia de lactobacilos ( $10^9$  ufc/ml) en condiciones del tubo gastrointestinal.

Cepa	0-20 min (pH 5,0)	20-40 min (pH 4,1)	40-60 min (pH 3,0)	60-80 min (pH 2,1)	% del total
CECT 8394 (LC29)	17,09 $\pm$ 2,34	22,43 $\pm$ 3,92	15,95 $\pm$ 3,11	7,06 $\pm$ 1,48	62,53
CECT 5716 de <i>Lactobacillus</i> <i>fermentum</i>	9,71 $\pm$ 0,54	13,75 $\pm$ 1,75	20,91 $\pm$	10,00 $\pm$ 0,01	54,37
GG de <i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i>	14,83 $\pm$ 2,04	2,03 $\pm$ 1,28	11,45 $\pm$ 0,41	12,69 $\pm$ 0,59	41,00
La1 de <i>Lactobacillus</i> <i>johnsonii</i>	8,58 $\pm$ 0,85	11,53 $\pm$ 1,21	11,87 $\pm$ 0,42	9,61 $\pm$ 1,04	41,59
<i>Lactobacillus</i> <i>casei</i> imunitass	20,79 $\pm$ 0,51	25,68 $\pm$ 3,77	16,69 $\pm$ 6,38	0,077 $\pm$ 0,04	63,24

#### 35 C) Ensayo de adhesión a Caco-2/HT-29

La adhesión de CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* se evaluó en células HT-29 y Caco-2. Brevemente, las células se cultivaron (30 min, 56 °C) en medio DMEM (PAA, Linz, Austria) con glucosa (25 mM), piruvato de sodio (1 mM) complementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), L-glutamina (2 mM), aminoácidos no esenciales (1%), penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 mg/ml).

Se cultivaron células HT-29 y Caco-2 a confluencia en 2 ml del mismo medio pero sin antibióticos. Diez días después, 1 ml del medio se sustituyó con 1 ml de una suspensión bacteriana ( $10^8$  ufc/ml en DMEM). Los cultivos inoculados se incubaron durante 1 hora a 37 °C en 5% de  $\text{CO}_2$ . Además, la monocapa se lavó (5 veces) con PBS estéril, se fijó con metanol y se tiñó con Gram. Se contaron los lactobacilos adheridos en 20 campos microscópicos aleatorios (microscopio óptico convencional).

Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Número de bacterias adheridas a células HT-29 y Caco-2.

Cepa	HT-29	Caco-2
CECT 8394 (LC29)	842,0±361,4	345,7±124,3
CECT 5716 de <i>Lactobacillus fermentum</i>	905,65±596,6	277,01±185,4
GG de <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	820,2±350,4	361,6±138,9
<i>Lactobacillus casei</i> imunitass	164,2±88,7	17,2±11,3

5

La capacidad de adhesión a células HT-29 y Caco-2 fue considerable y similar a la de algunas cepas de lactobacilos comerciales.

#### 10 D) Actividad antimicrobiana

La capacidad de la cepa CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* para inhibir el crecimiento de bacterias se ensayó frente a P21 de *Enterococcus faecium*, TAB28 de *Enterococcus faecalis*, ScottA de *Listeria monocytogenes*, Ohio de *Listeria monocytogenes*, RdC de *Listeria innocua*, CECT 5191 de *Staphylococcus aureus*, CECT 231 de *Staphylococcus epidermidis*, CECT 4155 de *Salmonella choleraesuis*, CECT 409 de *Salmonella choleraesuis*, CECT 443 de *Salmonella choleraesuis*, CECT 4396 de *Salmonella enteritidis*, CECT 4076 de *Escherichia coli* (O157:H7), RJM1 de *Escherichia coli*, RJM2 de *Escherichia coli*, CECT 142 de *Klebsiella pneumoniae*, CECT 860T de *Klebsiella oxytoca* y CECT 484 de *Proteus vulgaris*. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas y se determinó la presencia de zonas de inhibición alrededor de manchas de CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*.

20 La siguiente Tabla 3 muestra la actividad antimicrobiana.

El procedimiento para determinar la actividad antimicrobiana se realizó según el procedimiento previamente descrito por Magnusson y Schnürer1 (Magnusson, J. y col., "Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis strain Si3 produce a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound", *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001, vol. n° 67, pág.:1-5). Se realizó usando placas de agar MRS, sobre las que se inoculó CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* como líneas de aproximadamente 2 cm de longitud y se incubaron a 32 °C durante 48 h. Las placas se cubrieron entonces con los microorganismos indicadores transportados en 10 ml de medio agar BHI blando (0,7%; Oxoid) a una concentración aproximada de 10<sup>4</sup> ufc. Las placas recubiertas con indicadores bacterianos se incubaron a 32 ó 37 °C (dependiendo de la temperatura óptima) durante 48 h. Finalmente, las placas se examinaron para zonas claras de inhibición (> 2 mm) alrededor de las manchas de CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*. Todos los experimentos que ensayan actividad inhibidora se realizaron por triplicado.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*

Indicador	CECT 8394
P21 de <i>Enterococcus faecium</i>	++
TAB28 de <i>Enterococcus faecalis</i>	++
ScottA de <i>Listeria monocytogenes</i>	+++
Ohio de <i>Listeria monocytogenes</i>	+++
RdC de <i>Listeria innocua</i>	+++
CECT 4155 de <i>Salmonella choleraesuis</i>	+++
CECT 231 de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	+++
CECT 4155 de <i>Salmonella choleraesuis</i>	+++
CECT 409 de <i>Salmonella choleraesuis</i>	+++
CECT 443 de <i>Salmonella choleraesuis</i>	+++
CECT 4396 de <i>Salmonella enteritidis</i>	+++
CECT 4076 de <i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	+++
RJM1 de <i>Escherichia coli</i>	+++
RJM2 de <i>Escherichia coli</i>	+++
CECT 142 de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	++
CECT 860T de <i>Klebsiella oxytoca</i>	++
CECT 484 de <i>Proteus vulgaris</i>	++

35 +: halo de inhibición < 3 mm; ++: halo de inhibición 3-6 mm; +++: halo de inhibición > 6 mm

CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* mostró una actividad antimicrobiana significativa contra todos los microorganismos probados, siendo en particular eficaz contra *Staphylococcus*, *Listeria*, *Salmonella* y *Escherichia*

*coli*. En comparación con la cepa CECT 7262 de *Lactobacillus plantarum* de una especie diferente y desvelada en el documento EP1997499 (Puleva Biotech), la cepa CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* fue además altamente activa contra los peligrosos enteropatógenos ScottA de *Listeria monocytogenes*, CECT 860T de *Klebsiella oxytoca* y CECT 231 de *Staphylococcus epidermidis*. También en comparación con CECT 7262 de *Lactobacillus plantarum*, la cepa de la invención tuvo una mayor actividad contra P21 de *Enterococcus faecium* y RdC de *Listeria innocua*.

En paralelo se determinó que la toxicidad no era debida a la producción de bacteriocinas (ensayadas con sobrenadante de cultivo de MRS) o reuterina (ensayada con sobrenadante de cultivo de MRS y usando CECT 925 de *L. reuteri* como control positivo). Por otra parte, la cepa mostró una alta capacidad de co-agregación con posibles patógenos (*Staphylococcus spp*, *Salmonella spp*, *Klebsiella spp*. y *E. coli*), evitando así la interacción del último con células epiteliales humanas.

E) Ensayos de toxicidad en modelos animales.

15 El objetivo de este estudio era evaluar la seguridad global de la cepa probiótica CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* antes del uso en seres humanos. Se evaluó la posible toxicidad oral de dosis agudas y repetidas (4 semanas); y la posible translocalización a sangre y algunos órganos.

Ratas Wistar macho y hembra (Charles River Inc., Marget, Kent, RU) se aclimataron durante 7 días antes del inicio del estudio con una evaluación del estado de salud.

Los estudios de dosis aguda (prueba límite) y dosis repetida (4 semanas) se realizaron según las pautas de la Unión Europea (Reglamento CE del Consejo nº 440/2008 a,b).

25 En la prueba aguda, 24 ratas (12 machos, 12 hembras) se distribuyeron en dos grupos de 6 machos y 6 hembras cada uno. Después de un ayuno durante la noche, cada rata recibió leche desnatada (500 µl) por vía oral (control) o una dosis única de  $1 \times 10^{10}$  ufc de CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* disuelto en 500 µl de leche desnatada (prueba). Los animales se comprobaron para signos clínicos y mortalidad dos veces al día. Al final, las ratas se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub>, se desangraron y se les hizo la autopsia.

30 La prueba de dosis repetida (4 semanas) se realizó con 48 ratas (24 machos, 24 hembras) divididas en cuatro grupos de 6 machos y 6 hembras cada uno (grupo de control; grupo tratado; grupo de control satélite; y grupo tratado satélite). Las ratas de grupos de control recibieron una dosis diaria de leche desnatada y los grupos tratados recibieron  $1 \times 10^9$  ufc de CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* disuelto en 500 µl de leche desnatada por vía oral una vez a día durante 4 semanas. Los animales se comprobaron para signos clínicos y mortalidad dos veces al día. Las ratas de control y los grupos tratados (no satélite) se privaron de alimento durante 18 h, se pesaron, se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub>, se desangraron y se les practicó la autopsia en el día 29. Las ratas de grupos satélite (control y tratados) se mantuvieron 14 días más, antes de la eutanasia, sin tratamiento para detectar la manifestación retardada, o persistencia de, o recuperación de efectos tóxicos.

40 En la prueba de toxicidad oral aguda no se observaron signos anormales. Todos los animales sobrevivieron y no hubo diferencias estadísticas en los pesos corporales entre grupos. Similarmente, no se observaron diferencias estadísticas en el aumento de peso corporal, consumo de comida y agua. Así, el tratamiento con  $1 \times 10^{10}$  ufc de CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* no afectó el peso, aumento de peso corporal o consumo de comida y agua. Los parámetros hematológicos y de química clínica tampoco fueron significativamente diferentes entre grupos, y no se observaron cambios relacionados con el tratamiento.

50 En la prueba de dosis repetidas no se observó mortalidad, además de tampoco cambios relacionados con el tratamiento. Tampoco hubo diferencias estadísticas en los pesos corporales y aumentos de peso corporal entre grupos, en parámetros hematológicos, además de en el peso de los órganos a los que se le practicó la autopsia. Así, el tratamiento con  $1 \times 10^9$  ufc de CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* (4 semanas) no promovió ningún tipo de efecto adverso. Después de 14 días sin tratamiento no se detectaron cambios relacionados con el tratamiento.

55 Finalmente también se determinó la concentración de glutatión en hígado total (GSH) con el fin de evaluar cambios en la defensa antioxidante debido al tratamiento probiótico. También se determinó la translocalización bacteriana en sangre, hígado o bazo.

60 La concentración de GSH se analizó homogeneizando los hígados (en disolución al 7,5% de ácido tricloroacético, 3000 xg durante 10 min a 4 °C) y midiendo en los sobrenadantes GSH por medio de un ensayo colorimétrico (OxisResearch, Portland, OR).

La translocalización bacteriana se evaluó cultivando sangre en medio MRS a 37 °C durante 48 h en condiciones anaerobias. Se homogeneizaron muestras de tejido en peptona tamponada (1 g/ml) y 100 µl de los homogeneizados

se cultivaron en MRS como se menciona previamente por sangre. Las placas se comprobaron para la presencia de lactobacilos. El crecimiento positivo se definió por la presencia de incluso una única colonia.

No se detectaron diferencias significativas en la concentración de GSH en hígado entre controles y grupos tratados.

- 5 Esto indica que el tratamiento con CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* no produjo estrés oxidativo y está de acuerdo con la ausencia de bacteremia ya que ningún lactobacilo pudo aislarse de sangre, hígado o bazo de las ratas. Sugirió que la cepa no produce ni infecciones locales ni sistémicas en ratas.

F) Efecto sobre el tratamiento de mastitis en comparación con antibióticos.

10

105 mujeres con sintomatología de mastitis se incluyeron en un ensayo. Los criterios de inclusión fueron: inflamación y dolor de mama y un recuento bacteriano en leche superior a  $4 \log_{10}$  ufc/ml. Ninguna de las mujeres había consumido antibióticos comerciales durante el ensayo. El protocolo fue autorizado por el Comité de ética de investigación clínica del Hospital Universitario San Carlos (Madrid). Los voluntarios se aleatorizaron en dos grupos: 15 un grupo probiótico, P; y un grupo de antibiótico de control, A.

El ensayo se realizó durante 21 días y, durante este periodo, las mujeres del grupo P (n=62) recibieron tres cápsulas por día que contenían aproximadamente  $9 \log_{10}$  ufc/ml de la cepa CECT 8394 (también llamada LC29). Las cápsulas incluyeron la cantidad de la cepa en metilcelulosa. Las cápsulas se mantuvieron durante el ensayo completo entre 4- 20 8 °C. Las mujeres del grupo de antibiótico (A) (n=43) recibieron un tratamiento con antibiótico que se había recetado en sus centros de asistencia ambulatoria. Las muestras de leche se recogieron al principio (día 0) y al final (día 21). En estos momentos las mujeres también fueron preguntadas sobre el grado de dolor de la mama de 0 (dolor altamente intenso) a 10 (ausencia de dolor).

- 25 Las muestras se sembraron en placas de Baird Parker, Columbia, Mac Conkey y Sabouraud Dextrose Chloramphenicol (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia) para aislar selectivamente los principales agentes causantes de la mastitis infecciosa y, en paralelo, en placas de Man Rogosa Sharpe (Oxoid, Basingstoke, RU) complementadas con L-cisteína (0,5 g/l) (MRS-Cys) para el aislamiento de lactobacilos. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas en aerobiosis, excepto aquellas de medio MRS-Cys, que se incubaron bajo anaerobiosis (85% de nitrógeno, 30 10% de hidrógeno y 5% de dióxido de carbono) en una estación de trabajo anaerobia MACS-MG-1000 (DW Scientific, RU).

Las bacterias aisladas se identificaron por medio de pruebas morfológicas y ensayos bioquímicos. Aquellas de las especies de *S. epidermidis* y *S. aureus* se confirmaron con una PCR múltiple basada en dnaJ en un ciclador 35 térmico Icyler (laboratorios BioRad, Richmond, CA) con los siguientes cebadores:

Cebador directo para los géneros *Staphylococcus*, J-StGen: 5'-TGGCCAAAAGAGACTATTATGA-3' (SEC ID N°: 6);  
Cebador inverso para *S. aureus*, J-StAur: 5'-GGATCTCTTTGTCTGCCG-3' (SEC ID N°: 7);  
Cebador inverso para *S. epidermidis*, J-StEpi: 5'-CCACCAAAGCCTTGACTT-3' (SEC ID N°: 8)

40

La identificación de *Streptococcus* se realizó por amplificación (488 pb) y secuenciación parcial del gen *tuf* (que codifica el factor de alargamiento Tu) usando los siguientes cebadores:

Cebador directo, TufStrep1: 5'-GAAGAATTGVTGGAATTGGTTGAA-3' (SEC ID N°: 9)  
Cebador inverso TufStrepR: 5'-GGACGGTAGTTGTTGAAGAATGG-3' (SEC ID N°: 10).

45

La identificación de *Streptococcus mitis* aislado se confirmó por ensayos de sensibilidad a optoquina, ensayos de solubilidad de bilis y prueba de aglutinación de látex con el kit Slide Pneumo (Biomérieux).

- Las restantes bacterias aisladas se identificaron por medio de amplificación de una región variable del gen 16S 50 ARNr usando los siguientes cebadores:

Directo, pbl16: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (SEC ID N°: 1); y  
Inverso, mlb16: 5'-GGCTGCTGGCACGTAGTTAG-3' (SEC ID N°: 2).

- 55 El fragmento se purificó entonces usando el kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel Gmb, Düren, Alemania) y se secuenció en un secuenciador ABI 377A (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.). La secuencia obtenida se comparó con la depositada en la base de datos EMBL usando el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

- 60 Como puede apreciarse en las Tablas 4, 5 más adelante, en el día 0, la concentración bacteriana media en las muestras de leche fue similar en ambos grupos (aprox.  $4,40 \log_{10}$  ufc/ml), mientras tanto los lactobacilos no fueron detectables en ninguna de las muestras. El grado de dolor fue alto. En el día 21, la concentración bacteriana media en el grupo probiótico (P) fue significativamente menor que la del grupo de antibiótico (A). Además, como se

representa en la Tabla 6, mujeres del grupo P se curaron más rápido y tuvieron menos reapariciones que aquellas del grupo A, no teniendo una parte efectos secundarios adversos. Al final del ensayo, el grado de dolor fue significativamente menor en el grupo que recibió la cepa CECT 8394 (LC29) que el del grupo que recibió antibióticos, como puede derivarse de la Tabla 5.

5

Tabla 4. Recuentos bacterianos de leche de mama, expresados como el log<sub>10</sub> ufc/ml medio (IC del 95%) y puntuación de la sensación de dolor de la mama, de extremadamente doloroso [0] a sin dolor [10], al principio del estudio (día 0) y al final del ensayo (día 21).

	Día 0					Día 21				
	Grupo P (CECT 8394)		Grupo A			Grupo P (CECT 8394)		Grupo A		
	N	Media	N	Media	P <sup>a</sup>	N	Media	N	Media	P <sup>a</sup>
Bacterias totales	56	4,97	42	5,00	0,161	55	2,95	36	4,32	<0,001
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	34	4,90	33	4,21	0,139	34	2,88	27	4,20	<0,001
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	4,83	10	4,71	0,383	9	3,01	7	4,39	<0,001
<i>Streptococcus mitis</i>	19	4,67	14	4,75	0,913	16	2,90	13	4,06	<0,001
<i>Streptococcus salivarius</i>	6	4,52	3	4,23	0,241	4	2,80	0		
Puntuación de la sensación de dolor de la mama	53	1,06	42	1,07	0,878	55	8,4	36	5,39	<0,001

a: Prueba de Kruskal-Wallis LSD 95%.

10

Tabla 5: Cambios en recuentos bacterianos de muestras de leche de mama y cambios en la puntuación de dolor de la mama informados por las participantes después del tratamiento con CECT 8394 o antibiótico

	Grupo P (CECT 8394)		Grupo A		P <sup>a</sup>
	N	Media (IC del 95%)	N	Media (IC del 95%)	
Bacterias totales	55	-2,02	36	-0,66	0,000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	34	-2,02	26	-0,53	<0,001
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	-1,82	9	-0,93	0,0039
<i>Streptococcus mitis</i>	19	-1,96	14	-0,85	0,000
<i>Streptococcus salivarius</i>	6	-2,09	3	-2,53	0,052
Puntuación de la sensación de dolor de la mama	55	7,42	36	4,31	0,001

a: Kruskal-Wallis para *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus salivarius*; ANOVA unilateral para

15

*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis* y puntuación de la sensación de dolor de la mama.

Tabla 6: Resultados adicionales del estudio

	Grupo P (n=62)	Grupo A (n=43)	Valor de P <sup>a</sup>
Sin curación	0	12	
Reapariciones (seguimiento de 2 meses)	5*	11	0,014
Absceso	0	1	
Destete	0	6	
Efectos secundarios (candidiasis vaginal)	0	8	
Abandono del estudio	1	6	0,013

<sup>a</sup> Prueba de  $\chi^2$ .

(\*) Cinco mujeres experimentaron un episodio, pero se trataron satisfactoriamente con CECT 8394 (referencia del depositante LC29).

Las FIG. 1 a 3 ilustran también los resultados de este ensayo.

5 En la FIG. 1 se representan los cambios (eje Y) en el recuento bacteriano total (como el logaritmo de las unidades de formación de colonias por ml (log UFC/ml)) de muestras de leche de mama de mujeres con mastitis que reciben la cepa CECT 8394 (grupo P) y mujeres que reciben tratamiento con antibióticos (grupo A). Las diferencias se muestran en líneas horizontales dentro de cada gráfica (\*P<0,05; \*\*P<0,001).

10 En la FIG. 2 se informan los cambios en la puntuación de dolor de la mama (eje Y, unidades de puntuación) por mujeres con mastitis que reciben la cepa CECT 8394 (grupo P) y mujeres que reciben tratamiento con antibióticos (grupo A). La puntuación de dolor de la mama osciló de 0 (extremadamente doloroso) a 10 (sin dolor). Las diferencias se muestran en líneas horizontales dentro de cada gráfica (\*P<0,05; \*\*P<0,001).

15 Finalmente, la FIG. 3 ilustra particularmente los recuentos bacterianos (eje Y) de las especies del grupo de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus salivarius* determinados también en mujeres de los grupos P y A como se ha definido anteriormente. Como en la FIG. 1 se muestran diferencias en líneas horizontales dentro de cada gráfica (\*P<0,05; \*\*P<0,001)

20 Todos estos datos en conjunto muestran las ventajas inherentemente asociadas a la cepa CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum*, que puede administrarse con seguridad a mamíferos que incluyen seres humanos para tratar mastitis de cualquier etiología. El uso de una cepa de *Lactobacillus paraplantarum* en lugar de cualquier antibiótico comúnmente usado evita efectos adversos secundarios de antibióticos. Supone, además, un tratamiento  
25 complementario o alternativo o procedimiento de prevención de mastitis con cepas probióticas.

Como se ha expuesto anteriormente, otros lactobacilos de diferentes especies se han probado para el tratamiento de mastitis en mujeres. En particular, CECT 5716 de *Lactobacillus fermentum* y de CECT 5713 *Lactobacillus salivarius* se han ensayado por Arroyo y col. (arriba).

30 En un ensayo paralelo, Arroyo y col. determinaron que el cambio en la puntuación de dolor de la mama en los grupos que reciben los probióticos (una cápsula con 9 log<sub>10</sub> ufc/ml de probiótico) fue superior al promovido por la administración de antibiótico (de 2,35 en el día 0 a 8,68 en el día 21 para CECT 5716 de *Lactobacillus fermentum*; de 2,16 en el día 0 a 8,61 en el día 21 para CECT 5713 de *Lactobacillus salivarius*; y de 2,01 en el día 0 a 5,81 en el  
35 día 21 con antibióticos). Sin embargo, varias de las mujeres tratadas en particular con CECT 5716 de *Lactobacillus fermentum* declararon flatulencia, un efecto secundario adverso molesto.

Aunque se alcanzan resultados satisfactorios con las cepas ensayadas por Arroyo y col., la cepa CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* de la invención también permitió una reducción interesante en el dolor de mama (de  
40 1,06 en el día 0 a 8,4 en el día 21; y de 1,07 en el día 0 a 5,39 en el día 21 con antibióticos) en el mismo intervalo de tiempo. Así, la cepa de CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* (9 log<sub>10</sub> ufc/ml, tres cápsulas) es más rápida en términos de curación que otras cepas de diferentes especies, y no implica efectos secundarios adversos.

Además, el cambio en los recuentos bacterianos de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y  
45 *Streptococcus mitis* determinados en la leche fue mayor con la administración de las tres cápsulas de CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* (9 log<sub>10</sub> ufc/ml por cápsula) con respecto al tratamiento con antibiótico. Tampoco se detectaron efectos adversos cuando se administraron tres cápsulas/día.

G) Formulaciones que comprenden la cepa de CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* de la invención.

50 A continuación se ilustran dos fórmulas de lotes que comprenden la cepa CECT 8394 según la invención:

Fórmula 1 en cápsulas:

	Peso (gramos)/lote	%	Peso (mg)/cápsula
CECT 8394 de <i>Lactobacillus paraplantarum</i> (con maltodextrina)	390,00	6,452	10,00
Maltodextrina	5421,00	89,677	139,00
Estearato de magnesio	234,00	3,871	6,00
	6045,00	100,00	155,00

Fórmula 2:

Descripción	Peso(g)/unidad	%	Peso (kg) /lote
Maltodextrina	1,995	99,74	2,60
CECT 8394 de <i>Lactobacillus paraplantarum</i> (con maltodextrina)	0,005	0,26	0,01
Peso final	2,000	100,00	2,61

Si las fórmulas se formulan como cápsulas, incluyen:

5 Cápsulas de diferentes materiales tales como gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC); excipientes tales como maltodextrina, agentes antiapelmazantes, agentes licuefactores, HPMC, estearato de magnesio, sílice coloidal, estearato de magnesio, y combinaciones de los mismos; y CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* en forma liofilizada y que puede ir acompañada de diferentes vehículos (maltodextrina o derivados de la leche), además de agentes crioprotectores.

10 Las cápsulas pueden envasarse en blísteres apropiados de diferentes materiales (aluminio, poli(cloruro de vinilideno) - PVDC, Aclar® o Aquaba®).

Si las fórmulas se formulan como un polvo en un sobre dispensador, incluyen:

15 Excipientes tales como maltodextrina, agentes antiapelmazantes, agentes licuefactores, HPMC, estearato de magnesio, sílice coloidal, estearato de magnesio, y combinaciones de los mismos; y CECT 8394 de *Lactobacillus paraplantarum* en forma liofilizada y que puede ir acompañada de diferentes vehículos (maltodextrina o derivados de la leche), además de agentes crioprotectores. La mezcla de tamaño de partícula apropiado se carga entonces en  
20 sobres de diferentes materiales.

Durante los procedimientos de fabricación, la humedad está controlada, siendo siempre igual o inferior al 30%. En particular, los excipientes están controlados para su humedad y el envasado de las cápsulas, blísteres y de los sobres se realiza, como siempre, bajo una atmósfera de gas inerte (por ejemplo, bajo atmósfera de nitrógeno).

25 Estas fórmulas ejemplificadas no son limitantes. De hecho, las proporciones en peso entre componentes pueden cambiar mientras en la composición final la cepa comprende de  $10^8$  ufc/dosis de composición (cápsula o sobre) a  $10^{10}$  ufc/dosis de composición (cápsula o sobre).

### 30 REFERENCIAS CITADAS EN LA SOLICITUD

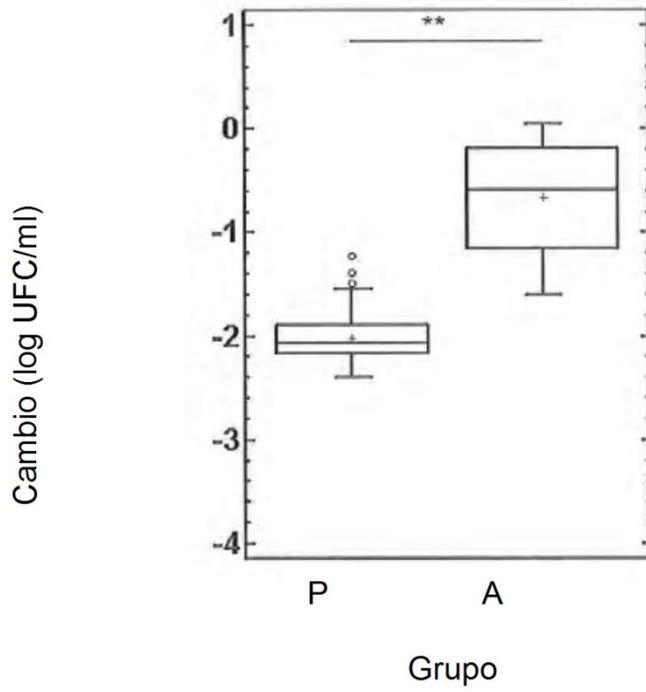
- Arroyo y col., "Treatment of Infectious Mastitis during Lactation: Antibiotics versus Oral Administration of Lactobacilli Isolated from Breast Milk", Clinical Infectious Disease – 2010, vol. nº 50(12), pág.: 1551-1558.
- 35 - EP1997499.
- [Albesharat R](#) y col. "Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies", Syst Appl Microbiol. - 2011 vol. nº 34(2), pág.:148-55.
- Magnusson, J. y col., "Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound", Appl. Environ. Microbiol – 2001, vol. nº 67, pág.:1-5.

40

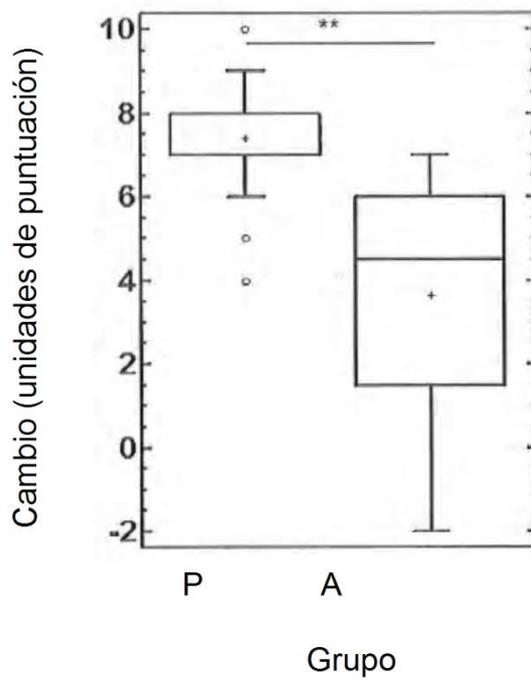
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. *Lactobacillus paraplantarum* aislado depositado en la “Colección española de Cultivos Tipo (CECT)” bajo el número de acceso CECT 8394, para su uso en el tratamiento y/o prevención de mastitis.
2. Una cepa aislada de *Lactobacillus paraplantarum* depositada en la “Colección española de Cultivos Tipo (CECT)” bajo el número de acceso CECT 8394.
- 10 3. La cepa aislada de la reivindicación 2, que consiste en *Lactobacillus paraplantarum* depositada en la “Colección española de Cultivos Tipo (CECT)” bajo el número de acceso CECT 8394.
4. Un cultivo puro bacteriano que comprende la cepa de la reivindicación 2.
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la cepa, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2-3, o de un cultivo puro como se define en la reivindicación 4, como principio activo, junto con cantidades apropiadas de excipientes y/o vehículos aceptables farmacéuticos.
- 20 6. La composición farmacéutica según la reivindicación 5, en la que la cantidad terapéuticamente eficaz de la cepa, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2-3, comprende de  $10^8$  ufc/dosis de composición a  $10^{10}$  ufc/dosis de composición.
7. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 5-6 que es para administración por vía oral.
- 25 8. Un producto comestible que comprende una cantidad eficaz de la cepa, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2-3, o de un cultivo puro como se define en la reivindicación 4, como principio activo, junto con cantidades apropiadas de otros componentes comestibles.
- 30 9. El producto comestible según la reivindicación 8, que está seleccionado del grupo que consiste en un producto lácteo, un yogurt, una cuajada, un queso, una leche fermentada, una leche en polvo, un producto fermentado basado en leche, un producto fermentado basado en carne, un helado, un producto fermentado basado en cereal, una bebida, una harina, un chicle, un dulce, un alimento dulce, un alimento para mascotas, un suplemento dietético o alimentario, un alimento funcional, una fórmula de nutrición clínica, un complemento nutricional, una fórmula para los ancianos y una fórmula para lactantes.
- 35 10. El producto comestible según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, que es un suplemento alimenticio que comprende una cantidad eficaz de la cepa, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2-3, o de un cultivo puro como se define en la reivindicación 4, como principio activo, junto con cantidades apropiadas de otros componentes comestibles.
- 40 11. El producto comestible según la reivindicación 10, en el que la cantidad eficaz en el suplemento alimenticio de la cepa, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2-3, comprende de  $10^8$  ufc/dosis de suplemento alimenticio a  $10^{10}$  ufc/dosis del suplemento alimenticio.
- 45 12. Un dispositivo médico que comprende una cantidad eficaz de la cepa, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2-3, o de un cultivo puro como se define en la reivindicación 4, como principio activo.

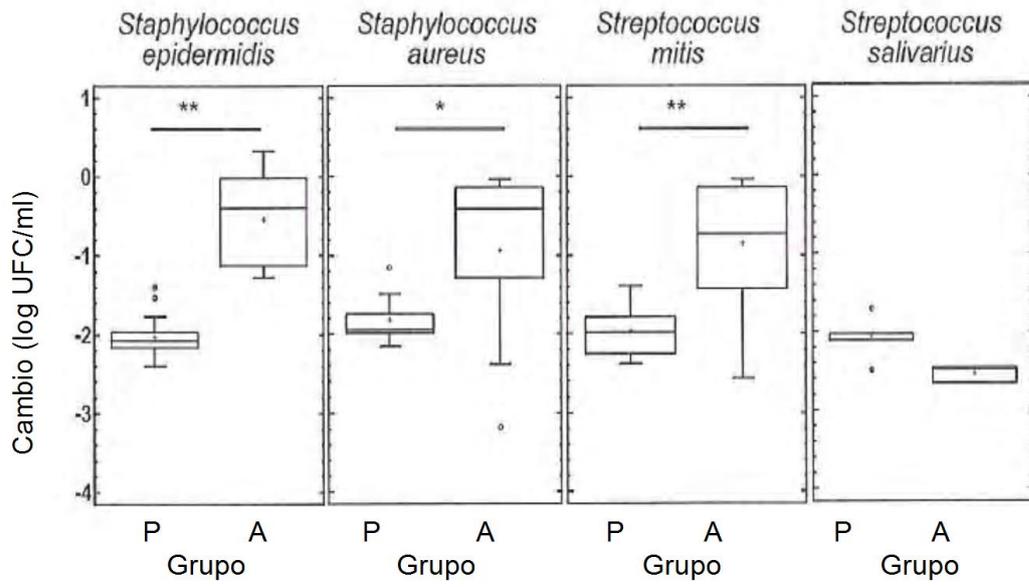
50



**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

5

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- EP1997499.

**Literatura diferente de patentes citada en la descripción**

- 10 • Arroyo y col., "Treatment of Infectious Mastitis during Lactation: Antibiotics versus Oral Administration of Lactobacilli Isolated from Breast Milk", Clinical Infectious Disease – 2010, vol. nº 50(12), pág.: 1551-1558.
- Albesharat R y col. "Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies", Syst Appl Microbiol. - 2011 vol. nº 34(2), pág.:148-55.
- Magnusson, J. y col., "Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound", Appl. Environ. Microbiol – 2001, vol. nº 67, pág.:1-5.

15

20

25

30

35