

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 776**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A23K 10/18 (2006.01)

A23K 50/40 (2006.01)

A23K 20/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2010 PCT/FI2010/050538**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.02.2011 WO11018547**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2010 E 10808015 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 2464362**

54 Título: **Preparación probiótica para la prevención o el tratamiento de trastornos gastrointestinales caninos**

30 Prioridad:

12.08.2009 FI 20095836

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

12.05.2020

73 Titular/es:

**VETCARE OY (100.0%)
P.O. Box 99
24101 Salo, FI**

72 Inventor/es:

**BEASLEY, SHEA;
HEINONEN, KALEVI y
LEHMUSSOLA, HANNA**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 759 776 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

Preparación probiótica para la prevención o el tratamiento de trastornos gastrointestinales caninos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una preparación probiótica para la prevención o el tratamiento de trastornos gastrointestinales seleccionados de entre alergia y diarrea en perros. La invención se refiere además a un procedimiento para la preparación de la preparación probiótica y a la utilización de la preparación probiótica para la preparación de farmacéuticos o productos alimenticios para perros.

Antecedentes de la invención

La diarrea continua o intermitente es muy común en perros. En el caso de que los síntomas sean leves, el propietario puede intentar aliviar la diarrea mediante ayuno, cambiando la dieta, alimentando con productos lácteos fermentados y productos medicinales disponibles sin prescripción. En el caso de que se debilite el perro, el animal se lleva a un veterinario para su examen y pruebas de laboratorio. La diarrea puede derivar del intestino delgado, del intestino grueso o puede implicar ambos intestinos. El diagnóstico se realiza basándose en los síntomas, la apariencia de las heces, anamnesis, examen físico y pruebas de laboratorio.

El espectro de trastornos gastrointestinales caninos que implican diarrea crónica es amplio: enteropatía perdedora de proteínas, linfangiectasia, diarrea alimentaria, enfermedad intestinal inflamatoria, incluyendo la gastroenteritis linfocítica-plasmacítica, gastroenterocolitis eosinofílica, enteritis granulomatosa regional, colitis ulcerosa histiocítica y enterocolitis supurativa, síndrome del intestino irritable, atrofia de las vellosidades, diarrea causada por parásitos y protozoos intestinales, infecciones bacterianas y víricas, diarrea sensible a antibióticos (crecimiento excesivo de bacterias en el intestino delgado). Además, se han identificado otras causas de diarrea, tales como hongos y algas oportunistas, tumores y bloqueo intestinal, así como algunos trastornos no gastrointestinales, tales como insuficiencia renal, trastornos hepáticos, insuficiencia cardíaca derecha, insuficiencia adrenal y diabetes mellitus. Además, el estrés puede inducir diarrea mediante reducción de la secreción de ácido clorhídrico gástrico o mediante la alteración de la población o actividad de la flora intestinal. En muchos casos, la etiología sigue siendo desconocida y la diarrea se trata sintomáticamente.

El enfoque tradicional al tratamiento de los problemas gastrointestinales caninos se basa en modificaciones de la dieta, tratamiento antibiótico y fármacos antiinflamatorios e inmunosupresores específicos, individualmente o en combinación. Muchos de los trastornos gastrointestinales caninos se tratan con antibióticos, incluso si el diagnóstico es incierto o todavía tentativo. Dicho tratamiento puede implicar incluso semanas de terapia de antibióticos con varias renovaciones. Debido a los crecientes problemas de la resistencia antimicrobiana, deberían considerarse terapias alternativas. Como una de las terapias alternativas, se ha sugerido el tratamiento con bacterias probióticas, especialmente con bacterias del ácido láctico, debido a sus propiedades beneficiosas para la salud.

Las bacterias del ácido láctico forman un grupo heterogéneo de bacterias Gram-positivas. Las bacterias incluidas en el grupo son cocos o bacilos no esporulantes, no respiradores, que producen ácido láctico como el producto final principal durante la fermentación de carbohidratos. Los géneros mejor conocidos son *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Weissella*, siendo *Lactobacillus* el género más grande, consistiendo en aproximadamente 80 especies reconocidas. Las bacterias del ácido láctico constituyen una parte importante de la microfauna intestinal humana y animal. Aunque es conocido que las bacterias del ácido láctico desempeñan un papel importante en los intestinos, en la protección del huésped frente a especies patógenas, se conoce poco sobre el papel de estas especies bacterianas en el intestino canino. La mayoría de las bacterias del ácido láctico intestinales caninas conocidas pertenecen a los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus*.

Los probióticos son microorganismos vivos, preparaciones de células microbianas o componentes de células microbianas que se utilizan para fomentar la salud, sin modificación o en forma de producto alimenticio. Dichos microorganismos habitualmente pertenecen a la especie *Lactobacillus* sp. o *Bifidobacterium* sp. La ingestión de bacterias del ácido láctico probióticas proporciona muchos beneficios documentados o potenciales, tales como la modulación del tracto GI, el antagonismo de microbios patógenos y el mantenimiento de la barrera mucosal intestinal. La adhesión a las mucosas intestinales se considera uno de los mecanismos principales mediante los que las bacterias del ácido láctico probióticas benefician la salud del huésped. Las bacterias del ácido láctico probióticas se ha propuesto que funcionan mediante varios mecanismos, ejerciendo sus efectos biológicos beneficiosos sobre el huésped. La competición para nutrientes y sitios de unión epitelial evita la colonización del huésped. Los probióticos producen compuestos antimicrobianos y ácidos que reducen el pH intestinal, convirtiendo en desfavorable el medio para los microbios no deseables, tales como patógenos. Además, las bacterias del ácido láctico probióticas atraen células inmunitarias y activan las respuestas inmunitarias y/o inflamatorias mediante alteración de la liberación de citoquinona y quimiocina, así como la secreción de péptidos antimicrobianos. La capacidad de la ingestión de bacterias probióticas de alterar la microfauna nasal y vaginal sugiere que la

microfauna intestinal activa respuestas inmunitarias situadas en tejidos linfoides asociados a mucosas. La administración de probióticos se ha asociado a un menor riesgo de condiciones sistémicas, tales como alergias e infección de oídos, tracto urinario y vagina.

5 Se ha documentado que algunas cepas de bacterias del ácido láctico presentan efectos beneficiosos sobre la salud de los perros. Para que los probióticos resulten beneficiosos, las bacterias deben sobrevivir al tracto gastrointestinal y, por lo tanto, tolerar la bilis y las condiciones ácidas del intestino. Las características probióticas de las bacterias asimismo están relacionadas con la especificidad del huésped, que es un criterio muy importante para la selección de un probiótico. La especificidad de huésped es un requisito legal para los probióticos humanos. La mayoría de las cepas probióticas comerciales destinadas a los perros no son de origen canino. Además, la mayoría de las preparaciones probióticas para animales contienen *Enterococcus faecium*, que se ha demostrado que presenta efectos negativos debido a sus potenciales características patogénicas.

15 Beasley S. et al. (Lactic acid bacteria isolated from canine faeces, Journal of Applied Microbiology, 101 (2006) 131-138) dan a conocer el aislamiento y la secuenciación de bacterias del ácido láctico a partir de las heces de perros sanos. Se seleccionaron cinco de las cepas: *Lactobacillus fermentum*, *L. mucosae*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* y *Weissella confusa*, como probióticos candidatos basándose en su frecuencia, cantidad en las heces, densidad de crecimiento, tolerancia al ácido y actividad antimicrobiana.

20 La investigación de Beasley et al. fue continuada por Marninen T. et al. (Alteration of the Canine Small-Intestinal Lactic Acid Bacterium Microbiota by Feeding of Potential Probiotics, Applied and Environmental Microbiology, Oct. 2006, páginas 6539-6543) en un examen de las tolerancias *in vitro* de las cinco cepas probióticas candidatas anteriormente mencionadas de bacterias del ácido láctico a quimo del yeyuno canino. Las cepas se utilizaron para la alimentación dos veces al día mezcladas con alimento para perros, durante 7 días en perros Beagle permanentemente fistulados. Se encontró que las cepas sobrevivían y dominaban la microfauna del ácido láctico del quimo del yeyuno durante la alimentación y que presentaban la capacidad de modificar la microfauna intestinal.

30 Además de la utilización de probióticos, asimismo se han dado a conocer otros enfoques a la modificación de la flora intestinal canina. Se ha informado de que oligosacáridos tales como la inulina y diversos fructo-oligosacáridos favorecen el crecimiento de las bifidobacterias y lactobacterias en el tracto gastrointestinal y que reducen la cantidad de patógenos, tales como *Clostridium perfringens*. La patente EP 0 850 569 B1 da a conocer un producto cereal útil como alimento para animales de compañía, que comprende una matriz de almidón gelatinizado que contiene oligosacárido prebiótico en forma de inulina y opcionalmente asimismo fructo-oligosacárido prebiótico. Se afirma que dicho producto presenta un efecto beneficioso en el tracto gastrointestinal del consumidor y, por lo tanto, en el consumidor globalmente. Al utilizarlo para alimentar perros, se informó de una palatabilidad mejorada, recuentos incrementados de bifidobacterias, recuentos reducidos de *C. perfringens* y pH, olor y volumen fecales reducidos.

40 Además, se han dado a conocer probióticos combinados con otras sustancias potencialmente beneficiosas. El documento WO 2007/076534 da a conocer una composición que comprende por lo menos un antioxidante, tal como vitamina E, vitamina C y/o β -caroteno opcionalmente junto con uno o más de un probiótico y un prebiótico. Como probióticos adecuados, se enumeran varias especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y se mencionan oligosacáridos, galactanos y β -glucanos como prebióticos adecuados. Se indica que la composición resulta útil para potenciar el equilibrio de bacterias beneficiosas y perjudiciales en el tracto gastrointestinal de un animal en riesgo de enfermedad intestinal inflamatoria, incluyendo dichos animales, seres humanos, así como animales aviares, bovinos, caninos, equinos, felinos, caprinos, murinos, ovinos y porcinos.

50 El documento US 2005/0175598 A1 da a conocer métodos de utilización de bifidobacterias probióticas, que pueden obtenerse mediante aislamiento a partir de tracto GI resecado y lavado de mamíferos, preferentemente de perros, en animales de compañía, incluyendo dichos métodos el tratamiento del sistema inmunitario, el control del peso y la composición corporal, la salud urinaria, las enfermedades de la piel y el pelaje, y el envejecimiento. Dichos probióticos pueden administrarse por vía oral en forma viable o no viable, por ejemplo preparados en una composición para la ingesta dietética normal, tal como pienso ("kibbles") y alimento animal húmedo, o para la utilización como complemento, ejemplificado por galletas, masticables, golosinas, polvos, suspensiones y cápsulas. Como componentes adicionales, las composiciones pueden comprender proteínas, grasas, carbohidratos, prebióticos, ácidos grasos de cadena larga y cinc. Entre los ejemplos de prebióticos se incluyen oligosacáridos, fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos y derivados oligo de almidón.

60 La patente EP 1 290 136 B1 da a conocer seis nuevas cepas probióticas de bacterias del ácido láctico: *Lactobacillus reuteri* NCC2581, *Lactobacillus reuteri* NCC2592 y *Lactobacillus rhamnosus* NCC2583 felinos y *Lactobacillus reuteri* NCC2603, *Lactobacillus reuteri* NCC2613 y *Lactobacillus acidophilus* NCC2628 caninos. Se da a conocer además un método de obtención de cepas probióticas para gatos y perros, incluyendo el aislamiento de cepas de bacterias del ácido láctico procedentes de heces de gatos y perros, y la selección de cepas que presentan la capacidad de crecer produciendo por lo menos 10^6 ufc/ml en presencia de hasta 2.0% de sales biliares, y que presentan la capacidad de crecer produciendo por lo menos 10^6 ufc/ml tras 2 horas en un intervalo de pH de 3.4 a 4.2. Se da a conocer además un método para preparar una composición de alimento para perro o gato que incluye

una etapa adicional de incorporación de la cepa o cepas seleccionados en una composición de alimento para perros o gatos. Como cepas bacterianas adecuadas, se enumeran *Lactobacillus reuteri*, *L. acidophilus*, *L. animalis*, *L. ruminis*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *Bifidobacterium sp.*, *Enterococcus faecium*, y *Enterococcus sp.* El alimento para animales de compañía tiene como objetivo la salud del tracto gastrointestinal, y sistema de piel y/o pelaje de gatos y/o perros, y mejorar o reducir los efectos del envejecimiento. El alimento para animales de compañía puede contener, además de las cepas bacterianas y/o su medio fermentado, una fuente de almidón, una fuente de proteínas y una fuente de lípidos, un prebiótico, carbohidratos en una cantidad inferior a aproximadamente 20% en peso del alimento para animales de compañía seco, así como ácidos grasos de cadena larga, minerales y vitaminas para complementar el alimento para animales de compañía y formar un producto nutricionalmente completo.

El documento nº WO 00/54788 da a conocer una composición farmacéutica para la utilización médica y veterinaria, y precisamente para una utilización denominada "simbiótica", basada en bacterias del ácido láctico vivas y carbohidratos no absorbibles. La composición comprende en particular una sal de calcio y una sal de aluminio. La composición se utiliza para regenerar la flora intestinal en la diarrea o en el síndrome dispéptico (colitis, diarrea, enteritis inespecífica) para la profilaxis y el tratamiento del dismicrobismo intestinal tras la utilización de antibióticos, para enfermedades digestivas del neonato alimentado artificialmente, para enfermedades digestivas de animales de granja y animales de compañía.

A pesar de la diversidad de soluciones del estado de la técnica y recientes desarrollos en el campo, resulta evidente que todavía existe una necesidad de una preparación específica para perros que pueda utilizarse para prevenir y tratar un amplio espectro de trastornos gastrointestinales caninos y condiciones secundarias originadas a partir de dichos trastornos, preferentemente evitando la utilización de antibióticos. Los beneficios de la presente preparación se observan especialmente en trastornos crónicos que requieren un tratamiento a largo plazo y en trastornos que no responden a otras terapias o a una dieta específica.

Objeto de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una preparación probiótica para la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales caninos seleccionados de alergia y diarrea.

Otro objetivo de la presente exposición es un producto alimenticio para perros que contiene la preparación probiótica para la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales caninos y el mantenimiento de la salud al mejorar el estado inmunosupresor natural del perro.

Todavía otro objetivo de la invención es un procedimiento para la fabricación de la preparación probiótica.

Un objetivo adicional de la presente invención es la utilización de los constituyentes de la preparación probiótica para la preparación de un producto farmacéutico o un producto alimenticio para perros para la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales caninos seleccionados de diarrea.

Los elementos característicos de la preparación probiótica, el procedimiento de fabricación y la utilización de los constituyentes de la preparación probiótica para la fabricación de un alimento para perros o una composición farmacéutica se dan a conocer en las reivindicaciones.

Sumario de la invención

La invención se refiere a una preparación probiótica para la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales caninos seleccionados de entre alergia y diarrea, y condiciones secundarias originadas a partir de las mismas, comprendiendo dicha preparación cepas específicas para perros de bacterias del ácido láctico, perteneciendo por lo menos dos de las cepas al género *Lactobacillus*, seleccionando dichas cepas bacterianas de *Lactobacillus fermentum* NCIMB 41636, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 41638 y *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 41640, por lo menos un prebiótico y un contenido de calcio elevado.

La invención se refiere además a un procedimiento para la fabricación de dicha preparación probiótica. El procedimiento implica cultivar, por separado o conjuntamente, cepas específicas de perro de bacterias del ácido láctico por lo menos dos de las cuales pertenecen a cepas al género *Lactobacillus*, seleccionando dichas cepas bacterianas de *Lactobacillus fermentum* NCIMB 41636, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 41638 y *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 41640, y procesar el cultivo o cultivos obtenidos, por lo menos un prebiótico y una fuente de calcio presente en una cantidad de 20% a 99% en peso, expresada como CaCO_3 , y en una cantidad de 8% a 40% en peso, calculada como Ca, del peso seco de la preparación final, y opcionalmente cepas específicas de perro adicionales de bacterias del ácido láctico, excipientes y vehículos convencionales, en una preparación homogénea.

La preparación probiótica de la invención puede utilizarse para la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales caninos, en forma de polvos secos, mezclada en un alimento para perros o formulada en formulaciones farmacéuticas más específicas o productos alimenticios para perros, por ejemplo. Para la

administración oral, tal como en gránulos, comprimidos, refrigerios masticables y productos fermentados.

A continuación, se ilustra la invención mediante descripción detallada y mediante ejemplos no limitativos de la invención.

5

Descripción detallada de la invención

Se ha descubierto que una preparación probiótica que comprende una combinación específica de por lo menos dos cepas específicas de perro de bacterias del ácido láctico pertenecientes al género *Lactobacillus*, seleccionado dichas cepas bacterianas de *Lactobacillus fermentum* NCIMB 41636, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 41638 and *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 41640, una fuente de calcio en una cantidad de 20% a 99% en peso expresada como CaCO₃, y en una cantidad de 8% a 40% en peso calculada como Ca, del peso seco de la preparación, y por lo menos un prebiótico, ejerce un efecto beneficioso en perros que sufren de un amplio espectro de trastornos gastrointestinales de etiología tanto conocida como desconocida, y de condiciones secundarias que derivan de dichos trastornos, trastornos gastrointestinales seleccionados de alergia y diarrea. Opcionalmente, la preparación probiótica de la invención puede comprender, además, cepas específicas de perro adicionales de bacterias del ácido láctico pertenecientes al género *Lactobacillus*, al género *Pediococcus* o al género *Weissella* y aisladas a partir de heces caninas, intestinos o líquidos intestinales caninos, excipientes y vehículos convencionales.

10

15

20

25

30

La cantidad de cada cepa específica de perro de bacterias del ácido láctico puede estar comprendida entre una cantidad mínima necesaria para un efecto probiótico, es decir, 1×10^6 ufc/g, y 1×10^{13} ufc/g. En una preparación más favorable a partir del efecto probiótico y aspectos económicos, la cantidad de cada cepa específica de perro de bacterias del ácido láctico está comprendida entre 1×10^7 ufc/g y 1×10^{10} ufc/g, preferentemente entre 5×10^8 y $2,5 \times 10^9$ ufc/g de la preparación probiótica. Dicha concentración alcanza una cantidad suficiente de dichas cepas en el tracto GI para actuar beneficiosamente. Las cepas específicas de perro de bacterias del ácido láctico pueden incorporarse en la preparación probiótica de la invención en forma de cultivos liofilizados, llevando de esta manera residuos del medio de fermentación a la preparación. Estos residuos actúan como agentes protectores de los probióticos y como material inicial de crecimiento para las bacterias en el tracto GI después de la digestión, no modificado o fermentado por otros microorganismos en el intestino. Estos residuos típicamente comprenden hasta 15% en peso del peso seco de la preparación probiótica, preferentemente hasta 5% en peso del peso seco de la preparación probiótica.

35

En la presente memoria, la expresión "cepas específicas de perro de bacterias del ácido láctico" se refiere a bacterias productoras de ácido láctico aisladas a partir de heces caninas, o intestinos o líquidos intestinales caninos. Las cepas bacterianas se seleccionan basándose en su crecimiento dominante en el intestino canino, la capacidad de sobrevivir en el tracto GI y de realizar actividad antimicrobiana y tolerar la atmósfera anaeróbica y aeróbica. Ventajosamente, por lo menos una de las cepas seleccionadas es resistente a antibióticos.

40

45

50

Las cepas específicas de perro de bacterias del ácido láctico pueden obtenerse mediante aislamiento de diferentes cepas específicas de perro de bacterias del ácido láctico a partir de heces de perros sanos y selección a partir de las cepas aisladas de por lo menos dos cepas pertenecientes al género *Lactobacillus*, seleccionando dichas cepas bacterianas de *Lactobacillus fermentum* NCIMB 41636, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 41638 y *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 41640. El aislamiento de las cepas específicas de perro de bacterias del ácido láctico a partir de heces de perros sanos puede llevarse a cabo tal como se da a conocer en Beasley et al. (Lactic acid bacteria isolated from canine faeces, Journal of Applied Microbiology, 101 (2006) 131-138). Los criterios de selección pueden incluir la capacidad de crecer a pH bajo (en pH 1-2), la tolerancia a ácidos biliares y oxígeno, la resistencia a algunos antibióticos específicos, tales como amoxicilina, eritromicina, cloranfenicol, ampicilina, ciprofloxacino, enrofloxacin, gentamicina, canamicina, quinupristina/dalfopristina, estreptomycin, vancomicina, tetraciclina, trimetoprim, rifampina, linezólido, cefalosporinas y clindamicina, o actividades antimicrobianas contra algunos patógenos específicos, tales como *Micrococcus luteus*, o determinadas especies de *Enterococcus* y *Clostridia* reconocidos como patógenos oportunistas. Preferentemente, las bacterias seleccionadas no resultan afectadas por el tratamiento de proteasas, indicando resistencia a proteasas o una naturaleza no proteica de la sustancia antimicrobiana.

55

60

Entre las posibles cepas específicas de perro de bacterias del ácido láctico pertenecientes al género *Lactobacillus* que pueden utilizarse en la preparación probiótica se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, *L. acetotolerans*, *L. acidophilus*, *L. agilis*, *L. alimentarius*, *L. animalis*, *L. bifementans*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. crustorum*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. gastricus*, *L. helveticus*, *L. intestinalis*, *L. jensenii*, *L. johnsonii*, *L. kefir*, *L. leichmannii*, *L. mucosae*, *L. murinus*, *L. oligofermentans*, *L. parabuchneri*, *L. parakefir*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. rogosae*, *L. salivarius*, *L. sharpeae*, *L. ultunensis*, *L. vaccinosus*, *L. vaginalis*, *L. zeae*, y *L. zymae*.

65

En la preparación probiótica, por lo menos una de las cepas específicas de perro de bacterias del ácido láctico pertenecientes al género *Lactobacillus* se selecciona de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus mucosae*. Dichas cepas específicas de perro de bacterias del ácido láctico pertenecientes al género *Lactobacillus* comprenden dos a cinco cepas seleccionadas

de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus murinus* y *Lactobacillus mucosae*. La totalidad de dichas bacterias presentan un periodo de lavado largo, pueden aislarse a partir de yeyunos caninos mediante fístula durante tres semanas después de la última alimentación. Una forma de realización particularmente preferida contiene *Lactobacillus fermentum* NCIMB 41636 y *Lactobacillus plantarum* NCIMB 41638 como las cepas específicas de perro de bacterias del ácido láctico pertenecientes al género *Lactobacillus*. Otra forma de realización preferida contiene *Lactobacillus fermentum* NCIMB 41636, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 41638 y *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 41640 como las cepas específicas de perro de bacterias del ácido láctico pertenecientes al género *Lactobacillus*. Estas cepas se depositaron el 30 de junio de 2009 en las National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria (NCIMB).

Opcionalmente, la preparación puede comprender cepas adicionales específicas de perro de bacterias del ácido láctico, además de las pertenecientes al género *Lactobacillus*, por ejemplo cepas pertenecientes al género *Pediococcus*, tal como *P. acidolactici*, o al género *Weissella*, tal como *W. confusa* y *W. cibaria*. Son ejemplos de cepas específicas de perro de bacterias del ácido láctico adicionales preferentes diferentes de *Lactobacillus*, *P. acidolactici* NCIMB 41637 y *W. confusa* NCIMB 41639. Estas cepas se depositaron el 30 de junio de 2009 en las National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria (NCIMB).

La fuente de calcio puede ser cualquier sustancia que contiene calcio aceptable para la utilización en formulaciones orales para perros. Son ejemplos no limitativos de fuente de calcio útil en la invención, carbonato de calcio, ascorbato de calcio, alginato de calcio, estearoil-2-lactilato de calcio, sorbato de calcio, formiato de calcio, acetato de calcio, propionato de calcio, lactato de calcio, citrato de calcio, estearatos de calcio, silicato de calcio sintético, tetrahidrógeno-diortofosfato de calcio, hidrógeno-ortofosfato de calcio, hidróxido de calcio, óxido de calcio, difosfato dicálcico, gluconato de calcio, sulfito de calcio, hdirogenosulfito de calcio, aluminio-silicato de calcio, digluconato de calcio, guanilato de calcio, inosinato de calcio, 5'-ribonucleótidos de calcio, malato de calcio, tartrato de calcio, EDTA cálcico disódico, difosfato de mono- y di-calcio, polifosfato de (sodio)calcio, cloruro de calcio, ferrocianuro de calcio, ortofosfato de calcio y combinaciones de los mismos.

Preferentemente, la fuente de calcio es carbonato de calcio debido a su naturaleza bien aceptada y su absorbabilidad. Además, el carbonato de calcio resulta más económico que las fuentes de calcio equivalentes. La absorción del calcio mejora en presencia de prebióticos, incrementando el contenido mineral del cuerpo completo. La cantidad de la fuente de calcio está comprendida entre 20% y 99% en peso, preferentemente entre 40% y 95% en peso, y todavía más preferentemente entre 60% y 90% en peso, % expresado como el CaCO_3 del peso seco de la preparación. Calculado como Ca, dichos intervalos de peso son 8% a 40% en peso, 16% a 38% en peso y 24% a 36% en peso, respectivamente.

El término "prebióticos" se refiere de manera general a ingredientes alimenticios no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de una bacteria o de un número limitado de bacterias en los intestinos, y que de esta manera mejora la salud del huésped. Entre los prebióticos adecuados para la utilización en las preparaciones probióticas de la invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, harina de soja, psilio, algarrobo, goma arábiga, goma guar, casia, núcleo del tamarindo, goma karaya, goma tragacanto, goma xantana, goma gelano, goma tara, beta-glucano e hidrolizados del mismo, oligosacáridos de la avena, monosacáridos, tales como tagatosa y derivados de la misma, disacáridos tales como lactosa, lactulosa, trehalosa, melibiosa, celobiosa, rafinosa, estaquiosa, isomaltosa, isomaltulosa y derivados de los mismos, fructo-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, gentio-oligosacáridos, malto-oligosacáridos, isomalto-oligosacáridos, quito-oligosacáridos, mano-oligosacáridos y derivados de los mismos, polisacáridos y oligosacáridos, tales como arabinogalactano, galactomanano, pectina, lignina, hemicelulosa de soja, xilano, pululano, inulina, arruruz, raíz de regaliz, pulpa de remolacha azucarera, tapioca, almidón resistente del maíz, cebada, avena y derivados de los mismos, dextrinas tales como maltodextrinas, ciclodextrinas y derivados de las mismas, algas *Eucheuma* procesadas, musgo irlandés y cualesquiera combinaciones de los mismos. Se ha demostrado que los prebióticos sobreviven en el tracto GI, fomentando el metabolismo y crecimiento de bacterias del ácido láctico, así como alterando los microorganismos intestinales existentes hacia microfauna beneficiosa. La cantidad del prebiótico o prebióticos está comprendida entre 0,5% y 50% en peso, preferentemente entre 0,5% y 20% en peso. La combinación de las sustancias prebióticas se selecciona según su capacidad de potenciar la supervivencia de lactobacilos seleccionados durante toda la vida útil del producto y para potenciar el crecimiento al utilizarlos para alimentar perros.

Adicionalmente, la preparación probiótica de la invención puede comprender excipientes convencionales, tales como dióxido de silicio coloidal, silicato de calcio, silicato de magnesio, trisilicato de magnesio, talco, aluminosilicato de sodio, aluminosilicato de potasio, aluminosilicato de calcio, bentonita, silicato de aluminio, estearato de magnesio, agentes saborizantes y agentes colorantes, para mejorar la vida útil de la preparación, características de flujo, apariencia, sabor, etc. Típicamente, los excipientes se encuentran presentes en una cantidad comprendida entre 0% y 5% en peso, preferentemente entre 0,9% y 1,5% en peso del peso seco de la preparación.

Sin deseo de restringirse a ninguna teoría en particular, se cree que los beneficios de la presente preparación al utilizarla para tratar trastornos gastrointestinales caninos derivan de la especificidad para perros de las cepas de

bacterias del ácido láctico, la cantidad relativamente elevada de cada cepa y la utilización de más de una cepa perteneciente al género *Lactobacillus*. Es conocido que *Lactobacillus* sp. es seguro y se ha demostrado que es capaz de colonizar los intestinos, presentando de esta manera un periodo de lavado más largo y contribuyendo además a la colonización de bacterias beneficiosas ya presentes en los intestinos del sujeto bajo tratamiento. El elevado contenido de Ca produce un efecto positivo sobre la estabilidad de la luz, afectando posiblemente a los intersticios del epitelio intestinal y reduciendo la fuga de líquidos del cuerpo hacia el interior de los intestinos. Los prebióticos utilizados en la preparación de la invención contribuyen a la viabilidad de las cepas en la preparación y asimismo a su capacidad de colonizar los intestinos después del consumo. Los prebióticos alteran microfauna intestinal seleccionada mediante fermentación y, por lo tanto, garantizan la efectividad de los probióticos. Los prebióticos pueden actuar además como intensificadores de la absorción del calcio y ligan el líquido excesivo de las heces. Sin embargo, el mecanismo exacto por el que inducen los efectos beneficiosos de la presente preparación sigue siendo desconocido.

La preparación probiótica de la invención puede fabricarse mediante un procedimiento que incluye el cultivo, por separado o conjunto, de por lo menos dos cepas específicas para perros de bacterias del ácido láctico pertenecientes al género *Lactobacillus* seleccionadas de *Lactobacillus fermentum* NCIMB 41636, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 41638 y *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 41640 y el procesamiento del cultivo o cultivos obtenidos, por lo menos un prebiótico y una fuente de calcio presente en una cantidad de 20% a 99% en peso, expresada como CaCO₃ del peso seco de la preparación final, y opcionalmente cepas específicas para perro adicionales de bacterias del ácido láctico pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* o *Weissella*, y el aislamiento a partir de heces caninas, intestinos o líquidos intestinales caninos, excipientes y vehículos, excipientes y vehículos convencionales, en una preparación homogénea.

Las cepas de bacterias del ácido láctico, fuente de calcio y uno o más prebióticos, así como los excipientes convencionales, y sus cantidades, se seleccionan tal como se ha dado a conocer anteriormente en relación a la preparación probiótica de la invención.

Las cepas específicas para perro de bacterias del ácido láctico se cultivan todas juntas o preferentemente por separado en medio de cultivo líquido que contiene por lo menos una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno. Entre los ejemplos de fuentes de carbono adecuadas se incluyen, aunque sin limitación, glucosa, dextrosa y suero, solos o en combinaciones. Entre los ejemplos de fuentes de nitrógeno adecuadas se incluyen, aunque sin limitación, harina de soja, peptona, hidrolizado de caseína, extracto de carne y extracto de levadura, levadura seca, fuentes que contienen proteínas no específicas, por ejemplo, farmamedia, solos o en combinaciones. Las cepas específicas para perro de bacterias del ácido láctico se cultivan en presencia limitada de oxígeno sin agitación o con agitación suave hasta alcanzar la densidad celular máxima. La continuación únicamente conducirá a una mayor muerte celular. El pH de los cultivos puede estar comprendido entre 3,5 y 7, preferentemente es de entre 4 y 6. La temperatura puede estar comprendida entre +25°C y 37°C, preferentemente es de +30°C ± 2°C. De esta manera, se obtienen densidades celulares de por lo menos 1x10⁹ ufc/ml.

Las células cultivadas se separan del caldo mediante cualquier método, incluyendo, aunque sin limitación, centrifugación, filtración o decantación. Las células separadas del caldo de fermentación opcionalmente se lavan con agua, solución salina (NaCl al 0,9% (o con cualquier tampón adecuado. La masa celular húmeda obtenida se seca mediante un método adecuado y preferentemente mediante liofilización. Para potenciar la absorción de agua existen varios agentes que resultan útiles en el secado, mejorando simultáneamente la estabilidad de los probióticos, incluyendo, aunque sin limitación, sacarosa, maltodextrina, almidón y otros carbohidratos.

Pueden utilizarse varias sustancias auxiliares en la producción de probióticos mediante fermentación. Existen varios componentes que pueden añadirse para potenciar el crecimiento de los lactobacilos mediante fermentación y los residuos resultan ventajosos para la composición final. Entre las posibles sustancias se incluyen, por ejemplo una gama de agentes antiespumantes, tales como agentes a base de aceite, materiales a base de silicio, Struktol y polipropileno o polietilenglicoles, aunque sin limitarse a ellos.

El procesamiento de los cultivos obtenidos y una fuente de calcio y por lo menos un prebiótico en una preparación homogénea puede implicar cualquiera de los siguientes, en cualquier orden: liofilización, centrifugación, filtración, secado, mezcla, amasado, extrusión, granulación, compresión, encapsulación, recubrimiento con película e inclusión o encapsulado en formulaciones de liberación controlada. Opcionalmente, las cepas se microencapsulan antes del procesamiento con la fuente de calcio y prebióticos, resultando preferida esta opción en el caso de que el producto final sea una formulación de elevado contenido de agua, tal como una pasta o gel.

En una forma de realización preferida del procedimiento, se incorpora una primera cantidad de dicho prebiótico o prebióticos en el medio de cultivo de las cepas específicas para perro de bacterias del ácido láctico, los cultivos obtenidos se combinan opcionalmente y se lavan, se liofilizan y después se mezclan con la fuente de calcio y opcionalmente con una segunda cantidad de dicho prebiótico o prebióticos. La expresión "una primera cantidad" se refiere a cualquier porción comprendida entre 0% y 100% en peso de la cantidad total de los prebióticos, estando habitualmente dicha primera cantidad entre 0,001% y 30% en peso, preferentemente siendo de hasta 15% en peso del peso seco de la preparación. La expresión "una segunda cantidad" se refiere a la parte restante de la cantidad

total de prebióticos no incorporada como dicha primera cantidad. Mediante la incorporación de una primera cantidad de los prebióticos ya en el medio de cultivo, pueden permanecer residuos parcialmente fermentados de los mismos, según las etapas de procesamiento seleccionadas, en la preparación probiótica, proporcionando de esta manera un material fácilmente disponible que facilita la colonización de las cepas probióticas.

El procedimiento de la invención puede comprender además una etapa de formulación de las bacterias del ácido láctico, la fuente de calcio y el prebiótico o prebióticos, y opcionalmente cepas adicionales específicas para perro de bacterias del ácido láctico, excipientes y vehículos convencionales, en las formulaciones orales en forma de polvos, gránulos, píldoras, comprimidos, cápsulas, pastillas, productos secos para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado, soluciones o suspensiones acuosas o aceitosas, geles, pastas, emulsiones o jarabes, o con ingredientes alimenticios para perro convencionales en pélets de alimento seco, trozos, alimento enlatado, salsa salada, galletas, refrigerios masticables, sustitutivo de leche para cachorros o productos fermentados. La formulación puede llevarse a cabo mediante técnicas convencionales, tal como se describe en, por ejemplo, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Lippincott, Williams and Wilkins Eds, dic. 2000, utilizando ligantes, diluyentes, agentes de compresión, lubricantes, desintegrantes, agentes humectantes, agentes de suspensión, emulsionantes, vehículos no acuosos, conservantes, saborizantes o pigmentos conocidos a modo de excipientes y vehículos. La preparación puede formularse además en un alimento convencional para perros o productos alimenticios especializados para perros, utilizando métodos de fabricación e ingredientes convencionales.

La preparación de la invención se utiliza en dosis que proporcionan una ingesta diaria dentro de los intervalos ejemplificativos siguientes:

Cada cepa probiótica: 2×10^6 - 2×10^{10} ufc/kg/día, preferentemente 1×10^8 - 5×10^8 ufc/kg/día
 Calcio: 40 a 198 mg/kg/día, preferentemente 80 a 190 mg/kg/día (expresados como carbonato de calcio).
 Prebióticos: 1 a 100 mg/kg/día, preferentemente 1 a 40 mg/kg/día.

Los ejemplos de dosis de una preparación de polvos secos de la invención alimentados a un perro de 10 kg fácilmente están comprendidos entre 0,5 y 4 g, siendo una dosis preferente de 2 g por cada 10 kg de perro.

Debido a que las bacterias del ácido láctico en la preparación son de origen canino, y en la preparación sólo se utilizan prebióticos conocidos y fuentes de calcio aceptables en alimentos, no se prevén efectos adversos. Habitualmente, la preparación probiótica de la invención se utiliza para la alimentación durante periodos de 5 a 10 días. Debido a su seguridad, la preparación probiótica de la invención resulta particularmente útil en el tratamiento de trastornos gastrointestinales crónicas. En los trastornos crónicos, la preparación probiótica puede utilizarse para la alimentación durante periodos sustancialmente más largos, tales como varios meses.

Preferentemente, la preparación probiótica se encuentra en una forma que permite dosificar fácilmente la cantidad de preparación para los perros basándose en su peso, por ejemplo con una cuchara dosificadora. El tipo de formulación asimismo influye sobre la vida útil del producto, y resultan preferidas las formulaciones secas por su mejor estabilidad. Entre los ejemplos de las formas preferidas se incluyen polvos secos y gránulos.

La preparación probiótica asimismo puede incorporarse en alimentos caninos preparados para su utilización, tales como alimentos para perros frescos, salchichas para perros, alimentos congelados para perros, alimentos enlatados para perros, guisos, trozos, pélets secos, piensos o premezclas. En este caso, la cantidad de la preparación en el alimento para perros se ajusta de manera que una comida o parte de ella, o todas las comidas, pueden sustituirse por el alimento para perros que comprende la preparación probiótica. La preparación probiótica asimismo puede proporcionarse en un envase separado, por ejemplo en un sobre, unido al envase de alimento para perros, para la mezcla con el alimento para perros antes de la ingestión. La preparación probiótica asimismo puede incorporarse en productos especializados caninos, tales como productos fermentados, sustitutivo de leche para perros, cápsulas, salsa salada, galletas, refrigerios masticables o golosinas. En el caso de un producto lácteo fermentado, el producto puede contener además de la preparación, agua o leche, sabores, cepas bacterianas técnicas para la fermentación y otros ingredientes convencionales de leche cuajada, leche entera agria, yogur, etc. En el caso de un sustitutivo de leche para cachorros, la preparación se incorpora en ingredientes convencionales del sustitutivo de leche para cachorros en forma de un producto preparado para su utilización o la preparación se proporciona por separado, por ejemplo en un sobre, se mezcla con el sustitutivo de leche para cachorros inmediatamente antes de la utilización o la preparación se incorpora en una premezcla de polvos secos de sustitutivo de leche para cachorros para la reconstitución antes de la utilización con agua, leche u otro líquido adecuado. En el caso de cápsulas, la preparación de la invención, por ejemplo en una forma de polvos o suspensión, se utiliza para llenar cápsulas duras o blandas convencionales, por ejemplo de gelatina. En el caso de galletas, refrigerios masticables, golosinas o salsas saladas para perros, la preparación se incorpora en ingredientes convencionales de galletas, refrigerios masticables, golosinas o salsa salada, por ejemplo mediante mezcla o mediante recubrimiento, en forma de un producto preparado para su utilización.

La preparación probiótica de la invención resulta útil para prevenir y tratar una diversidad de trastornos gastrointestinales caninos seleccionados de entre alergia y diarrea. La preparación probiótica de la invención

5 resulta particularmente útil para tratar trastornos relacionados con el intestino delgado. Son ejemplos de dichos trastornos, las infecciones víricas y bacterianas, la enteropatía respondedora a antibióticos (ERA) y la enfermedad intestinal inflamatoria (EII). Además, el probiótico *L. salivarius* se ha demostrado que elimina patógenos en el tracto GI y, de esta manera, reduce el riesgo de actuar como vehículo de patógeno sin síntomas en la familia. Es bien conocido que miembros de la familia, es decir, niños pequeños, pueden ser receptores de infecciones de patógenos procedentes de animales de compañía.

10 La preparación probiótica de la invención resulta particularmente útil para tratar trastornos gastrointestinales que no responden a otros tratamientos. La preparación probiótica de la invención asimismo puede resultar útil para tratar trastornos gastrointestinales causados por fuentes desconocidas o múltiples, o que presentan síntomas variables o complejos. Puede utilizarse sola o simultáneamente con una medicación, asimismo con algunos antibióticos. La utilización de la preparación probiótica de la invención simultáneamente con una medicación que es conocido que causa problemas gastrointestinales resulta particularmente beneficiosa.

15 Pueden utilizarse otros ejemplos de aplicación antes y durante situaciones estresantes, tales como la época reproductora, servicio, gestación, parto, lactancia, destete y separación materna neonatal. Las hembras de perro gestantes pueden beneficiarse de la preparación, especialmente mediante potenciación del sistema inmunitario, la prevención síntomas relacionados con el estrés y la prevención de infecciones postparto. Los neonatos y cachorros pueden beneficiarse de la preparación especialmente mediante fortalecimiento de la interacción microbiana natural en el tracto GI, potenciación del sistema inmunitario, supresión de alergias y prevención de la diarrea del cachorro al cambiar la dieta a alimentos sólidos. Los perros adultos pueden beneficiarse de la preparación especialmente mediante la curación y prevención de condiciones gastrointestinales, tales como diarrea asociada a antibióticos, la prevención de alergias, la prevención de infecciones, tales como infecciones de oído, piel, vaginales y urinarias, el mantenimiento de la higiene oral y dental y la prevención de síntomas relacionados con el estrés. Los perros de edad avanzada pueden beneficiarse de la preparación especialmente mediante el fortalecimiento de la interacción microbiana natural en el tracto GI, la potenciación del sistema inmunitario y el mantenimiento de la resistencia a enfermedades, la prevención de síntomas relacionados con el estrés y la prevención de infecciones, tales como las infecciones de oído, piel, vaginales y urinarias. La preparación probiótica de la invención asimismo puede descubrirse que resulta beneficiosa en la prevención de trastornos gastrointestinales al viajar en coche, tren o avión, en la relocalización, en el cambio de dieta, en la visita a clínicas veterinarias y antes/durante la hospitalización debido a operaciones quirúrgicas y para perros de caza y competición. La preparación probiótica de la invención mantiene el equilibrio saludable en el tracto GI canino durante el entrenamiento intensivo, la competición y los periodos de descanso.

35 Entre los ejemplos no limitativos de trastornos primarios y secundarios que pueden beneficiarse de la utilización de la preparación probiótica de la invención se incluyen trastornos inflamatorios, inmunodeficiencia, enfermedad intestinal inflamatoria, síndrome del intestino irritable, cáncer (particularmente de los sistemas gastrointestinal e inmunitario), enfermedades que implican diarrea, diarrea asociada a antibióticos, apendicitis, trastornos autoinmunitarios, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, amiloidosis, artritis reumatoide, artritis, movilidad articular, diabetes mellitus, resistencia a la insulina, infecciones bacterianas, víricas y fúngicas, enfermedad periodontal, enfermedades de la cavidad oral, enfermedad urogenital, traumatismos asociados a cirugía, enfermedad metastásica inducida por cirugía, sepsis, pérdida de peso, ganancia de peso, acumulación excesiva de tejido adiposo, anorexia, control de la fiebre, caquexia, cicatrización de lesiones, úlceras, infección de la barrera intestinal, alergia, asma, trastornos respiratorios, trastornos circulatorios, enfermedad cardíaca coronaria, anemia, trastornos del sistema de coagulación sanguínea, enfermedad renal, trastornos del sistema nervioso central, enfermedad hepática, isquemia, trastornos nutricionales, osteoporosis, trastornos endocrinos, trastornos epidérmicos y furunculosis. Resulta preferido el tratamiento del tracto gastrointestinal, incluyendo el tratamiento o la prevención de la diarrea, la regulación del sistema inmunitario, preferentemente el tratamiento o la prevención de enfermedades autoinmunitarias e inflamación, el mantenimiento o la mejora de la salud del sistema de piel y/o pelaje, preferentemente el tratamiento o la prevención de enfermedades atópicas de la piel, el mantenimiento o la mejora de la salud de las uñas, la mejora o la reducción de los efectos del envejecimiento, incluyendo el nivel de alerta y los niveles de actividad, y la prevención de la pérdida de peso durante y después de la infección.

55 Ejemplos

Fabricación de la preparación probiótica

Selección de las cepas probióticas

60 Se aislaron *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus* a partir de las heces de perros sanos, según Beasley *et al.* 2006, a las que se hace referencia en el artículo como LAB8 (*L. fermentum*), LAB9 (*L. plantarum*, anteriormente identificada como *L. salivarius*) y LAB 11 (*L. rhamnosus*). En dicho artículo, se hace referencia a las cepas por sus números de depósito NCIMB 41636, NCIMB 41638 y NCIM 41640, respectivamente. Se ha demostrado que dichas bacterias sobreviven a pH bajos (pH 1) y pueden cultivarse después de la recolección a partir de yeyuno canino (Beasley *et al.*, 2006; Manninen *et al.*, 2006). Las cepas alteran la microfauna intestinal preexistentes, facilitando la supervivencia de las bacterias del ácido láctico específicas del

huésped ya presentes. La modificación intestinal, junto con la actividad antimicrobiana, potencian la naturaleza probiótica de dichas cepas. Asimismo se ha demostrado que dichas cepas toleran los antibióticos orales comunes que se administran a perros. Debido a dicha característica, las cepas pueden administrarse simultáneamente con antibióticos a fin de reducir la diarrea inducida por antibióticos, tal como las cefalosporinas.

5

Condiciones de cultivo

Se inocularon *Lactobacillus fermentum* NCIMB 41636, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 41638 y *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 41640 por separado a partir de cultivos en placa de agar recién preparados o a partir de una reserva de cultivo congelada en glicerol al 20% en medio MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) (contenido: peptona (peptona Bacto, Becton Dickinson) 10 g/l, extracto de carne (*Organotechnie*) 8 g/l, extracto de levadura (*DSM Food Specialties*) 4 g/l, dextrosa 20 g/l, $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$ 2,6 g/l, $CH_3COONa \times 3H_2O$ 5 g/l, citrato triamónico 2 g/l, $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 0,2 g/l y $MnSO_4 \times 1 H_2O$ 0,04 g/l) y se dejó que continuase el cultivo durante 16 a 18 h a 30°C sin agitación. El caldo de cultivo obtenido se utilizó para sembrar 500 l de medio de fermentación con una tasa de transferencia de 1%. El medio de producción era el siguiente:

15

Componente	Proveedor	g/l
Glucosa (dextrosa)		24
Harina de soja 7B	Código de prod. ADM 063130	30
Extracto de levadura	R1012-1592F	10
K_2HPO_4	A687601604	2,5
Trihidrato de acetato sódico	Riedel de Haen 32318	7,5
$MnSO_4 \times 1 H_2O$	MP Biomedicals 194702	0,1

Se utilizó un agente antiespumante a base de silicio. Se llevó a cabo la fermentación a 30°C sin aireación y con agitación mínima durante un día. Tras alcanzar un valor de la DO600 de 10, correspondiente a $6,0 \times 10^9$; $4,0 \times 10^9$; $4,0 \times 10^9$ ufc/ml para *Lactobacillus fermentum* NCIMB 41636, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 41638 y *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 41640, respectivamente, las células se recolectaron con un separador (Seital SE 12 X). Las masas celulares húmedas de cada cepa de *Lactobacillus* obtenida de los caldos de cultivo de fermentación de 500 l se lavaron con agua, se complementaron con maltodextrina y se secaron mediante liofilización (liofilizador Hetosicc CD 15-1) durante 3 días. Considerando el valor de ufc/mg, los rendimientos después de la liofilización de *Lactobacillus fermentum* NCIMB 41636, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 41638 y *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 41640 eran de 90,1%, 47,1% y 45,6%, respectivamente. Los residuos del caldo de fermentación después del lavado contenían cantidades menores de harina de soja, por ejemplo, 1-5 g/l, y no se encontró ningún otro residuo que fuese un componente totalmente soluble en el caldo de cultivo.

20

25

Se añadieron los componentes siguientes a los probióticos liofilizados: psilio de malla 80-100 para potenciar las propiedades prebióticas del producto final y para mejorar la estabilidad del producto probiótico en una cantidad de 1,5% en peso y $CaCO_3$ en una cantidad de 87,5% en peso. Se estudió la estabilidad del producto y se observó que era globalmente buena. Los títulos de células viables de *Lactobacillus* se mantuvieron prácticamente estables, en $9,7 \times 10^8$ ufc/g.

30

35

Ensayo preliminar en perros que sufrían de diarrea

Se utilizó una preparación probiótica de la invención (preparación de polvos que contenía 3×10^8 - $6,7 \times 10^8$ ufc/g de cada una de las cepas de *Lactobacillus*, *L. fermentum* NCIMB 41636, *L. plantarum* NCIMB 41638 y *L. rhamnosus* NCIMB 41640; 87,5% en peso de $CaCO_3$; 5,0% en peso de psilio, 5,0% en peso de harina de soja y 1% en peso de óxido de silicio) a perros que sufrían de trastornos gastrointestinales, tales como diarrea, alergia y problemas de peso, en forma de una dosis de 1 g de preparación por cada 10 kg de perro durante 3 a 7 días. Las hembras de perro lactantes (n=2, edad: 4 años) y sus cachorros en destete (n=7, edad: 1 semana; n=6; edad: 4 semanas; n=3; edad=5 semanas) sufrieron de diarrea postparto. Para los perros adultos, la preparación se utilizó para la alimentación mezclada en alimento para perros. Para los cachorros recién nacidos, se dejó que lamiesen la preparación de la punta de los dedos, tras introducirlos en la preparación. Se añadió diariamente un gramo de preparación a pélets de alimento seco impregnado para cachorros de 4 y 5 semanas de edad. En todos los casos, la diarrea cesó en 2-3 días desde el inicio del tratamiento y no recurrió en los cachorros de 1 y 5 semanas de edad tras finalizar el tratamiento. Se observó que los cachorros de 4 semanas de edad presentaban deposiciones blandas ocasionalmente tras una semana sin preparación.

40

Ensayo preliminar en perro que sufre de alergia alimentaria severa

Se sometió a ensayo la misma preparación probiótica de la invención que en el ejemplo anterior en un perro Dachshund con alergia alimentaria severa (n=1, 1 año) utilizando una dosis de 1 g de preparación por cada 10 kg de perro durante 7 días con buenos resultados: el perro toleró la preparación y todos los alimentos durante 7 días sin ningún síntoma.

45

50

55

Ensayo preliminar en perro que sufría de diarrea intermitente crónica

5 Se sometió a ensayo la misma preparación probiótica de la invención que en los ejemplos anteriores en un perro Rottweiler macho con diarrea intermitente crónica (n=1, edad: 7 años) utilizando una dosis de 1 g de preparación por cada 10 kg de perro (es decir, 4 cucharadas) durante 7 días con buenos resultados: la diarrea cesó en 3 semanas.

REIVINDICACIONES

1. Preparación probiótica para prevenir y tratar los trastornos gastrointestinales caninos seleccionados de entre
 5 alergía y diarrea que contiene:
- por lo menos dos cepas de bacterias que producen ácido láctico aisladas a partir de heces caninas,
 intestinos o líquidos intestinales caninos, pertenecientes al género *Lactobacillus*, siendo dichas cepas de
 bacterias seleccionadas de entre *Lactobacillus fermentum* NCIMB 41636, *Lactobacillus plantarum* NCIMB
 10 41638 y *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 41640,
 - una fuente de calcio en una cantidad de 20 - 99% en peso expresada como CaCO_3 y en una cantidad de 8
 - 40% en peso calculada como Ca, del peso seco de la preparación,
 - por lo menos un prebiótico, y
- 15 opcionalmente unas cepas de bacterias que producen ácido láctico adicionales pertenecientes al género
Lactobacillus, género *Pediococcus* o género *Weissella*, y aisladas a partir de heces caninas, intestinos o líquidos
 intestinales caninos, excipientes y vehículos.
- 20 2. Preparación probiótica para una utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que la cantidad de cada
 una de las cepas de bacterias que producen ácido láctico aisladas a partir de heces caninas, intestinos o líquidos
 intestinales caninos está comprendida entre $1 \cdot 10^7$ - $1 \cdot 10^{10}$ ufc/g y la cantidad del (de los) prebiótico(s) está
 comprendida entre 0,5 - 50% en peso del peso seco de la preparación.
- 25 3. Preparación probiótica para una utilización según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que la cantidad de
 cada una de las cepas de bacterias que producen ácido láctico aisladas a partir de heces caninas, intestinos o
 líquidos intestinales caninos está comprendida entre $5 \cdot 10^8$ - $2,5 \cdot 10^9$ ufc/g, la cantidad del(de los) prebiótico(s) está
 comprendida entre 0,5 - 20% en peso y la cantidad de la fuente de calcio está comprendida entre 40 - 95% en
 30 peso expresada como CaCO_3 y en una cantidad de 16 - 38% en peso calculada como Ca, del peso seco de la
 preparación.
4. Preparación probiótica para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por
 que dichas cepas de bacterias que producen ácido láctico aisladas a partir de heces caninas, intestinos o líquidos
 intestinales caninos, perteneciendo al género *Lactobacillus* son *Lactobacillus fermentum* NCIMB 41636 y
 35 *Lactobacillus plantarum* NCIMB 41638.
5. Preparación probiótica para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por
 que la fuente de calcio se selecciona de entre carbonato de calcio, ascorbato de calcio, alginato de calcio, estearoil-
 40 2-lactilato de calcio, sorbato de calcio, formiato de calcio, acetato de calcio, propionato de calcio, lactato de calcio,
 citrato de calcio, estearatos de calcio, silicato de calcio sintético, tetrahidrógeno-diortofosfato de calcio, hidrógeno-
 ortofosfato de calcio, hidróxido de calcio, óxido de calcio, difosfato dicálcico, gluconato de calcio, sulfito de calcio,
 hidrogenosulfito de calcio, silicato de aluminio de calcio, digluconato de calcio, guanilato de calcio, inosinato de
 calcio, 5'-ribonucleótidos de calcio, malato de calcio, tartrato de calcio, EDTA disódico cálcico, difosfato de mono-
 y dicálcico, polifosfato de (sodio)calcio, cloruro de calcio, ferrocianuro de calcio, ortofosfato de calcio y
 45 combinaciones de los mismos.
6. Preparación probiótica para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por
 que dicho por lo menos un prebiótico se selecciona de entre harina de soja, psilio, algarroba, goma arábiga, goma
 guar, casia, grano del tamarindo, goma karaya, goma tragacanto, goma xantana, goma gelano, goma tara; beta-
 50 glucano e hidrolizados del mismo; oligosacáridos de avena; monosacáridos tales como tagatosa y derivados de
 los mismos; disacáridos tales como lactosa, lactulosa, trehalosa, melibiosa, celobiosa, rafinosa, estaquiosa,
 isomaltosa, isomaltulosa y derivados de los mismos; fructo-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos, galacto-
 oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, gentio-oligosacáridos, malto-oligosacáridos, isomalto-oligosacáridos, quito-
 oligosacáridos, mano-oligosacáridos y derivados de los mismos; poli- y oligosacáridos tales como
 55 arabinogalactano, galactomanano, pectina, lignina, hemicelulosa de soja, xilano, pululano, inulina, arruruz, raíz de
 regaliz, pulpa de remolacha azucarera, tapioca, almidón resistente del maíz, cebada, avena y derivados de los
 mismos; dextrinas tales como maltodextrinas, ciclodextrinas y derivados de las mismas; alga *Eucheuma*
 procesada, musgo de Irlanda y cualesquiera combinaciones de los mismos.
- 60 7. Preparación probiótica para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada por
 que la preparación probiótica se encuentra en forma de polvos secos, gránulos, píldoras, comprimidos, cápsulas,
 pastillas, productos secos para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado, soluciones o suspensiones
 acuosas o aceitosas, geles, pastas, emulsiones o jarabes.
- 65 8. Preparación probiótica para una utilización según la reivindicación 7, caracterizada por que la preparación
 probiótica se encuentra en forma de un polvo seco.

9. Preparación probiótica para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada por que la preparación probiótica se formula en productos fermentados.

5 10. Procedimiento para la fabricación de la preparación probiótica para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que presenta las etapas siguientes:

10 - cultivar por separado o conjuntamente por lo menos dos cepas de bacterias que producen ácido láctico aisladas a partir de heces caninas, intestinos o líquidos intestinales caninos, pertenecientes al género *Lactobacillus*, siendo dichas cepas de bacterias seleccionadas de entre *Lactobacillus fermentum* NCIMB 41636, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 41638 y *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 41640, y

15 - procesar el(los) cultivo(s) obtenido(s), por lo menos un prebiótico y una fuente de calcio presente en una cantidad de 20 - 99% en peso, expresada como CaCO₃ y en una cantidad de 8 - 40% en peso calculada como Ca, del peso seco de la preparación final, y opcionalmente unas cepas de bacterias que producen ácido láctico adicionales pertenecientes al género *Lactobacillus*, género *Pediococcus* o género *Weissella* y aisladas a partir de heces caninas, intestinos o líquidos intestinales caninos, excipientes y vehículos, en una preparación homogénea.

20 11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que se incorpora una primera cantidad de dicho por lo menos un prebiótico en el medio de cultivo de las cepas de bacterias que producen ácido láctico aisladas a partir de heces caninas, intestinos o líquidos intestinales caninos, los cultivos obtenidos se combinan opcionalmente y se lavan, se liofilizan y se mezclan a continuación con la fuente de calcio y opcionalmente con una segunda cantidad de dicho por lo menos un prebiótico.

25 12. Procedimiento según la reivindicación 10 u 11, caracterizado por que comprende además una etapa de formular las cepas de bacterias que producen ácido láctico aisladas a partir de heces caninas, intestinos o líquidos intestinales caninos, la fuente de calcio y el(los) prebiótico(s), y opcionalmente cepas de bacterias que producen ácido láctico adicionales aisladas a partir de heces caninas, intestinos o líquidos intestinales caninos, excipientes y vehículos, en formulaciones orales en forma de polvos, gránulos, píldoras, comprimidos, cápsulas, pastillas, productos secos para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado, soluciones o suspensiones acuosas o aceitosas, geles, pastas, emulsiones o jarabes, o con ingredientes alimenticios para perros en alimentos frescos, salchichas, alimento congelado, pélets de alimento seco, pienso, trozos, alimento enlatado, guisos, premezclas, salsa salada, galletas, refrigerios masticables, golosinas, sustitutivo de leche para cachorros o productos fermentados.

35 13. Utilización de una combinación de:

40 - por lo menos dos cepas de bacterias que producen ácido láctico aisladas a partir de heces caninas, intestinos o líquidos intestinales caninos, pertenecientes al género *Lactobacillus*, siendo dichas cepas de bacterias seleccionadas de entre *Lactobacillus fermentum* NCIMB 41636, *Lactobacillus plantarum* NCIMB 41638 y *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 41640,

45 - una fuente de calcio en una cantidad de 20 - 99% en peso expresada como CaCO₃ y en una cantidad de 8 - 40% en peso calculada como Ca, del peso seco de la preparación, y

- por lo menos un prebiótico,

50 opcionalmente con cepas de bacterias que producen ácido láctico adicionales pertenecientes al género *Lactobacillus*, género *Pediococcus* o género *Weissella* y aisladas a partir de heces caninas, intestinos o líquidos intestinales caninos, excipientes y vehículos, o ingredientes alimenticios para perros, para la fabricación de una preparación probiótica o producto farmacéutico o un producto alimenticio para perros para prevenir y tratar los trastornos gastrointestinales caninos seleccionados de entre alergia y diarrea.