

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 695**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 11/02 (2006.01)
A61P 11/04 (2006.01)
A61P 11/14 (2006.01)
A61K 35/745 (2015.01)
A61K 35/747 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012 E 12727910 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2717889**

54 Título: **Tratamiento de enfermedad del tracto respiratorio con Bifidobacterium lactis BL-04**

30 Prioridad:

10.06.2011 US 201161495614 P
15.06.2011 GB 201110095

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

21.09.2016

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)
Langebrogade 1
1411 Copenhagen K, DK

72 Inventor/es:

PYNE, DAVID;
WEST, NICHOLAS;
CRIPPS, ALLAN y
LAHTINEN, SAMPO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 583 695 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

Tratamiento de enfermedad del tracto respiratorio con *Bifidobacterium lactis* BL-04

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a *Bifidobacterium lactis* BL-04 para uso en el tratamiento de enfermedades del tracto respiratorio.

10 Antecedentes

De acuerdo con un informe de 2006 del Instituto Australiano de Salud y Bienestar, la enfermedad del tracto respiratorio superior ITRS (infección del tracto respiratorio superior) es el segundo problema tratado con más frecuencia en la práctica general y una causa importante de ingresos hospitalarios entre los niños (Welfare, 2006). Estas infecciones van acompañadas de una carga económica sustancial. La cuarta parte de todas las bajas laborales se debía a ITRS (Leder *et al.*, 2003) y un análisis económico estimó el coste directo de las infecciones del tracto respiratorio en los Estados Unidos en 9 billones de dólares (Dixon, 1985). En muchos casos, estas enfermedades reducen la interacción social, la salud y el bienestar (Hashmen & Hall, 2003). La ITRS puede tener un mayor significado clínico en el caso de subgrupos de la población. No padecer enfermedades respiratorias es importante para los atletas, dada la evidencia que demuestra que los que se mantienen libres de enfermedades tienen un mayor rendimiento que sus homólogos que presentan enfermedades (Pyne *et al.*, 2001). La reducción de la prevalencia de estas infecciones parecería tener efectos beneficiosos sustanciales, tanto desde el punto de vista económico como a nivel de la comunidad.

Existen varios estudios clínicos controlados con placebo que han examinado la eficacia de probióticos solos (de Vrese *et al.*, 2006; Cox *et al.*, 2008) y en combinación con otros supuestos agentes preventivos (Pregliasco *et al.*, 2008) en relación con las enfermedades comunes del tracto respiratorio. Estos estudios indican que el suplemento con probióticos reduce el número, la duración y la gravedad de la enfermedad en comparación con los suplementos de placebo (de Vrese *et al.*, 2005; Winkler *et al.*, 2005; de Vrese *et al.*, 2006). Más recientemente, un estudio en una cohorte atlética (edad media $27,0 \pm 11,6$ años; media \pm DT, carga de entrenamiento autonotificada ~ 10 h por semana) indicó que la ingestión regular de probióticos parece ser beneficiosa para reducir la frecuencia de ITRS, lo cual puede estar relacionado con un mejor mantenimiento de los niveles de IgA en la saliva durante el periodo invernal de entrenamiento y competición. Estos estudios indican que el suplemento con probióticos puede ser un producto nutricional útil para reducir la frecuencia, duración y gravedad de las enfermedades infecciosas comunes.

El documento WO2008/122892 y Ouwehand A., *et al*; World J. Gastroenterol. 15: 3261-3268 (2009) desvelan, cada uno, el uso de *Bifidobacterium lactis* BL-04 para el tratamiento de síntomas alérgicos/nasales respiratorios, en combinación con un probiótico adicional.

Los inventores han descubierto que, sorprendentemente, el uso de *Bifidobacterium lactis* BL-04 (Barrangou R., *et al*; J. Bacteriol. 191:4144-4151(2009) proporciona mejores efectos probióticos en el tratamiento y prevención de enfermedades del tracto respiratorio que otras bacterias probióticas o placebo en una cohorte de adultos sanos físicamente activos.

45 Sumario

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de los inventores de que el uso de la bacteria probiótica *Bifidobacterium lactis* BL-04 (disponible en DuPont Nutrition BioSciences Aps [anteriormente Danisco A/S] de Langebrogade 1, PO Box 17, DK-1001 Copenhage K, Dinamarca) en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades del tracto respiratorio proporciona resultados beneficiosos. Es particularmente sorprendente que esta bacteria tenga un mejor efecto terapéutico que otras bacterias probióticas y mezclas de bacterias probióticas.

Bifidobacterium lactis BL-04 también se conoce como *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL-04 - estos términos se usan en el presente documento de forma indistinta. *Bifidobacterium lactis* BL-04 también se conoce como DGCC2908 y RB4825.

Bifidobacterium lactis BL-04 se aisló originalmente a partir de una muestra fecal de un adulto sano y es una cepa comercial que se ha usado y depositado en un depósito seguro de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) como cepa SD5219 (véase Barrangou R., *et al*; J. Bacteriol. 191: 4144-4151(2009)).

Esta es una cepa disponible públicamente.

Los inventores han descubierto que la administración de *Bifidobacterium lactis* BL-04 a adultos sanos físicamente activos produce mejores resultados en relación con la gravedad, duración y frecuencia de enfermedades del tracto respiratorio. En la técnica anterior, los grupos de pacientes descritos como grupos que se benefician de la administración de bacterias probióticas generalmente han sido los que tienen sistemas inmunitarios menos fuertes,

es decir, niños y/o pacientes inmunocomprometidos. Este descubrimiento inesperado es sorprendente, ya que los adultos sanos físicamente activos generalmente tienen el sistema inmunitario más fuerte y, por lo tanto, solo se infectan por infecciones más graves o más virulentas que, en general, son más difíciles de combatir.

5 Por lo tanto, en un aspecto de la presente invención se proporciona una composición que comprende una bacteria y/o un producto de fermentación de una bacteria y/o un lisado celular de una bacteria para uso en el tratamiento o profilaxis de enfermedades del tracto respiratorio en un sujeto, donde dicha bacteria es *Bifidobacterium lactis* BL-04 sola.

10 Descripción detallada

Los aspectos detallados de esta invención se indican a continuación. En parte, algunos de los aspectos detallados se analizan en secciones separadas. Esto es a título de referencia y no supone limitación alguna. Todas las realizaciones descritas más adelante son igualmente aplicables a todos los aspectos de la presente invención a menos que el contexto dicte específicamente otra cosa.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión “enfermedad del tracto respiratorio” se refiere a enfermedades tanto del tracto respiratorio superior como del tracto respiratorio inferior. El término enfermedad, según se usa en el presente documento, es sinónimo del término trastorno.

20 En una realización, la enfermedad del tracto respiratorio es una enfermedad del tracto respiratorio superior.

25 Las enfermedades del tracto respiratorio superior incluyen, por ejemplo, amigdalitis, otitis media, rinitis (inflamación de la mucosa nasal); rinosinusitis o sinusitis (inflamación de las narinas y los senos paranasales, incluyendo el frontal, etmoidal, maxilar y esfenoidal); nasofaringitis, rinofaringitis o resfriado común (inflamación de las narinas, faringe, hipofaringe, úvula y amígdalas); faringitis (inflamación de la faringe, hipofaringe, úvula y amígdalas); epiglotitis o supraglotitis (inflamación de la parte superior de la laringe y el área supraglótica); laringitis (inflamación de la laringe); laringotraqueítis (inflamación de la laringe, tráquea y área subglótica); y traqueítis (inflamación de la tráquea y área subglótica).

30 En una realización, la enfermedad del tracto respiratorio se selecciona del grupo que consiste en una o más de las siguientes: amigdalitis, otitis media, rinitis (inflamación de la mucosa nasal); rinosinusitis o sinusitis (inflamación de las narinas y los senos paranasales, incluyendo el frontal, etmoidal, maxilar y esfenoidal); nasofaringitis, rinofaringitis o resfriado común (inflamación de las narinas, faringe, hipofaringe, úvula y amígdalas); faringitis (inflamación de la faringe, hipofaringe, úvula y amígdalas); epiglotitis o supraglotitis (inflamación de la parte superior de la laringe y el área supraglótica); laringitis (inflamación de la laringe); laringotraqueítis (inflamación de la laringe, tráquea y área subglótica); y traqueítis (inflamación de la tráquea y área subglótica).

35 En una realización de la invención, la enfermedad del tracto respiratorio se selecciona del grupo que consiste en una o más de las siguientes: dolor de garganta, estornudos, congestión nasal, goteo nasal y tos.

40 Uno o más de dolor de garganta, estornudos, congestión nasal, goteo nasal o tos es un síntoma de una enfermedad del tracto respiratorio superior.

45 En una realización, la composición de acuerdo con la presente invención puede usarse para el tratamiento o profilaxis de dos o más (incluyendo tres o más; o cuatro o más; o todos) de dolor de garganta, estornudos, congestión nasal, goteo nasal o tos, que son síntomas de una enfermedad del tracto respiratorio superior.

50 Uno o más de dolor de garganta, estornudos, congestión nasal, goteo nasal o tos es un síntoma de uno o más del grupo que consiste en: amigdalitis, otitis media, rinitis (inflamación de la mucosa nasal); rinosinusitis o sinusitis (inflamación de las narinas y los senos paranasales, incluyendo el frontal, etmoidal, maxilar y esfenoidal); nasofaringitis, rinofaringitis o resfriado común (inflamación de las narinas, faringe, hipofaringe, úvula y amígdalas); faringitis (inflamación de la faringe, hipofaringe, úvula y amígdalas); epiglotitis o supraglotitis (inflamación de la parte superior de la laringe y el área supraglótica); laringitis (inflamación de la laringe); laringotraqueítis (inflamación de la laringe, tráquea y área subglótica); y traqueítis (inflamación de la tráquea y área subglótica).

55 En una realización, la enfermedad del tracto respiratorio es una enfermedad del tracto respiratorio inferior.

60 Las enfermedades del tracto respiratorio inferior incluyen, por ejemplo, bronquitis, bronquitis aguda, neumonía y abscesos pulmonares.

En una realización de la invención, la enfermedad del tracto respiratorio se selecciona del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: tos con congestión de pecho y tos con sibilancias.

65 En una realización de la invención, la enfermedad del tracto respiratorio se selecciona del grupo que consiste en las dos siguientes: tos con congestión de pecho y tos con sibilancias.

Uno o más de tos con congestión de pecho y tos con sibilancias es un síntoma de una enfermedad del tracto respiratorio inferior.

5 Uno o más de tos con congestión de pecho y tos con sibilancias es un síntoma de uno o más del grupo que consiste en bronquitis, bronquitis aguda, neumonía y abscesos pulmonares.

10 En una realización, la presente invención se refiere a la reducción de una o más de la incidencia, duración o gravedad (preferentemente la incidencia) de enfermedades del tracto respiratorio, por ejemplo, enfermedad del tracto respiratorio superior o enfermedad del tracto respiratorio inferior.

10 En otra realización, la presente invención se refiere a la reducción de la incidencia, duración o gravedad (preferentemente la incidencia) de los síntomas de enfermedades del tracto respiratorio, por ejemplo, enfermedad del tracto respiratorio superior o la enfermedad del tracto respiratorio inferior.

15 Preferentemente, la reducción de la incidencia (número o frecuencia), duración o gravedad de la enfermedad del tracto respiratorio o de los síntomas de la enfermedad del tracto respiratorio se produce después de la administración de *Bifidobacterium lactis* BL-04 en comparación con la incidencia (número o frecuencia), duración o gravedad, respectivamente, de la enfermedad del tracto respiratorio o de los síntomas de la enfermedad del tracto respiratorio en sujetos comparativos sin la administración de *Bifidobacterium lactis* BL-04.

20 En una realización, la composición es particularmente eficaz para reducir la incidencia, duración o gravedad (preferentemente la incidencia) de la enfermedad del tracto respiratorio en sujetos que presentan síntomas durante más de 7 días. Sin intención de limitarse por ninguna teoría, si los síntomas se presentan durante más de 7 días, esto indica una enfermedad grave del tracto respiratorio. En una realización, la presente composición es particularmente eficaz para reducir la incidencia, duración o gravedad (preferentemente la incidencia) de una enfermedad grave del tracto respiratorio.

30 En una realización, el término "incidencia" se refiere al número y/o frecuencia de enfermedades del tracto respiratorio o sus síntomas. En una realización adicional, el término "incidencia" se refiere al número y/o frecuencia de enfermedades del tracto respiratorio o síntomas de las mismas que duran al menos tres días o al menos cinco días o al menos 7 días.

35 En una realización, la "profilaxis" se refiere a una enfermedad del tracto respiratorio o síntomas de la misma que duran al menos tres días o al menos cinco días o al menos 7 días. En una realización adicional, la "profilaxis" se refiere a una enfermedad grave del tracto respiratorio o sus síntomas.

40 La expresión "un producto de fermentación de *Bifidobacterium lactis* BL-04", como se usa en el presente documento, significa una composición que resulta del cultivo (por ejemplo, fermentación) de *Bifidobacterium lactis* BL-04 en un medio adecuado; o un sobrenadante o una fracción o un componente del mismo. En una realización, el producto de fermentación de *Bifidobacterium lactis* BL-04 es la composición entera que se produce como resultado del cultivo (por ejemplo, fermentación) de *Bifidobacterium lactis* BL-04 en un medio adecuado. El producto de fermentación puede secarse antes del uso.

45 El producto de fermentación de *Bifidobacterium lactis* BL-04 en una realización puede comprender *Bifidobacterium lactis* BL-04 viable. El producto de fermentación de *Bifidobacterium lactis* BL-04 en otra realización puede ser un producto de fermentación sin células. Un producto de fermentación sin células puede ser un producto de fermentación de *Bifidobacterium lactis* BL-04 que resulta del cultivo (por ejemplo, fermentación) de *Bifidobacterium lactis* BL-04 en un medio adecuado, que se ha modificado para retirar y/o inactivar las células bacterianas para proporcionar un producto fermentado sin células. En otra realización, el producto de fermentación de *Bifidobacterium lactis* BL-04 puede comprender bacterias *Bifidobacterium lactis* BL-04 no viables que pueden estar enteras o lisadas.

50 La expresión "sin células", como se usa en el presente documento, significa que el producto de fermentación (preferentemente el producto fermentado) carece sustancialmente de células bacterianas viables, conteniendo típicamente menos de aproximadamente 10^5 células bacterianas viables/ml de producto de fermentación, menos de aproximadamente 10^4 células bacterianas viables/ml de producto de fermentación, menos de aproximadamente 10^3 células bacterianas viables/ml de producto de fermentación, o menos de aproximadamente 10 células bacterianas viables/ml de producto de fermentación. Preferentemente, el producto de fermentación carece sustancialmente de células, conteniendo típicamente menos de aproximadamente 10^5 células/ml de producto de fermentación, menos de aproximadamente 10^4 células/ml de producto de fermentación, menos de aproximadamente 10^3 células/ml de producto de fermentación, menos de aproximadamente 10^2 células/ml de producto de fermentación, o menos de aproximadamente 10 células/ml de producto de fermentación.

65 En un aspecto, una o más células pueden separarse del producto de fermentación (por ejemplo, producto fermentado). Dicha separación puede conseguirse por cualquier medio conocido en la técnica incluyendo centrifugación y/o filtración. Por ejemplo, el producto de fermentación puede filtrarse (una o varias veces en un

proceso de múltiples etapas) para retirar componentes tales como la materia en forma de partículas, células y similares. Como alternativa o además, una o más células y/o una o más esporas pueden separarse del producto de fermentación (por ejemplo, producto fermentado) por centrifugación, produciéndose así un sobrenadante. Dependiendo de la velocidad y duración de la centrifugación, el sobrenadante puede carecer de células (es decir, ser un sobrenadante sin células) o el sobrenadante puede contener células, que pueden filtrarse o centrifugarse adicionalmente para proporcionar un sobrenadante sin células.

En algunos aspectos, el producto de fermentación de *Bifidobacterium lactis* BL-04 puede ser un extracto bruto del medio de cultivo.

En algunos aspectos, el producto de fermentación de *Bifidobacterium lactis* BL-04 puede comprender una mezcla de constituyentes presentes después (por ejemplo, al final) del cultivo de *Bifidobacterium lactis* BL-04. Por lo tanto, la expresión "producto de fermentación" puede comprender, además de ingredientes activos, otros componentes tales como materia en forma de partículas, sólidos, sustratos no utilizados durante el cultivo, residuos, medio y desechos celulares.

La expresión "lisado celular de *Bifidobacterium lactis* BL-04", como se usa en el presente documento, significa el residuo celular y fluido producido por la lisis de una o más células *Bifidobacterium lactis* BL-04. Preferentemente, la célula o células *Bifidobacterium lactis* BL-04 se aíslan antes de lisarse.

Preferentemente, las células *Bifidobacterium lactis* BL-04 se lisan por el siguiente método: se cultiva *Bifidobacterium lactis* BL-04 a 37 °C en condiciones anaerobias en MRS (u otro medio de cultivo adecuado) suplementado con cisteína al 0,05 %; las células bacterianas se recogen por centrifugación (6000 rpm/5 min); el sobrenadante se aspira y el sedimento opcionalmente se congela a -70 °C; a 1,5 ml de sedimento de cultivo celular bacteriano se le añaden 150 µl de T10E1 (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM) y la mezcla se agita con vórtice para resuspender el sedimento celular; a cada sedimento de bacterias resuspendido se le añade 1 µl de Lisozima Ready-Lyse™ (Epicentre, Vol 10, n.º 3, 2003) (de 1 a 1,5 ml de cultivo); se incuba a 37 °C durante 30 minutos hasta una noche; se diluye 1 µl de Proteinasa K (50 µg/µl) en 150 µl de solución de Lisis T&C 2X (ambas se proporcionan en el Kit de Purificación de ADN MasterPure, o se venden por separado) para cada 1-1,5 ml de cultivo sedimentado; se añaden 150 µl de la solución de Proteinasa K/Lisis a la muestra y se mezcla minuciosamente; se incuba a 65 °C-70 °C durante 15 minutos, con una breve agitación con vórtice cada 5 minutos; se enfrían las muestras a 37 °C; se añade 1 µl de RNasa A (5 µg/µl, proporcionados en el kit, o vendidos por separado) a cada muestra y se mezcla minuciosamente; se incuba a 37 °C durante 30 minutos; y las muestras se ponen en hielo.

Pueden usarse métodos de lisis alternativos para bacterias gram positivas para lisar *Bifidobacterium lactis* BL-04 - estos son conocidos para los expertos en la materia.

Convenientemente, el producto de fermentación de *Bifidobacterium lactis* BL-04 puede ser un producto de fermentación que está presente en la fase de sobrenadante aislada a partir de un cultivo de *Bifidobacterium lactis* BL-04 cultivado en las siguientes condiciones: 37 °C en condiciones anaerobias en MRS (u otro medio adecuado) suplementado con cisteína al 0,05 %.

En una realización, el producto de fermentación puede obtenerse (preferentemente se obtiene) cultivando la bacteria en un medio de cultivo hasta que la DO del cultivo a λ600 alcanza un valor de al menos 0,6, preferentemente de 0,6 a 1,5; retirando opcionalmente las bacterias por centrifugación y/o filtración (tal como, por ejemplo, centrifugación a 25 °C, 5 min, 3000 g y/o filtración estéril) produciéndose un producto fermentado sin células que comprende el o los ingredientes activos.

Convenientemente, el producto de fermentación se puede obtener (preferentemente se obtiene) usando un medio de cultivo MRS con un 1,0 % de azúcar o sin azúcar. Convenientemente, el producto de fermentación se puede obtener (preferentemente se obtiene) cultivando las bacterias a 37 °C. Convenientemente, el producto de fermentación se puede obtener (preferentemente se obtiene) cultivando las bacterias en condiciones anaerobias.

El cultivo de *Bifidobacterium lactis* BL-04 puede realizarse durante un periodo de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 72 horas (h), de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 h, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 54 h o de 24 a 48 h.

En un aspecto, el cultivo puede realizarse hasta que se agote el nutriente (preferentemente nutriente completo).

En un aspecto, el cultivo se realiza durante un tiempo eficaz para alcanzar la fase estacionaria de crecimiento de las bacterias.

La temperatura durante el cultivo puede ser de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 °C, de aproximadamente 32 a aproximadamente 40 °C o de aproximadamente 34 a aproximadamente 38 °C, o puede ser de aproximadamente 37 °C.

El pH durante el cultivo puede ser un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, de aproximadamente 5 a aproximadamente 6, de aproximadamente 6 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 8.

En un aspecto, el cultivo preferentemente se realiza con aireación.

Los expertos en la materia conocen los cultivos discontinuos y continuos. El producto de fermentación de la presente invención puede prepararse usando cultivos continuos o discontinuos.

Convenientemente, el producto de fermentación puede recogerse durante o al final del proceso de cultivo.

En un aspecto, el producto de fermentación de la presente invención se recoge durante o al final de la fase exponencial.

En un aspecto, el producto de fermentación de la presente invención se recoge en o durante la fase estacionaria.

En un aspecto de la presente invención, el producto de fermentación puede producirse en una cuba en condiciones comerciales.

En un aspecto, el cultivo se agita y/o se remueve durante el cultivo (por ejemplo, durante la fermentación).

En un aspecto, el nivel de oxigenación se supervisa y/o controla durante el cultivo.

Convenientemente, la composición que comprende *Bifidobacterium lactis BL-04* de acuerdo con la presente invención o el producto de fermentación de *Bifidobacterium lactis BL-04* o el lisado celular de *Bifidobacterium lactis BL-04* puede estar en forma de una suspensión bacteriana, antes o después de la congelación, o en forma de concentrados, en forma seca, liofilizada o congelada. Sea cual sea la forma que se use, la cepa puede estar congelada.

La composición que comprende *Bifidobacterium lactis BL-04* de acuerdo con la presente invención no comprende otro microorganismo, por ejemplo, no comprende otra bacteria probiótica.

En una realización, la composición de acuerdo con la presente invención consiste en *Bifidobacterium lactis BL-04*, por ejemplo, junto con excipientes, diluyentes o vehículos.

Convenientemente, la composición que comprende *Bifidobacterium lactis BL-04* y/o un producto de fermentación de *Bifidobacterium lactis BL-04* y/o un lisado celular de *Bifidobacterium lactis BL-04* de acuerdo con la presente invención pueden contener uno o más aditivos. Convenientemente, los aditivos pueden añadirse durante el secado y/o durante la liofilización de la composición.

La composición que comprende *Bifidobacterium lactis BL-04* usada de acuerdo con la presente invención puede comprender de 10^6 a 10^{12} UFC de bacterias/g de composición y, más particularmente, de 10^8 a 10^{12} UFC de bacterias/g de composición, preferentemente de 10^9 a 10^{12} UFC/g para la forma liofilizada.

Convenientemente, la composición que comprende *Bifidobacterium lactis BL-04* usada de acuerdo con la presente invención puede administrarse a una dosificación de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} UFC de *Bifidobacterium lactis BL-04*/dosis, preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} UFC de *Bifidobacterium lactis BL-04*/dosis. Por la expresión "por dosis" se entiende que esta cantidad de *Bifidobacterium lactis BL-04* se proporciona a un sujeto por día o por toma, preferentemente por día. Por ejemplo, si la bacteria *Bifidobacterium lactis BL-04* se va a administrar en un alimento (por ejemplo, en un yogur) - entonces el yogur preferentemente contendrá de aproximadamente 10^8 a 10^{12} UFC de *Bifidobacterium lactis BL-04*. Sin embargo, como alternativa, esta cantidad de *Bifidobacterium lactis BL-04* puede dividirse en múltiples administraciones, consistiendo cada una en una cantidad más pequeña de carga microbiana - siempre que la cantidad total de *Bifidobacterium lactis BL-04* recibida por el sujeto en cualquier momento específico (por ejemplo, cada periodo de 24 horas) sea de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} UFC de *Bifidobacterium lactis BL-04*, preferentemente de 10^8 a aproximadamente 10^{12} UFC de *Bifidobacterium lactis BL-04*.

De acuerdo con la presente invención, una cantidad eficaz de *Bifidobacterium lactis BL-04* puede ser al menos 10^6 UFC de microorganismo/dosis, preferentemente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} UFC de microorganismo/dosis, preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} UFC de microorganismo/dosis.

En una realización, preferentemente la bacteria *Bifidobacterium lactis BL-04* usada de acuerdo con la presente invención puede administrarse a una dosificación de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} UFC de microorganismo/día, preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} UFC de microorganismo/día. Por lo tanto, la cantidad eficaz en esta realización puede ser de aproximadamente 10^6 a

aproximadamente 10^{12} UFC de microorganismo/día, preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} UFC de microorganismo/día.

5 En una realización, preferentemente la bacteria *Bifidobacterium lactis* BL-04 usada de acuerdo con la presente invención se administra a una dosificación de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{10} UFC/día, preferentemente de aproximadamente 1×10^9 a 3×10^9 UFC/día, por ejemplo, a aproximadamente 2×10^9 UFC de microorganismo/día.

10 UFC significa "unidades formadoras de colonias".

La composición que comprende *Bifidobacterium lactis* BL-04 y/o un producto de fermentación de *Bifidobacterium lactis* BL-04 y/o un lisado celular de *Bifidobacterium lactis* BL-04 de acuerdo con la presente invención puede usarse para modificar la toma de la medicación (por ejemplo, la medicación para un resfriado y/o gripe) en un sujeto.

15 En una realización, el término "modificar" significa "reducir".

La modificación y/o reducción de la medicación significa una modificación o reducción en comparación con un control con placebo.

20 Al control con placebo no se le administra una composición que comprende *Bifidobacterium lactis* BL-04 y/o un producto de fermentación de *Bifidobacterium lactis* BL-04 y/o un lisado celular de *Bifidobacterium lactis* BL-04 de acuerdo con la presente invención. Al control con placebo se le puede administrar sacarosa.

25 El término "medicación", como se usa en el presente documento, preferentemente significa medicación para el resfriado y/o gripe. Esta puede incluir uno o más de los siguientes tipos de medicación: tratamiento para el dolor de garganta, tratamiento para el catarro, tratamientos para la tos, descongestivos, antihistamínicos, agentes para reducir la fiebre, agentes para aliviar el dolor, agentes para eliminar la tos (antitusivos), antibióticos o expectorantes (para diluir el moco).

30 La medicación puede comprender o ser uno o más de los siguientes: un descongestivo, un antihistamínico, un agente para reducir la fiebre, un agente para aliviar el dolor (por ejemplo, para dolores de cabeza y/u otros dolores y molestias), antiinflamatorios no esteroideos (AINE), antitusivos (o supresores de la tos), un antibiótico, o expectorantes (para diluir el moco).

35 El agente para aliviar el dolor puede incluir uno o más de los siguientes ingredientes activos: paracetamol, aspirina o ibuprofeno, por ejemplo.

El agente para reducir la fiebre puede incluir uno o más de los siguientes ingredientes activos: aspirina, ibuprofeno, salicilato de magnesio o naproxeno, por ejemplo.

40 El descongestivo puede incluir uno o más de los siguientes ingredientes activos: fenilpropanolamina (PPA) y/o pseudoefedrina y/o fenilefrina, por ejemplo.

45 El supresor de la tos (o antitusivo) puede comprender folcodina y/o noscoapina, por ejemplo.

El expectorante puede incluir uno o más de los siguientes ingredientes activos: guaifenesina, acetilcisteína o ambroxol, por ejemplo.

50 El antihistamínico puede incluir uno o más de los siguientes ingredientes activos: bromfeniramina; clorfeniramina, dimenhidrinato, difenhidramina, doxilamina; loratadina; cetirizina o fexofenadina, por ejemplo.

El antibiótico puede incluir uno o más de los siguientes ingredientes activos: azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, penicilina, amoxicilina, rimacilina o ampicilina.

55 La expresión "toma de la medicación", como se usa en el presente documento, significa el número total de medicaciones (para el resfriado y/o la gripe) tomadas por un sujeto y/o el número total de días que un sujeto usa la medicación (para el resfriado y/o la gripe).

60 La composición que comprende *Bifidobacterium lactis* BL-04 y/o un producto de fermentación de *Bifidobacterium lactis* BL-04 y/o un lisado celular de *Bifidobacterium lactis* BL-04 de acuerdo con la presente invención, puede usarse para reducir el número total de medicación para el resfriado y/o la gripe tomada por un sujeto y/o reducir el número total de días que el sujeto usa la medicación para el resfriado y/o la gripe (por ejemplo, en comparación con un control con placebo).

65 La composición que comprende *Bifidobacterium lactis* BL-04 y/o un producto de fermentación de *Bifidobacterium lactis* BL-04 y/o un lisado celular de *Bifidobacterium lactis* BL-04 de acuerdo con la presente invención puede

administrarse en o como un producto alimentario o puede administrarse como una composición farmacéuticamente aceptable.

5 En una realización, la presente invención produce un aumento de la actividad fagocítica de los granulocitos (neutrófilos) en el sujeto. Preferentemente, este aumento de actividad es de al menos un 1 %, al menos un 3 %, al menos un 5 %, al menos un 7 %, al menos un 10 %, al menos un 12 %, al menos un 15 %, al menos un 17 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 % o al menos un 50 %.

10 En una realización, la presente invención produce un aumento en la actividad fagocítica de los monocitos en el sujeto. Preferentemente, este aumento de actividad es de al menos un 1 %, al menos un 3 %, al menos un 5 %, al menos un 7 %, al menos un 10 %, al menos un 12 %, al menos un 15 %, al menos un 17 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 % o al menos un 50 %.

15 En esta memoria descriptiva, la expresión “microorganismo probiótico” se define de manera que incluye cualquier microorganismo no patógeno que, cuando se administra vivo (por ejemplo, viable) en cantidades adecuadas, confiere un efecto beneficioso para la salud al hospedador. Estas cepas probióticas generalmente tienen la capacidad de sobrevivir al paso a través de la parte superior del tracto digestivo. Son organismos no patógenos, no tóxicos y ejercen su efecto beneficioso sobre la salud por una parte mediante interacciones ecológicas con la flora residente en el tracto digestivo, y por otra parte mediante su capacidad de influir en el sistema inmunitario de una manera positiva a través del “GALT” (tejido linfoide asociado al tubo digestivo). Dependiendo de la definición de probióticos, estos microorganismos, cuando se administran en un número suficiente, tienen la capacidad de progresar vivos a través del intestino, sin embargo, no atraviesan la barrera intestinal y sus efectos primarios, por lo tanto, se inducen en la luz y/o la pared del tracto gastrointestinal. Forman parte de la flora residente durante el periodo de administración. Esta colonización (o colonización transitoria) permite al microorganismo probiótico ejercer un efecto beneficioso, tal como la represión de microorganismos potencialmente patógenos presentes en la flora e interacciones con el sistema inmunitario del intestino.

20 Se entenderá que la composición de acuerdo con la presente invención puede formularse como un medicamento, un producto alimentario o un suplemento de la dieta. Preferentemente, la composición se formula como un suplemento de la dieta. Ventajosamente, cuando el producto es un producto alimentario, la bacteria *Bifidobacterium lactis BL-04* y/o un producto de fermentación de *Bifidobacterium lactis BL-04* y/o un lisado celular de *Bifidobacterium lactis BL-04* sigue siendo eficaz (por ejemplo, la bacteria permanece viable) hasta la fecha de “caducidad” o fecha de “expiración” normal durante la cual el producto alimentario se ofrece para la venta por el comerciante. Preferentemente, el tiempo eficaz debe extenderse más allá de dichas fechas, hasta el final del periodo de frescura normal cuando se vuelve evidente el deterioro del alimento. Los periodos de tiempo deseados y la vida útil normal variarán de un producto alimentario a otro y los expertos en la materia reconocerán que los tiempos de vida útil variarán dependiendo del tipo de producto alimentario, el tamaño del producto alimentario, las temperaturas de almacenamiento, las condiciones de procesamiento, el material de envasado y el equipo de envasado. Preferentemente, la presente invención tiene como resultado la modulación de la expresión de al menos una citocina. Preferentemente, la citocina se selecciona del grupo que consiste en GM-CSF, IL-1RA, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e INF- γ .

40 En una realización, preferentemente la bacteria *Bifidobacterium lactis BL-04* en la composición y/o el producto de fermentación de la presente invención son viables.

El término “viable” significa que un microorganismo (bacteria) es metabólicamente activo o capaz de diferenciarse.

45 En una realización preferida, la composición comprende *Bifidobacterium lactis BLO4* viable.

En algunas realizaciones, la bacteria *Bifidobacterium lactis BLO4* (por ejemplo, las células viables) se aísla del medio en el que se cultivó o el producto de fermentación antes de formar la composición que comprende *Bifidobacterium lactis BLO4* de la presente invención.

50 Sujeto

El término “sujeto”, como se usa en el presente documento, se refiere a un animal. Preferentemente, el sujeto es un mamífero, incluyendo, por ejemplo, ganado (incluyendo vacas, caballos, cerdos, pollos y ovejas), y seres humanos. En algunos aspectos de la presente invención, el animal es un animal de compañía (incluyendo mascotas), tales como, por ejemplo, un perro o un gato. En algunos aspectos de la presente invención, el sujeto puede ser convenientemente un ser humano.

En una realización, el sujeto es un ser humano.

En una realización, el sujeto puede ser una mujer.

En una realización, el sujeto puede ser un hombre.

60 En una realización, el sujeto no es un niño. El término “niño”, como se usa en el presente documento, se refiere a un ser humano de 7 años de edad o menos.

En una realización, el sujeto es un ser humano que tiene 8 años de edad o más.

En una realización, el sujeto es un ser humano que tiene 16 años de edad o más.

En una realización, el sujeto es un ser humano que tiene 18 años de edad o más.

65 En una realización, el sujeto no es un sujeto inmunocomprometido.

En una realización, el sujeto es un sujeto sano.

En una realización, el sujeto no es un sujeto con inmunosupresión inducida por el ejercicio.

En una realización, el sujeto no es un atleta, por ejemplo, no es un atleta de élite, por ejemplo, no es un corredor de carreras de larga distancia.

5 En una realización, el sujeto es un adulto sano, físicamente activo. Adulto, como se usa en el presente documento, puede significar un ser humano que tiene 18 años de edad o más.

En una realización, el sujeto tiene el sistema inmunitario completamente desarrollado y no comprometido.

Ventajas

10 Los inventores han descubierto que, sorprendentemente, el uso de *Bifidobacterium lactis* BL-04 reduce significativamente la incidencia, duración y/o gravedad de enfermedades del tracto respiratorio (por ejemplo, ITRS y/o enfermedad del tracto respiratorio inferior) o los síntomas de enfermedades del tracto respiratorio en comparación con otras bacterias probióticas o un placebo en adultos sanos físicamente activos.

15 Sorprendentemente, este efecto se ha observado usando una sola cepa de *Bifidobacterium* (por ejemplo, sola o sin un microorganismo adicional en la composición).

20 Una ventaja de la presente invención es que *Bifidobacterium lactis* BL-04 reduce significativamente la incidencia, duración y/o gravedad tanto de las ITRS como de las enfermedades del tracto respiratorio inferior; o reduce significativamente la incidencia, duración y/o gravedad de los síntomas tanto de las ITRS como de las enfermedades del tracto respiratorio inferior.

25 Esta es la primera vez que se ha demostrado que una cepa de *Bifidobacterium* tiene un efecto tanto sobre las ITRS como sobre las enfermedades del tracto respiratorio inferior o sobre los síntomas tanto de las ITRS como de las enfermedades del tracto respiratorio inferior.

30 Es importante destacar que los sujetos son adultos sanos físicamente activos. Esto contrasta con los estudios previos que se han realizado en niños o individuos inmunodeprimidos (por ejemplo, en individuos en los que el sistema inmunitario no se ha desarrollado completamente o está afectado de alguna manera). Algunos estudios se han centrado en atletas de élite (por ejemplo, corredores de carreras de larga distancia) - de nuevo donde los individuos se someten a un entrenamiento intenso y padecen inmunosupresión inducida por el ejercicio.

35 En el presente caso, sorprendentemente, los inventores han encontrado efectos beneficiosos en individuos no inmunodeprimidos.

40 Además, los presentes inventores han descubierto que, sorprendentemente, *Bifidobacterium lactis* BL-04 puede reducir significativamente la incidencia, duración y/o gravedad de enfermedades del tracto respiratorio (por ejemplo, ITRS y/o enfermedades del tracto respiratorio inferior) o los síntomas de enfermedades del tracto respiratorio incluso sin una composición simbiótica o una composición con vitaminas y/o minerales.

45 Los presentes inventores han descubierto que los efectos ventajosos observados en la presente invención pueden obtenerse usando *Bifidobacterium lactis* BL-04 solo. Esto puede llevar asociadas muchas ventajas, incluyendo la simplificación de la producción del suplemento y/o la reducción de los costes de fabricación del suplemento y del propio suplemento.

50 Otra ventaja es que *Bifidobacterium lactis* BL-04 se usa sin bacterias probióticas adicionales - esto tiene la ventaja de que simplifica los problemas de estabilidad relacionados con el suplemento. Por lo tanto, una ventaja de la presente invención es que la composición que comprende *Bifidobacterium lactis* BL-04 (por ejemplo, solo o sin la presencia de otro microorganismo) es más fácil de estabilizar ya que el experto solo se preocupa de la estabilidad de una sola bacteria en lugar de más de una bacteria.

55 Además, o como alternativa, el uso de una sola cepa bacteriana en una composición puede tener la ventaja de reducir el coste en uso de la composición en comparación con composiciones de cepas mezcladas.

Otra ventaja significativa descrita en el presente documento es que los inventores han descubierto que, sorprendentemente, el uso de una composición (que comprende *Bifidobacterium lactis* BL-04) de acuerdo con la presente invención puede usarse para modificar o reducir la toma de la medición en un sujeto.

60 De esta manera, la composición descrita en el presente documento ventajosamente puede llevar a una reducción del uso de medicación por un individuo. Esto incluye reducir la cantidad de uno o más de los siguientes medicamentos usados por el individuo: un descongestivo, un antihistamínico, un agente para reducir la fiebre, un agente para aliviar el dolor (por ejemplo, para dolores de cabeza y/u otros dolores y molestias), antiinflamatorios no esteroideos (AINE), antitusivos (o supresores de la tos), un antibiótico o expectorantes (para diluir el moco).

65

Medicamento

El término “medicamento”, como se usa en el presente documento en relación con la invención, incluye medicamentos para uso tanto en seres humanos como en animales en medicina humana y veterinaria. Además, el término “medicamento”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia que proporciona un efecto terapéutico y/o beneficioso. El término “medicamento”, como se usa en el presente documento, no está limitado necesariamente a sustancias que necesitan aprobación para su comercialización, sino que puede incluir sustancias que pueden usarse en cosméticos, nutracéuticos, alimentos (incluyendo comidas y bebidas, por ejemplo) y remedios naturales.

Tratamiento

Se apreciará que, todas las referencias en cuanto a tratamiento, en el presente documento, incluyen el tratamiento curativo, paliativo y profiláctico.

Forma sustancialmente pura y/o forma aislada

Para algunos aspectos, el microorganismo y/o producto de fermentación y/o lisado celular de acuerdo con la presente invención puede estar en una forma sustancialmente pura o puede estar en una forma aislada.

La expresión “forma sustancialmente pura” se usa para indicar que el microorganismo y/o producto de fermentación y/o lisado celular de acuerdo con la presente invención está presente en un alto nivel. Cuando el microorganismo y/o producto de fermentación y/o lisado celular está en una forma sustancialmente pura, el microorganismo y/o producto de fermentación y/o lisado celular es deseablemente el componente predominante presente en una composición. Preferentemente, está presente en un nivel de más del 30 %, de más del 50 %, de más del 75 %, de más del 90 %, o incluso de más del 95 %, determinándose dicho nivel en una base de peso seco/peso seco con respecto a la composición total considerada.

A niveles muy altos (por ejemplo, a niveles de más del 90 %, de más del 95 % o de más del 99 %), el microorganismo y/o producto de fermentación y/o lisado celular puede considerarse “aislado”.

Las sustancias biológicamente activas de la presente invención (incluyendo polipéptidos, moléculas de ácido nucleico, carbohidratos identificados/identificables mediante exploración, lípidos identificados/identificables mediante exploración, restos identificados/identificables mediante exploración, etc.) pueden proporcionarse en una forma que esté sustancialmente libre de uno o más contaminantes con los que la sustancia podría estar asociada de otra manera. De esta manera, por ejemplo, pueden estar sustancialmente libres de uno o más polipéptidos y/o moléculas de ácido nucleico potencialmente contaminantes. Pueden proporcionarse en una forma que esté sustancialmente libre de otros componentes celulares (por ejemplo, de membranas celulares, de citoplasma, etc.). Cuando una composición está sustancialmente libre de un contaminante dado, el contaminante estará a un nivel bajo (por ejemplo, a un nivel de menos del 10 %, menos del 5 % o menos del 1 % en la base de peso seco/peso seco indicada anteriormente).

Combinación con otros componentes

El *Bifidobacterium lactis* BL04 y/o producto de fermentación del mismo y/o lisado celular del mismo para su uso en la presente invención puede usarse en combinación con otros componentes. De esta manera, la presente invención también se refiere a combinaciones. El *Bifidobacterium lactis* BL04 y/o producto de fermentación del mismo y/o lisado celular del mismo puede denominarse en el presente documento “la composición de la presente invención”.

La combinación de la presente invención comprende la composición de la presente invención y otro componente que es adecuado para consumo animal o humano y es capaz de proporcionar un efecto médico o fisiológico beneficioso al consumidor.

Otros componentes de las combinaciones de la presente invención incluyen povidona, tales como Litesse®, y/o una maltodextrina y/o lactitol. Estos otros componentes pueden añadirse opcionalmente a la composición para ayudar al proceso de secado y ayudar a la supervivencia de los microorganismos.

Otros ejemplos de otros componentes adecuados incluyen uno o más de: espesantes, agentes gelificantes, emulsionantes, aglutinantes, modificadores de cristales, edulcorantes (incluyendo edulcorantes artificiales), modificadores de la reología, estabilizantes, antioxidantes, colorantes, enzimas, portadores, vehículos, excipientes, diluyentes, agentes lubricantes, agentes saporíferos, materias colorantes, agentes de suspensión, disgregantes, aglutinantes de granulación, etc. Estos otros componentes pueden ser naturales. Estos otros componentes pueden prepararse mediante el uso de técnicas químicas y/o enzimáticas.

En una realización, el microorganismo y/o producto de fermentación y/o lisado celular del mismo pueden estar encapsulados.

En una realización preferida, el microorganismo y/o producto de fermentación y/o lisado celular del mismo para su uso en la presente invención puede usarse en combinación con uno o más lípidos.

Por ejemplo, microorganismo y/o producto de fermentación y/o lisado celular del mismo para su uso en la presente invención puede usarse en combinación con una o más micelas lipídicas. La micela lipídica puede ser una micela lipídica sencilla o una micela lipídica compleja.

La micela lipídica puede ser un agregado de moléculas orientadas de sustancias anfipáticas.

Las micelas lipídicas pueden ser un agregado, de dimensiones coloidales, de moléculas orientadas de sustancias anfipáticas que existen en equilibrio en solución con la especie química a partir de la cual se formaron. Las micelas generalmente tienen carga eléctrica. En solución acuosa, las moléculas individuales del agregado micelar están orientadas de tal manera que sus grupos polares se dirigen hacia el medio acuoso y su resto hidrófobo se dirige al centro de la micela.

Las micelas lipídicas pueden comprender un lípido y/o un aceite.

Como se usa en el presente documento, la expresión “agente espesante o gelificante” se refiere a un producto que impide la separación al ralentizarse o impedirse el movimiento de las partículas, ya sean gotas de líquidos inmiscibles, aire o sólidos insolubles. El espesamiento se produce cuando las moléculas hidratadas individuales provocan un aumento de viscosidad, ralentizando la separación. La gelificación se produce cuando las moléculas hidratadas se unen para formar una red tridimensional que atrapa las partículas, inmovilizándolas de esta manera.

El término “estabilizante”, como se usa en el presente documento, se define como un ingrediente o combinación de ingredientes que impide que un producto (por ejemplo, un producto alimentario) cambie a lo largo del tiempo.

El término “emulsionante”, como se usa en el presente documento, se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente de un producto alimentario) que impide la separación de emulsiones. Las emulsiones son dos sustancias inmiscibles, una presente en forma de gotas, contenida dentro de la otra. Las emulsiones pueden consistir en emulsiones de aceite en agua, donde la gota o la fase dispersa es aceite y la fase continua es agua; o de agua en aceite, donde el agua se convierte en la fase dispersa y la fase continua es aceite. Las espumas, que son gas en líquido, y las suspensiones, que son sólido en líquido, también pueden estabilizarse mediante el uso de emulsionantes. Puede producirse aireación en un sistema de tres fases en el que el aire queda atrapado por aceite líquido y después se estabiliza por cristales de grasa aglomerados estabilizados con un emulsionante. Los emulsionantes tienen un grupo polar con afinidad por el agua (hidrófilo) y un grupo no polar que se atrae por el aceite (lipófilo). Se absorben en las superficies de contacto de las dos sustancias, proporcionando una película interfacial que actúa estabilizando la emulsión. Las propiedades hidrófilas/lipófilas de los emulsionantes se ven afectadas por la estructura de la molécula. Estas propiedades se identifican por el valor del equilibrio hidrófilo/lipófilo (EHL). Un bajo valor de EHL indica una mayor tendencia lipófila que se usa para estabilizar las emulsiones de agua en aceite. Los altos valores de EHL se asignan a emulsionantes hidrófilos, típicamente usados en las emulsiones de aceite en agua. Estos valores se obtienen a partir de sistemas sencillos. Como los alimentos con frecuencia contienen otros ingredientes que afectan a las propiedades de emulsión, los valores de EHL no siempre pueden ser una guía fiable para la selección del emulsionante.

Como se usa en el presente documento, el término “aglutinante” se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente alimentario) que se une al producto a través de una reacción física o química. Durante la “gelificación”, por ejemplo, se absorbe agua proporcionando un efecto aglutinante. Sin embargo, los aglutinantes pueden absorber otros líquidos, tales como aceites, manteniéndolos dentro del producto. En el contexto de la presente invención, los aglutinantes típicamente se usarían en productos sólidos o de un bajo contenido de humedad, por ejemplo, productos horneados: pasteles, donuts, pan y otros.

La expresión “modificador de cristales”, como se usa en el presente documento, se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente alimentario) que afecta a la cristalización de la grasa o el agua. La estabilización de los cristales de hielo es importante por dos razones. La primera está relacionada directamente con la estabilidad del producto desde el punto de vista de la separación. Cuantos más ciclos de congelación/descongelación se realicen en un producto, mayores se harán los cristales de hielo. Estos cristales grandes pueden romper la estructura del producto, que se produce de forma natural, como en el caso de las paredes celulares, o que se crea por “elación”. Como el agua ya no se mantiene en su sitio, el producto puede presentar sinéresis, o goteo, después de la descongelación. En segundo lugar, en el caso de un producto que se consume congelado, estos cristales grandes dan como resultado una sensación arenosa indeseable en la boca.

“Excipientes” o “vehículos” significa materiales adecuados para la administración de compuestos e incluyen cualquier material de este tipo conocido en la técnica tal como, por ejemplo, cualquier líquido, gel, disolvente, diluyente líquido, solubilizante o similar, que no sea tóxico y que no interaccione con ningún componente de la composición de una manera perjudicial.

Los ejemplos de excipientes nutricionalmente aceptables incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, vaselina, aceites vegetales, polietilenglicoles, propilenglicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite perfumado, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de petroetral, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Los ejemplos de excipientes incluyen uno o más de: celulosa microcristalina y otras celulosas, lactosa, citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato cálcico dibásico, glicina, almidón, azúcar de la leche y polietilenglicoles de alto peso molecular. Los ejemplos de disgregantes incluyen uno o más de: almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), almidón glicolato sódico, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos.

Los ejemplos de aglutinantes de granulación incluyen uno o más de: polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, maltosa, gelatina y goma arábiga.

Los ejemplos de agentes lubricantes incluyen uno o más de: estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco. Los ejemplos de diluyentes incluyen uno o más de: agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos. Los demás componentes pueden usarse simultáneamente (por ejemplo, cuando están mezclados entre sí o incluso cuando se administran por vías diferentes) o secuencialmente (por ejemplo,

pueden administrarse por diferentes vías).

Preferentemente, cuando la composición de la presente invención se administra con otros componentes, los microorganismos permanecen viables.

- 5 Como se usa en el presente documento, la expresión “componente adecuado para el consumo animal o humano” significa un compuesto que es o puede añadirse a la composición de la presente invención como un suplemento que puede tener un efecto nutricional beneficioso, puede ser un sustituto de fibra o puede tener un efecto generalmente beneficioso para el consumidor. Los ingredientes pueden usarse en una amplia diversidad de productos que requieren gelificación, texturización, estabilización, suspensión, formación de películas y estructuración, retención de jugosidad, sin añadir viscosidad innecesaria. Preferentemente, los ingredientes podrán mejorar la vida útil y estabilidad del cultivo viable. Los componentes pueden ser prebióticos tales como alginato, xantano, pectina, goma de algarrobbilla (LBG), inulina, goma guar, galacto-oligosacárido (GOS), fructo-oligosacárido (FOS), polidextrosa (es decir, Litesse®), lactitol, lactosacarosa, oligosacáridos de soja, palatinosa, isomalto-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos y xilo-oligosacáridos.
- 10 La cantidad óptima de la composición a usar en la combinación de la presente invención dependerá del producto a tratar y/o el método para poner en contacto producto con la composición y/o el uso deseado de la misma. La cantidad de microorganismo viable usado en las composiciones debe ser una cantidad suficiente para ser eficaz y para seguir siendo suficientemente eficaz en la mejora del aroma, sabor, suavidad, consistencia, textura, cuerpo, sensación en la boca, viscosidad, estructura y/o propiedades organolépticas, nutrición y/o efectos beneficiosos para la salud de los productos alimentarios que contienen dicha composición. Esta duración de tiempo para la eficacia debe prolongarse al menos durante el tiempo de utilización del producto.

Concentrados

- 25 Las composiciones para su uso en la presente invención pueden estar en forma de concentrados. Típicamente, estos concentrados comprenden una concentración sustancialmente alta de un *Bifidobacterium lactis* BL04 (por ejemplo, *Bifidobacterium lactis* BL04 viable) y/o producto de fermentación y/o lisado celular del mismo. Los polvos, gránulos y composiciones líquidas en forma de concentrados pueden diluirse con agua o resuspenderse en agua u otros diluyentes adecuados, por ejemplo, un medio de crecimiento apropiado tal como leche o aceites minerales o vegetales, para proporcionar composiciones listas para el uso.

Las combinaciones de la presente invención en forma de concentrados pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

- 35 En un aspecto de la presente invención, el producto se pone en contacto mediante una composición en una forma concentrada. Preferentemente, el producto se pone en contacto mediante una composición secada por pulverización y/o resuspendida.

Las composiciones de la presente invención pueden secarse por pulverización o liofilizarse por métodos conocidos en la técnica.

- 40 Los procesos típicos para fabricar partículas usando un proceso de secado por pulverización incluyen un material sólido que se disuelve en un disolvente apropiado (por ejemplo, un cultivo de un microorganismo en un medio de fermentación). Como alternativa, el material puede suspenderse o emulsionarse en un no disolvente para formar una suspensión o emulsión. En esta etapa pueden añadirse otros ingredientes (como se ha analizado anteriormente) o componentes tales como agentes antimicrobianos, agentes estabilizantes, colorantes y agentes que ayudan con el proceso de secado.

- 45 La solución después se atomiza para formar una niebla fina de gotas. Las gotas inmediatamente entran en una cámara de secado donde contactan con un gas de secado. El disolvente se evapora de las gotas en el gas de secado para solidificar las gotas, formando de esta manera partículas. Las partículas después se separan del gas de secado y se recogen.

50 Productos

En la presente invención puede usarse cualquier producto que pueda beneficiarse de la composición. Estos incluyen, pero sin limitación, productos lácteos y productos derivados de lácteos, suplementos de la dieta y productos farmacéuticos.

- 55 A modo de ejemplo, la composición de la presente invención puede usarse como un ingrediente para refrescos, un zumo de frutas o una bebida que comprende proteína de suero, téis para la salud, bebidas de cacao, bebidas de leche y bebidas de bacterias de ácido láctico, yogur y yogur líquido, queso, helado, helados de hielo y postres, pasteles, galletas, tartas y polvo para hacer tartas, aperitivos, alimentos y bebidas equilibradas, rellenos de fruta, glaseados, rellenos para pasteles de chocolate, rellenos con sabor a tarta de queso, rellenos de tartas con sabor a frutas, glaseados de tartas y donuts, cremas de relleno para bollería instantánea, rellenos para galletas, rellenos para bollería lista para el uso, rellenos bajos en calorías, bebidas nutricionales para adultos, bebidas de soja/zumo acidificadas, bebidas de chocolate asépticas/pasteurizadas, mezclas en barras, polvos para bebidas, leche con chocolate normal/con soja fortificada con calcio, bebida de café fortificada con calcio.

- 65 La composición puede usarse además como un ingrediente en productos alimentarios tales como salsa de queso americano, agente anti-aglomerante para queso gratinado y rayado, aderezo para patatas fritas, crema de queso, cubiertas batidas mezcladas en seco, crema agria sin grasa, crema batida láctea para congelar/descongelar,

cubiertas batidas estables frente a la congelación/descongelación, queso cheddar natural de bajo contenido en grasa y ligero, yogur de tipo suizo de bajo contenido en grasa, postres congelados aireados, helados en paquetes duros, helados en paquetes duros en los que se pueden poner fácilmente etiquetas, más económicos y agradables, helado de bajo contenido en grasa; crema de helado, salsa barbacoa, salsa de queso, postre de requesón, salsa

5 Alfredo seca en polvo, salsa de queso en polvo, salsa de tomate seca en polvo y otras.
Para ciertos aspectos, preferentemente la presente invención puede usarse en relación con la producción de yogur, tal como bebidas de yogur fermentado, yogur, yogur líquido, queso, crema fermentada, postres basados en leche y otros. Convenientemente, la composición puede usarse además como un ingrediente en una o más aplicaciones de queso, aplicaciones de carne o aplicaciones que comprenden cultivos protectores.

10 También se describe en el presente documento un método para preparar un alimento o un ingrediente alimentario, comprendiendo el método mezclar la composición de acuerdo con la presente invención con otro ingrediente alimentario.

Ventajosamente, en el presente documento se describen productos que se han puesto en contacto con la composición de la presente invención (y opcionalmente con otros componentes/ingredientes), donde la composición se usa en una cantidad adecuada para poder mejorar la nutrición y/o efectos beneficiosos para la salud del producto. Como se usa en el presente documento, el término "se ha puesto en contacto" se refiere a la aplicación indirecta o directa de la composición de la presente invención al producto. Los ejemplos de los métodos de aplicación que pueden usarse, incluyen, pero sin limitación, tratamiento de un producto en un material que comprende la composición, aplicación directa mezclando la composición con el producto, pulverización de la composición sobre la superficie del producto o inmersión del producto en una preparación de la composición.

20 Cuando el producto descrito en el presente documento es un producto alimentario, la composición de la presente invención preferentemente se mezcla con el producto. Como alternativa, la composición puede incluirse en la emulsión o ingredientes de partida de un producto alimentario. En una alternativa adicional, la composición puede aplicarse como un aderezo, glaseado, mezcla de colorantes y similares.

25 Para algunas aplicaciones, es importante que la composición esté disponible sobre o en la superficie de un producto a tratar/modificar. Esto permite que la composición aporte una o más de las siguientes características favorables: nutrición y/o efectos beneficiosos para la salud.

Las composiciones de la presente invención pueden aplicarse para intercalarse, recubrir y/o impregnar un producto con una cantidad controlada de un microorganismo viable.

30 Alimento

La composición de la presente invención puede usarse como - o en la preparación de - un alimento. En el presente documento, el término "alimento" se usa en sentido amplio - e incluye alimentos para seres humanos así como

35 alimentos para animales (es decir, un pienso). En un aspecto preferido, el alimento es para consumo humano. El alimento puede estar en forma de una solución o como un sólido - dependiendo del uso y/el modo de aplicación y/o el modo de administración.

40 Cuando se usa como - o en la preparación de - un alimento - tal como un alimento funcional - la composición de la presente invención puede usarse junto con uno o más de: un vehículo nutricionalmente aceptable, un diluyente nutricionalmente aceptable, un excipiente nutricionalmente aceptable, un adyuvante nutricionalmente aceptable, un ingrediente activo nutricionalmente aceptable.

45 Preferentemente, la composición se usa para fermentar leche o leche fortificada con sacarosa o medio láctico con sacarosa y/o maltosa, donde el medio resultante que contiene todos los componentes de la composición - es decir, dicho microorganismo de acuerdo con la presente invención - puede añadirse como un ingrediente a leche de yogur en concentraciones adecuadas - tal como, por ejemplo, en concentraciones en el producto final que ofrecen una dosis diaria de 10^5 - 10^{10} ufc. El microorganismo de acuerdo con la presente invención puede usarse antes o después de la fermentación del yogur. Para algunos aspectos, los microorganismos de acuerdo con la presente invención o composición de acuerdo con la presente invención se usan como - o en la preparación de - piensos para animales, tales como piensos para ganado, en particular pienso para aves de corral (tales como pollos), o comida para

50 Ingrediente alimentario

La composición de la presente invención puede usarse como un ingrediente alimentario y/o ingrediente de pienso. Como se usa en el presente documento, la expresión "ingrediente alimentario" o "ingrediente de pienso" incluye una formulación que está presente o puede añadirse a alimentos o productos alimentarios funcionales como un suplemento nutricional.

60 El ingrediente alimentario puede estar en forma de una solución o como un sólido - dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Suplementos de alimentos

La composición de la presente invención puede estar presente en - o puede añadirse a - suplementos de alimentos.

65

Alimentos funcionales

La composición de la presente invención puede estar presente en - o puede añadirse a - alimentos funcionales.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "alimento funcional" se refiere a un alimento que es capaz de proporcionar no solo un efecto nutricional, sino que también es capaz de producir un efecto beneficioso adicional al consumidor.

Por consiguiente, los alimentos funcionales son alimentos normales que tienen componentes o ingredientes (tales como los descritos en el presente documento) incorporados en ellos que aportan al alimento un efecto beneficioso funcional específico - por ejemplo, médico o fisiológico - distinto de un efecto puramente nutricional.

10 Aunque no existe definición legal de un alimento funcional, la mayoría de las partes con interés en esta área coinciden en que son alimentos comercializados como alimentos que tienen efectos específicos sobre la salud aparte de los efectos nutricionales básicos.

15 Algunos alimentos funcionales son nutraceuticos. En el presente documento, el término "nutraceutico" significa un alimento que es capaz de proporcionar no solo un efecto nutricional y/o un sabor satisfactorio, sino que también es capaz de producir un efecto terapéutico (u otro efecto beneficioso) en el consumidor. Los nutraceuticos atraviesan las líneas de división tradicionales entre los alimentos y las medicinas.

Probiótico

20 Para algunas aplicaciones, se cree que el *Bifidobacterium lactis* BL04 viable en la composición de la presente invención puede ejercer un efecto de cultivo probiótico. También está dentro del alcance de la presente invención añadir a la composición de la presente invención prebióticos adicionales.

En el presente documento, un prebiótico es:

25 *"un ingrediente alimentario no digerible que afecta de forma beneficiosa al hospedador mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias beneficiosas"*

30 La expresión "cultivo probiótico", como se usa en el presente documento, define microorganismos vivos (incluyendo bacterias o levaduras, por ejemplo) que, cuando se ingieren o se aplican localmente, por ejemplo, en una cantidad suficiente, afectan de forma beneficiosa al organismo hospedador, es decir, confiriendo uno o más beneficios demostrables sobre la salud en el organismo hospedador. Los probióticos pueden mejorar el equilibrio microbiano en una o más superficies mucosas. Por ejemplo, la superficie mucosa puede ser el intestino, el tracto urinario, el tracto respiratorio o la piel. El término "probiótico", como se usa en el presente documento, también incluye microorganismos vivos que pueden estimular las ramificaciones beneficiosas del sistema inmunitario y al mismo tiempo disminuir las reacciones inflamatorias en una superficie mucosa, por ejemplo, el intestino.

35 Aunque no hay límites inferiores o superiores para la toma de probióticos, se ha sugerido que al menos 10^6 - 10^{12} , preferentemente al menos 10^6 - 10^{10} , preferentemente 10^8 - 10^9 ufc como una dosis diaria será eficaz para conseguir los efectos beneficiosos sobre la salud en un organismo hospedador, tal como un ser humano.

40 Además del efecto probiótico, el microorganismo de acuerdo con la presente invención puede tener, y también está dentro del alcance de la presente invención proporcionar prebióticos como otros compuestos que pueden incluirse en una combinación junto con la composición. El componente prebiótico de la combinación que comprende la composición de la presente invención se caracteriza por una fermentación lenta en el intestino delgado. Dichos prebióticos pueden ejercer un efecto positivo sobre la flora intestinal, específicamente en el lado izquierdo del colon, un área del intestino que es especialmente propensa a trastornos, en particular, cáncer de intestino y colitis ulcerosa.

45 Los prebióticos típicamente son carbohidratos no digeribles (oligo- o polisacáridos) o un alcohol de azúcar que no se degrada o absorbe en el tracto digestivo superior. Los prebióticos conocidos usados en productos comerciales y útiles de acuerdo con la presente invención incluyen inulina (fructo-oligosacárido o FOS) y transgalactooligosacáridos (GOS o TOS). Otros prebióticos adecuados incluyen oligosacárido de palatinosa, oligosacárido de soja, gentiooligosacárido, xilooligómeros, almidón no degradable, lactosacarosa, lactulosa, lactilol, maltitol, polidexotrsa (es decir, Litesse®) o similares.

50 En una realización, la presente invención se refiere a la combinación de un *Bifidobacterium lactis* BL04 y/o producto de fermentación del mismo y/o lisado celular del mismo de acuerdo con la presente invención con un prebiótico.

55 El prebiótico puede administrarse de forma simultánea (por ejemplo, en mezcla junto con o administrado de forma simultánea por la misma vía o por vías diferentes) o secuencialmente (por ejemplo, por la misma vía o por vías diferentes) con el microorganismo de acuerdo con la presente invención y/o producto de fermentación del mismo y/o lisado celular del mismo.

Simbióticos

60 La presente invención también contempla el uso de prebióticos como ingredientes en una combinación junto con la composición de la presente invención que, cuando se combinan, se convierten en simbióticos. El objetivo de esto es combinar los efectos de las bacterias beneficiosas y la estimulación de las bacterias beneficiosas del propio cuerpo. Hay un gran potencial en el desarrollo y el consumo de dichas mezclas, ya que algunas de estas pueden mostrar efectos nutricionales y/o sobre la salud sinérgicos potentes.

65 De esta manera, la composición de la presente invención puede diseñarse específicamente de forma que contenga diferentes componentes que pueden proporcionar un efecto simbiótico al consumidor.

Producto farmacéutico

La composición de la presente invención puede usarse como - o en la preparación de - un producto farmacéutico. En el presente documento la expresión "producto farmacéutico" se usa en sentido amplio - e incluye productos farmacéuticos para seres humanos así como productos farmacéuticos para animales (es decir aplicaciones veterinarias). En un aspecto preferido, el producto farmacéutico es para su uso humano y/o para cría de animales.

El producto farmacéutico puede ser para fines terapéuticos - que pueden ser de naturaleza curativa, paliativa o preventiva. El producto farmacéutico incluso puede tener incluso fines de diagnóstico.

Cuando se usa como - o en la preparación de - un producto farmacéutico, la composición de la presente invención puede usarse junto con uno o más de: un vehículo farmacéuticamente aceptable, un diluyente farmacéuticamente aceptable, un excipiente farmacéuticamente estable, un adyuvante farmacéuticamente aceptable, o un ingrediente activo farmacéuticamente aceptable.

El producto farmacéutico puede estar en forma de una solución o como un sólido - dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Ingrediente farmacéutico

Los microorganismos de la presente invención pueden usarse como ingredientes farmacéuticos. En el presente documento, la composición puede ser el único componente activo o puede ser al menos uno de varios (es decir, 2 o más) componentes activos.

El ingrediente farmacéutico puede estar en forma de una solución o como un sólido - dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Formas

El microorganismo de la presente invención y/o producto de fermentación del mismo y/o lisado celular del mismo puede usarse en cualquier forma adecuada - tanto si está solo como si está presente en una combinación con otros componentes o ingredientes. De forma similar, las combinaciones que comprenden la composición de la presente invención y otros componentes y/o ingredientes (es decir ingredientes - tales como ingredientes alimentarios, ingredientes de alimentos funcionales o ingredientes farmacéuticos) pueden usarse en cualquier forma adecuada.

El microorganismo de la presente invención o composición de la presente invención puede usarse en forma de preparaciones sólidas o líquidas o alternativas de las mismas. Los ejemplos de preparaciones sólidas incluyen, pero sin limitación, comprimidos, cápsulas, polvo fino, gránulos y polvos que pueden ser humectables, secarse por pulverización o secarse por congelación. Los ejemplos de preparaciones líquidas incluyen, pero sin limitación, soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas, orgánicas o acuoso-orgánicas. Los ejemplos adecuados de formas incluyen uno o más de: comprimidos, píldoras, cápsulas, óvulos, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes saporíferos o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retrasada, modificada, sostenida, pulsátil o controlada.

A modo de ejemplo, si la composición de la presente invención se usa en forma de un comprimido - tal como para el uso como un ingrediente funcional - los comprimidos también pueden contener uno o más de: excipiente tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato cálcico dibásico y glicina; disgregantes tales como almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), almidón glicolato sódico, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos; aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Pueden incluirse agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

Los ejemplos de vehículos nutricionalmente aceptables para su uso en la preparación de las formas incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, ceras de silicona, vaselina, aceites vegetales, polietilenglicoles, propilenglicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite perfumado, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de petroetral, hidroximetil-celulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Los excipientes preferidos para las formas incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de la leche o polietilenglicoles de alto peso molecular.

Para las suspensiones acuosas y/o elixires, la composición de la presente invención puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o saporíferos, materias colorantes o tintes, con emulsionantes y/o agentes de suspensión y con diluyentes tales como agua, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

Las formas también pueden incluir cápsulas de gelatina; cápsulas de fibra, comprimidos de fibra, etc.; o incluso bebidas de fibra.

Otros ejemplos de formas son las formas de crema, por ejemplo. Para algunos aspectos, el microorganismo y/o un metabolito del mismo puede incluirse en cremas farmacéuticas y/o cosméticas tales como, por ejemplo, cremas solares y/o cremas para después de tomar el sol.

En un aspecto, la composición de acuerdo con la presente invención puede administrarse en un aerosol, por ejemplo por medio de un pulverizador nasal, por ejemplo para administrarse en el tracto respiratorio.

65

Ejemplos

La presente invención se describirá adicionalmente haciendo referencia a los siguientes Ejemplos y figuras en los que:

- 5 La Figura 1 muestra una representación esquemática de los experimentos realizados para mostrar la presente invención.
La Figura 2 muestra un Diagrama de Flujo Consort que detalla el reclutamiento, procesamiento y análisis de sujetos.

10 Metodología

Enfoque experimental: el estudio incluyó un ensayo doble ciego, controlado con placebo de individuos sanos físicamente activos de la comunidad para establecer si 150 días de suplemento con un probiótico reduce las ITRS durante el periodo de invierno entre junio y octubre de 2010 (Figura 1). Había dos grupos experimentales, un grupo de placebo y un grupo de probiótico, que comprendían 309 adultos sanos físicamente activos, 157 hombres y 152 mujeres en números equivalentes. Los participantes completaron un ensayo de 14 días en el que todos usaron probióticos y suplementos de probióticos/alimentos enriquecidos y se interrumpió la administración de medicaciones o suplementos inmunomoduladores. Después de la toma de muestras iniciales, los sujetos empezaron un periodo con suplementos de 150 días. Se pidió a todos los participantes que mantuvieran un diario de enfermedad para registrar los patrones de enfermedad (duración y gravedad). Se eligió una cohorte de participantes de cada grupo para un análisis secundario de la función inmunitaria y microbiología. Cada cohorte de participantes proporcionó muestras de sangre y fecales, y una torunda de garganta para examinar el efecto de los suplementos sobre la microbiota entérica y del TRS, índices de la función inmunitaria innata (función de células NK y fagocitosis). Se recogieron muestras de saliva, pero el análisis será dependiente de si se identifican resultados clínicos beneficiosos. Un análisis secundario incluyó la recogida de una torunda fecal para sujetos que viajaron a Asia, con el fin de determinar si el suplemento probiótico reduce la colonización de *Escherichia coli* resistente a antibióticos durante los viajes.

La acreditación del Comité de Ética se otorgó por los Comités de Ética del Instituto Australiano de Deportes (19 de febrero de 2010) y la Universidad Griffith (11 de marzo de 2010).

Sujetos y reclutamiento

En el estudio se reclutaron 268 miembros sanos físicamente activos de la comunidad. De estos, 226 individuos se incluyeron en el análisis estadístico de las medidas de actividad física y enfermedad. Las características de los sujetos incluidos en el análisis estadístico se detallan en la Tabla 1. No hubo diferencias sustanciales entre los grupos.

40 Criterios de inclusión:

La inclusión en el estudio se determinó de acuerdo con los niveles de actividad física con participantes que se requería que realizarán un mínimo de tres sesiones de ejercicio a la semana.

45 Criterios de exclusión:

Se pidió a todos los participantes que declararan su uso de adyuvantes de la dieta y/o ergogénicos que pudieran influir en la función inmunitaria subyacente. Se excluyeron todos los participantes con medicaciones inmunomoduladoras, incluyendo los que tomaban tratamientos contra el asma basados en esteroides. También se excluyeron los sujetos que se habían sometido a tratamientos con antibióticos en el mes previo. Se excluyeron los sujetos con cualquier síntoma de enfermedad gastrointestinal, tal como enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca y afecciones relacionadas.

Medidas de resultados primarios:

La medida del resultado clínico primario fue enfermedad del TRS en los participantes durante el periodo de estudio. Se pidió a los sujetos que registraran cualquier síntoma de ITRS y enfermedad de pecho en un registro de enfermedad diario durante el periodo de estudio. En resumen, los síntomas de ITRS incluían dolor de garganta, estornudos, congestión nasal o goteo nasal y tos. Los síntomas de la enfermedad respiratoria inferior incluían tos con congestión de pecho y/o sibilancias. Se realizaba una clasificación de un episodio enfermedad cuando dos o más síntomas se registraban en días consecutivos. El impacto funcional o gravedad de los síntomas para individuos físicamente activos se autocalificó como leve, moderado o severo basándose en el impacto de los síntomas sobre la actividad diaria para ese día: leve - sin cambio, moderado - una reducción de la actividad normal, y grave - cese total de la actividad.

65

Medidas de resultados secundarios

Estrés y resiliencia percibidos: el estrés y la resiliencia percibidos de los participantes se midieron mediante un cuestionario antes y después de la administración del suplemento. Los factores psicológicos y sociales representan una fuente de estrés que puede afectar a la inmunidad y a la salud. Todos los sujetos realizaron el cuestionario de Resiliencia de Connor Davidson antes y al final de la administración del suplemento.

Una cohorte de participantes (53 del grupo de *B. lactis BL-04*, 51 del grupo de placebo) de cada uno de los grupos de tratamiento proporcionó muestras para las siguientes medidas de resultados secundarios.

Microbiología fecal

- Recuento total de bacterias (eubacterias):

- Cuantificación de los grupos bacterianos en muestras fecales:

Estos grupos pueden incluir, pero sin limitación, *Bacteroidetes*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. Grupo XIV de *Clostridium* y otros grupos de clostridios, *Clostridium difficile*, *Collinsella*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia* spp., *Veillonella* spp., y bacterias reductoras de sulfato. La cuantificación bacteriana se realizará con qPCR y/o con otros métodos independientes de cultivo relevantes. El análisis de las bacterias de la torunda de garganta por qPCR se centrará en grupos bacterianos particularmente relevantes que pueden incluir, pero sin limitación, *Staphylococcus aureus*, *Pneumococcus* spp. y *Streptococcus* spp.

- *Escherichia coli* resistente a antibióticos:

- *L. acidophilus* NCFM y *B. lactis* Bi-07 y *B. lactis* BL-04:

Suero

- Actividad de linfocitos citolíticos naturales
- Fagocitosis

Análisis de datos

Se usó un enfoque práctico para realizar una deducción (conclusión) acerca de los efectos clínicos y fisiológicos de los tratamientos probióticos. Este enfoque se ha detallado en varios artículos (6). Este enfoque también es coherente con el Comité Internacional de Directrices de Editores de Revistas Médicas para evaluar ensayos clínicos. Los méritos de este enfoque para tratar algunos de los inconvenientes de un enfoque basado en el ensayo de hipótesis y significado estadístico están bien reconocido. El enfoque se basa en dónde cae el intervalo de incertidumbre en el valor verdadero de un efecto en relación con los umbrales para valores que son clínicamente importantes. La incertidumbre en el valor verdadero es el intervalo de confianza. Como hay un gran número de efectos en este estudio, se eligió un nivel conservativo del 99 % para el intervalo de confianza. En otras palabras, había una probabilidad del 99 % de que el valor verdadero de cada efecto cayera dentro del intervalo de confianza que se calcula para él a partir de los datos. Cuando el intervalo de confianza incluye valores que son sustanciales en algún sentido positivo y negativo, tal como beneficioso y perjudicial, el efecto podría ser tanto beneficioso como perjudicial, en este caso se ha deducido que el efecto no es *concluyente* o que es *poco claro*. Por el contrario, se deduce que el efecto es claro, y la magnitud asignada al efecto es la magnitud observada, tal como una diferencia beneficiosa, trivial o perjudicial.

Los umbrales elegidos como clínicamente importantes difieren para los diferentes tipos de variables de resultados en el estudio. Para variables tales como la intensidad de un síntoma en una escala de 3 puntos, se analizó el efecto del tratamiento probiótico como una simple diferencia de las medias: media de probiótico menos media de placebo. Para este tipo de efecto, los umbrales por defecto son una diferencia positiva y negativa en las medias igual a 0,20 de la desviación típica entre sujetos reunida en los dos grupos. Este enfoque para los efectos menos importantes se conoce como estandarización y proporciona umbrales para efectos moderados, grandes y muy grandes (desviaciones típicas de 0,60, 1,20 y 2,0). Otras variables para las que los presentes inventores eligen umbrales de magnitud de esta manera fueron el número de medicaciones tomadas por 100 días, la intensidad de la actividad física, el número de días de ejercicio por semana, las horas de ejercicio total por semana, la carga de actividad total por semana (suma del producto de intensidad de ejercicio y número de días de ejercicio por semana) y las variables de muestras de saliva que se midieron para determinar su papel potencial como mecanismos de cualquier efecto del tratamiento. Las medidas de horas de entrenamiento y carga de entrenamiento se transformaron logarítmicamente antes del análisis para permitir el análisis apropiado del efecto del tratamiento como un porcentaje pero la magnitud del efecto se determinó para la variable transformada logarítmicamente. Las mediciones de saliva también se transformaron logarítmicamente antes del análisis pero la variabilidad y los efectos para esas variables

generalmente fueron mucho mayores que para las variables de entrenamiento y por lo tanto se expresaron como factores.

Los umbrales de magnitud para variables que representaban o implicaban la presencia o recuento de un síntoma tuvieron que determinarse de una manera diferente debido a que el uso de una desviación típica para dichas variables no es apropiado. Las variables en cuestión fueron el número de episodios de un síntoma dado por 100 días, el número total de días del síntoma por 100 días y la carga total del síntoma por 100 días (suma del producto de intensidad de síntomas y número de días del síntoma por 100 días). El efecto del tratamiento probiótico sobre todas estas variables se analizó como una relación: la media del grupo de probiótico dividida entre la media del grupo de placebo. Se consideró una relación de 1,10 (es decir, un valor medio de la variable un 10 % mayor en el grupo de probiótico) como umbral para un aumento sustancial. Por razones estadísticas, el umbral para una reducción sustancial en el grupo de probiótico, por lo tanto, fue una relación de 1/1,2 o 0,83. Estas relaciones son similares a las relaciones de riesgo de enfermedad y lesiones en estudios de salud pública; los epidemiólogos consideran que una relación de riesgo de 1,1-1,3 representa un aumento sustancial del riesgo. Desafortunadamente, aún no hay un consenso sobre los umbrales que representan aumentos y reducciones del riesgo moderadas, grandes y muy grandes.

Los datos de los periodos de “pico” definidos como 2 semanas después del inicio y el final de la administración del suplemento se analizaron usando un factor de ponderación lineal para asignar una proporción apropiada de las puntuaciones de entrenamiento y síntomas a los periodos iniciales y de tratamiento completo. De esta manera, el primer día después del inicio del tratamiento, 13/14 de los valores de los sujetos se asignaron al periodo inicial y 1/14 se asignó al periodo de tratamiento. El segundo día del pico, las fracciones fueron 12/14 y 2/14 y así sucesivamente.

También se tuvieron en cuenta los datos iniciales. Cuando se registran los valores iniciales, es habitual ajustar las diferencias entre sujetos en el punto inicial restando las puntuaciones iniciales de las puntuaciones de tratamiento. Esta estrategia normalmente produce una mayor precisión del efecto de un tratamiento que la proporcionada por un análisis de las puntuaciones de tratamiento solo y de esta forma permite el uso de tamaños de muestra más pequeños. Sin embargo, generalmente no se aprecia que el ajuste de una puntuación inicial de esta manera de como resultado una mejor precisión solo cuando la variable que se está analizando es razonablemente fiable (es decir, las puntuaciones de los sujetos tienden a ser constantemente diferentes entre sí en los ensayos de pre- y post-tratamiento). En este estudio, se analizaron las variables de síntomas y entrenamiento como puntuaciones solo del tratamiento. Estaba claro que el efecto del tratamiento sobre los síntomas era más preciso para el análisis solo del tratamiento, mientras que el efecto sobre el entrenamiento era más preciso para los cambios de inicio del tratamiento: evidentemente, el entrenamiento de los sujetos era más fiable y estaba mejor definido por la supervisión inicial que por sus síntomas de enfermedad. Por lo tanto, el análisis de solo tratamiento se presenta para los síntomas y el análisis de inicio de tratamiento para el entrenamiento. Para tomar la decisión acerca del uso de análisis solo de tratamiento frente a inicial de tratamiento, se evitó deliberadamente el examen de la magnitud del efecto y el enfoque se realizó solo en la comparación de la precisión de la estimación del efecto del tratamiento. Las variables de saliva también se han presentado como análisis iniciales del tratamiento.

Los límites de confianza para las puntuaciones de síntomas se estimaron por un método empírico conocido como *bootstrapping* (muestreo aleatorio con reemplazo), porque los enfoques analíticos habituales implican suposiciones que son difíciles de justificar para medidas que implican la duración de los síntomas. También se usó *bootstrapping* con las medidas de entrenamiento. Estos análisis se realizaron usando programas escritos en el Sistema de Análisis Estadístico.

Tratamientos

El suplemento Z contenía una combinación de *Lactobacillus acidophilus* NCFM y *Bifidobacterium lactis* Bi-07 – la dosificación fue de 5×10^9 UFC/día para cada bacteria, por lo tanto una dosificación total de 10^9 UFC/día.

El suplemento X contenía *Bifidobacterium lactis* BL-04 – la dosificación fue 2×10^9 UFC/día.

El suplemento Y de placebo contenía sacarosa.

Los suplementos Z y X eran bacterias liofilizadas mezcladas en una bebida fría (no debía consumirse alcohol y la bebida no estaba caliente).

Resultados

En la Figura 2 se presenta un Diagrama de Flujo Consort que detalla el reclutamiento, procesamiento y análisis de los sujetos.

Detalles de los sujetos

Características físicas y fisiológicas: los detalles de las características de los sujetos incluidas para el análisis se detallan en la tabla 1 para cada uno de los grupos. No hubo diferencias sustanciales entre los grupos en cuanto al sexo, la edad o el índice de masa corporal.

5

Tabla 1

Características de los individuos incluidos para el análisis en cada uno de los grupos. Media \pm DT							
Variable	Grupo	Sexo	Número	Media	DT	Mín	Máx
Edad	BL-04	mujer	65	39,2	11,1	19,3	61,2
Edad	Placebo	mujer	66	37,2	12	19,5	64,4
Edad	BL-04	hombre	72	36	11,4	18,9	65,5
Edad	Placebo	hombre	65	37,7	10,1	19	55,6
IMC	BL-04	mujer	62	24,1	3,1	18,8	32,4
IMC	Placebo	mujer	63	23,5	3,4	17,4	32,6
IMC	BL-04	hombre	68	24,8	2,9	14,2	31,6
IMC	Placebo	hombre	61	25,3	2,6	20,1	32,2
Horas de Ejercicio por sem.	BL-04	mujer	29	9,6	5,6	2	25
Horas de Ejercicio por sem.	Placebo	mujer	34	7	3,4	3	16
Horas de Ejercicio por sem.	BL-04	hombre	36	7,7	3,2	2,5	15,5
Horas de Ejercicio por sem.	Placebo	hombre	31	7,9	3	3,5	14

Cumplimiento

10

Los detalles de cumplimiento y el número medio de días de suplemento completados por los participantes en cada grupo se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2

El grado de cumplimiento y el número medio de días de suplemento completados por los participantes en cada uno de los tres grupos de tratamiento durante el transcurso del estudio						
Variable	Grupo	Sexo	Media	DT	Mín	Máx
% de bolsas dejadas	BL-04	mujer	13,5	17,9	0	100
% de bolsas dejadas	Placebo	mujer	11,6	12,7	0	55
% de bolsas dejadas	BL-04	hombre	7,3	12,1	0	75
% de bolsas dejadas	Placebo	hombre	15,1	16,1	0	80
Días de suplemento (%)	BL-04	mujer	95,7	5,8	70,6	100
Días de suplemento (%)	Placebo	mujer	94,4	7,5	71,8	100
Días de suplemento (%)	BL-04	hombre	95,2	8,4	60,5	100
Días de suplemento (%)	Placebo	hombre	95	6,5	73,8	100

15 Efectos adversos

20 Cuatro sujetos experimentaron diarrea y calambres al principio del suplemento. Tres de estos sujetos abandonaron y los síntomas desaparecieron en el tercero. Un sujeto abandonó debido a dolores de cabeza que empezaron con el suplemento, incluyendo después de una interrupción de la toma del suplemento asignado. Un sujeto experimentó urticaria después de iniciar el suplemento y abandonó. Un sujeto experimentó dolor intestinal después de viajar a Asia. La fecha del viaje coincidió con la toma del suplemento y el sujeto abandonó.

Información de la dieta

25 La información de la dieta con respecto a la ingesta de fibra en cada uno de los grupos de tratamiento se presenta en la Tabla 3. No hubo diferencias sustanciales entre los grupos en raciones de fibra.

Tabla 3

Número de raciones estándar de fibra al día por grupo de tratamiento y género en el punto medio (Mid), al final del estudio (Final) y media de ambos puntos de tiempo (Media).								
Variable	Tratamiento	Sexo	N	N frac.	Media	DT	Mín	Máx
Raciones de fibra por día Pm	BL-04	mujer	48	17	4,0	6,1	0,3	31,8
Raciones de fibra por día Pm	BL-04	hombre	55	17	2,9	1,6	0,3	7,3

Número de raciones estándar de fibra al día por grupo de tratamiento y género en el punto medio (Mid), al final del estudio (Final) y media de ambos puntos de tiempo (Media).

Variable	Tratamiento	Sexo	N	N frac.	Media	DT	Mín	Máx
Raciones de fibra por día Pm	Pla	mujer	56	10	4,8	8,3	0,6	46,7
Raciones de fibra por día Pm	Pla	mujer	48	17	4,9	8,1	0,4	56,5
Raciones de fibra por día final	BL-04	mujer	52	13	3,3	4,5	0,2	32,4
Raciones de fibra por día final	BL-04	hombre	55	17	4,0	5,5	0,3	40,8
Raciones de fibra por día final	Pla	mujer	56	10	4,4	6,4	0,3	40,8
Raciones de fibra por día final	Pla	mujer	53	12	3,7	3,5	0,0	23,4
Raciones de fibra por día media	BL-04	mujer	55	10	3,6	4,6	0,3	31,4
Raciones de fibra por día media	BL-04	hombre	60	12	3,4	3,0	0,3	22,4
Raciones de fibra por día media	Pla	mujer	62	4	5,0	7,4	0,8	40,8
Raciones de fibra por día media	Pla	hombre	57	8	4,3	4,6	0,6	30,0

Pla – placebo;

Información sobre la actividad física

5 En la Tabla 4 se presentan los detalles de entrenamiento de los participantes por grupo de tratamiento durante el estudio. No hubo diferencias sustanciales entre los grupos en los patrones de actividad física.

Tabla 4

Entrenamiento del sujeto durante el estudio. Intensidad evaluada en una escala de 1-10; la carga de entrenamiento es la suma del producto de intensidad de entrenamiento y duración de entrenamiento en unidades arbitrarias.

Variable	Grupo	Sexo	Número	Media	DT	Mín	Máx
Intensidad de entrenamiento	BL-04	mujer	65	5,7	1,4	1,8	8,6
Intensidad de entrenamiento	Placebo	mujer	66	5,8	1,4	1,3	8,9
Intensidad de entrenamiento	BL-04	hombre	72	6,1	1,3	2,9	9
Intensidad de entrenamiento	Placebo	hombre	65	6,1	1,1	2,6	8,5
Días de entrenamiento por semana	BL-04	mujer	65	4,5	1,3	2,1	6,9
Días de entrenamiento por semana	Placebo	mujer	66	4,1	1,2	1,4	6,9
Días de entrenamiento por semana	BL-04	hombre	72	3,9	1,3	1,6	6,3
Días de entrenamiento por semana	Placebo	hombre	65	4	1,4	0,6	6,9
Horas de entrenamiento por semana	BL-04	mujer	65	5,9	2,6	2	14,6
Horas de entrenamiento por semana	Placebo	mujer	66	5,4	2,9	1,5	18,2
Horas de entrenamiento por semana	BL-04	hombre	72	5,9	3,7	1,5	24,2
Horas de entrenamiento por semana	Placebo	hombre	65	5,7	4	1	19,5
Carga de entrenamiento por semana	BL-04	mujer	65	34	16	8,2	79,9
Carga de entrenamiento por semana	Placebo	mujer	66	31,7	17,8	4,2	98,8
Carga de entrenamiento por semana	BL-04	hombre	72	35,2	19,8	4,9	119,2
Carga de entrenamiento por semana	Placebo	hombre	65	33,7	21,9	6,3	119,3

Episodios de enfermedad

10

Enfermedad del tracto respiratorio superior

El efecto del suplemento de probióticos sobre el número de episodios de enfermedad del tracto respiratorio de duración variable se muestra en la Tabla 5a. *B. lactis* BL04 redujo el número de enfermedades del tracto respiratorio de mayor duración. Además, este efecto fue más pronunciado según los episodios de enfermedad se volvían más largos.

15

Tabla 5

Duración de la enfermedad	Grupo de probiótico (Media ± DT)	Grupo de placebo (Media ± DT)	Efecto de tratamiento probiótico con respecto al placebo (Media; IC 99%)	Deducción clínica	Valor P
1 día	1,93	1,93	1,00 (0,74 a 1,72)	No clara	0,9
3 días	0,6	0,75	0,80 (0,52 a 1,21)	Posible ↓	0,16
5 días	0,22	0,33	0,65 (0,33 a 1,29)	Probable ↓	0,11
7 días	0,09	0,16	0,54 (0,21 a 1,30)	Probable ↓	0,09

Infección de pecho (infección del tracto respiratorio inferior)

- 5 El efecto de *B. lactis* sobre la infección de pecho se muestra en la Tabla 5b. De forma similar a los efectos de *B. lactis* BL04 sobre ITRS, el suplemento redujo el número de episodios de infección de pecho que duró 5 días en comparación con los episodios que duraron menos tiempo.

Duración de la enfermedad	Grupo de probiótico (Media ± DT)	Grupo de placebo (Media ± DT)	Efecto de tratamiento probiótico con respecto al placebo (Media; IC 99%)	Deducción clínica	Valor P
1 día	1,41	1,49	0,94 (0,67 a 1,33)	No clara	0,7
3 días	0,39	0,48	0,81 (0,48 a 1,38)	No clara	0,3
5 días	0,11	0,19	0,55 (0,24 a 1,27)	Probable ↓	0,06

10 Patrones de enfermedad

La diferencia en la frecuencia, duración, gravedad y carga combinada de enfermedad respiratoria superior entre los grupos de probiótico y de placebo durante el periodo de tratamiento se muestra en la Tabla 6. Hubo una carga y duración de la enfermedad sustancialmente menor en los que tomaban BL-04 en comparación con el placebo. Basándose en el género, estas reducciones también fueron más pronunciadas en mujeres que en hombres.

15

Tabla 6

	Valores observados (media ± DT)		Efecto de BL-04 frente a Placebo	
	BL-04	Placebo	Media, IC	Deducción
Todos				
n.º de episodios (/100 días)	1,93 ± 1,90	1,93 ± 1,90	Relación 1,0; 0,74 a 1,34	No clara
Duración (/100 días)	2,9 ×/÷ 3,8	3,9 ×/÷ 3,4	Diferencia (%) 25 -52 a 17	Posible ↓
Gravedad (escala 1-3)	1,47 ± 0,42	1,48 ± 0,36	Diferencia -0,01 -0,15 a 0,12	No clara
Carga de enfermedad	4,1 ×/÷ 4,1	5,7 ×/÷ 5,7	Diferencia (%) -27; -55 a 18	Posible ↓
Mujeres				
n.º de episodios (/100 días)	2,01 ± 1,96	2,28 ± 1,96	Relación 0,88; 0,59 a 1,32	No claro
Duración (/100 días)	2,7 ×/÷ 4,6	3,0 ×/÷ 3,1	Diferencia (%) -44; -71 a 10	Probable ↓
Gravedad (escala 1-3)	1,43 ± 0,43	1,44 ± 0,45	Diferencia -0,01; -0,18 a 0,17	No claro
Carga de enfermedad	3,5 ×/÷ 5,2	6,3 ×/÷ 3,5	Diferencia (%) -45; -73 a 14	Probable ↓
Hombres				
n.º de episodios (/100 días)	1,84 ± 1,84	1,63 ± 1,69	Relación 1,13; 0,74 a 1,72	No claro
Duración (/100 días)	3,4 ×/÷ 3,0	3,4 ×/÷ 3,4	Diferencia (%) -1; -46 a 83	No claro
Gravedad (escala 1-3)	1,51 ± 0,41	1,53 ± 0,61	Diferencia -0,02; -0,23 a 0,19	No claro
Carga de enfermedad	4,9 ×/÷ 3,3	5,1 ×/÷ 3,4	Diferencia (%) -4; -50 a 84	No claro

- 20 La diferencia en la frecuencia, duración, gravedad y carga combinada de enfermedad de pecho (enfermedad respiratoria inferior) entre los grupos de probiótico y placebo durante el periodo de tratamiento se muestra en la Tabla 7. Hay una reducción en la gravedad de los síntomas de infección de pecho en BL-04 en comparación con placebo.

Tabla 7

El efecto del tratamiento probiótico sobre el número, duración, gravedad y carga combinada de infección de pecho	Valores observados (media ± DT)		Efecto de BL-04 frente a Placebo	
	BL-04	Placebo	Media; IC	Deducción
	Todos			
n.º de episodios (/100 días)	1,41 ± 1,62	1,49 ± 1,70	Relación 0,94; 0,67 a 1,33	No claro
Duración (/100 días)	2,6 x/÷ 2,9	2,8 x/÷ 3,1	Diferencia (%) -9 -40 a 38	No claro
Gravedad (escala 1-3)	1,42 ± 0,42	1,51 ± 0,53	Diferencia -0,09 -0,27 a 0,09	Posible ↓
Carga de enfermedad	3,5 x/÷ 3,2	4,0 x/÷ 3,3	Diferencia (%) -12; 43 a 36	No claro
Mujeres				
n.º de episodios (/100 días)	1,44 ± 1,66	1,80 ± 1,96	Relación 0,80; 0,50 a 1,29	No claro
Duración (/100 días)	2,7 x/÷ 2,7	3,0 x/÷ 3,1	Diferencia (%) -11; -49 a 55	No claro
Gravedad (escala 1-3)	1,44 ± 0,43	1,46 ± 0,45	Diferencia -0,01; -0,24 a 0,21	No claro
Carga de enfermedad	3,8 x/÷ 3,0	4,2 x/÷ 3,3	Diferencia (%) -9,8; -50 a 63	No claro
Hombres				
n.º de episodios (/100 días)	1,37 ± 1,59	1,24 ± 1,48	Relación 1,10; 0,68 a 1,81	No claro
Duración (/100 días)	2,5 x/÷ 3,2	2,7 x/÷ 3,2	Diferencia (%) -7; -50 a 74	No claro
Gravedad (escala 1-3)	1,40 ± 0,41	1,57 ± 0,61	Diferencia -0,17; -0,45 a 0,11	No claro
Carga de enfermedad	3,3 x/÷ 3,5	3,9 x/÷ 3,3	Diferencia (%) -14; -55 a 65	No claro

5 La diferencia en la frecuencia, duración, gravedad y carga combinada de uso médico entre los grupos durante el periodo de tratamiento se muestra en la Tabla 8. En resumen, los participantes con BL-04 tuvieron un número total sustancialmente menor de medicaciones y días totales de medicaciones en comparación con los tratados con placebo. Cuando se examinó el género el efecto se mantuvo en los hombres pero menos en las mujeres.

Tabla 8

El efecto del tratamiento probiótico sobre el número, duración, gravedad y carga combinada de episodios de medicación.	Valores observados (media ± DT)		Efecto de BL-04 frente a Placebo	
	BL-04	Placebo	Media; IC	Deducción
	Todos			
n.º de episodios med (/100 días)	1,04 ± 1,27	1,19 ± 1,39	Relación 0,88; 0,62 a 1,25	No claro
Días totales de medicaciones (/100 días)	2,7 /÷ 3,0	4,0 /÷ 3,0	Diferencia (%) -31; -55 a 4,4	Poco probable ↓
Media de n.º de medicación por episodio	1,30 ± 0,56	1,28 ± 0,44	Diferencia 0,01; -0,19 a 0,21	No claro
n.º total de medicaciones	3,4 /÷ 3,4	5,0 /÷ 3,3	Diferencia (%) -32; -57 a 9	Probable ↓
Mujeres				
n.º de episodios med (/100 días)	1,32 ± 1,50	1,43 ± 1,58	Relación 1,08; 0,67 a 1,73	No claro
Días totales de medicaciones (/100 días)	3,5 /÷ 2,6	4,2 /÷ 3,5	Diferencia (%) -15; -54 a 58	No claro
Media de n.º de medicación por episodio	1,32 ± 0,40	1,31 ± 0,35	Diferencia 0,01; 0,21 a -0,20	No claro
n.º total de medicaciones	4,6 /÷ 3,0	5,5 /÷ 4,0	Diferencia (%) -16; -58 a 68	No claro
Hombres				
n.º de episodios med (/100 días)	0,82 ± 1,08	0,99 ± 1,23	Relación 0,83; 0,49 a 1,40	No claro
Días totales de medicaciones (/100 días)	2,1 /÷ 3,2	3,8 /÷ 2,4	Diferencia (%) -44; -68 a -2	Muy probable
Media de n.º de medicación por episodio	1,27 ± 0,69	1,25 ± 0,52	Diferencia 0,02; -0,32 a 0,36	No claro
n.º total de medicaciones	2,5 /÷ 3,5	4,5 /÷ 2,6	Diferencia (%) -44; -70 a 5	Probable ↓

Conclusiones

Los resultados demuestran que el suplemento con *B. lactis* BL-04 inducían una reducción sustancial en el número de enfermedades respiratorias superiores e inferiores y una reducción en la gravedad y duración de ITRS y síntomas del tracto respiratorio inferior.

Análisis completo de datos

El análisis intermedio a un intervalo de confianza del 99% sugirió que *B. lactis* BL-04 puede ser eficaz para prevenir infecciones del tracto respiratorio y reducir la necesidad de medicaciones asociadas con infecciones respiratorias (véanse las tablas 5a, 5b, 6, 7 y 8). Los resultados intermedios alentadores garantizaban el análisis completo de los datos, como se muestra a continuación.

El análisis completo de los datos (n= 399) se basó en la determinación tanto del significado clínico como del ensayo del significado estadístico. El significado estadístico se determinó usando los intervalos de confianza tradicionales del 95%. Para el ensayo del significado clínico, el umbral predefinido para la relevancia clínica se fijó a una reducción de los síntomas del 20% en comparación con el grupo del placebo.

Como se muestra en la Tabla 9, el tratamiento con *B. lactis* BL-04 redujo los síntomas de las enfermedades del tracto respiratorio superior de forma notable. El efecto de reducción fue más fuerte para las enfermedades con mayor duración, es decir, los episodios más graves de enfermedad. Las enfermedades con duración de 7 días o más se redujeron en un 46% en comparación con el placebo. En todas las categorías de duración de enfermedad (3 d, 5 d, y 7 días o más), la reducción igual o mayor que el valor límite predefinido del significado clínico. Sorprendentemente, los efectos de BL-04 sobre la enfermedad respiratoria superior fueron más fuertes que para la combinación de NCFM y Bi-07. Esto fue particularmente sorprendente porque el probiótico BL-04 se administró a una dosis menor que la combinación de probióticos.

Tanto BL-04 como la combinación de NCFM y Bi-07 fueron igualmente eficaces para reducir las infecciones de pecho respiratorias inferiores (véase la Tabla 9). Un análisis separado también demostró que tanto NCFM + Bi-07 como cepa individual tenía un efecto reductor significativo sobre la duración de los episodios de enfermedad.

Tabla 9

	BI-04 frente a placebo (%)	NCFM + Bi07 frente a placebo
Duración	Media; IC 95% % de reducción	Media; IC 95% relaciones de proporción
Enfermedad del tracto respiratorio superior		
3 días	20% (-10 a 42%)	16% (-15 a 39%)
5 días	35% (-9 a 61%)	19% (-27 a 48%)
7 días	46% (-7 a 73%)	33% (-57 a 71%)
Enfermedad de pecho		
3 días	19% (-21 a 44%)	33% (-17 a 49%)
5 días	45% (-4 a 71%)	53% (6 a 79%)
Uso de medicación de resfriado y gripe		
3 días	28% (0 a 49%)	33% (-7 a 45%)
5 días	45% (13 a 65%)	35% (-3 a 76%)

Tabla 9: El efecto de suplementos probióticos sobre la proporción de enfermedades del tracto respiratorio superior e inferior y uso de medicación para el resfriado y la gripe, estratificado por duración de la enfermedad. Los efectos que exceden el valor límite predefinido de significado clínico (reducción del 20%) están marcados en negrita. El grupo de BI-04 tuvo una mayor reducción de la proporción de enfermedad frente al placebo que el grupo de NCFM + Bi-07 combinado frente al placebo.

Referencias

- Albers, R., J. M. Antoine, R. Bourdet-Sicard, P. C. Calder, M. Gleeson, B. Lesourd, S. Samartin, I. R. Sanderson, J. Van Loo, F. W. Vas Dias, y B. Watzl. Markers to measure immunomodulation in human nutrition intervention studies. *Br J Nutr.* 94: 452-481, 2005.
- Berg, A., H. M. Muller, S. Rathmann, y P. Deibert. The gastrointestinal system--an essential target organ of the athlete's health and physical performance. *Exerc Immunol Rev.* 5: 78-95, 1999.
- Cox, A. J., D. B. Pyne, P. U. Saunders, R. Callister, y M. Gleeson. Cytokine responses to treadmill running in healthy and illness-prone athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 39: 1918-1926, 2007.
- Cox, A. J., D. B. Pyne, P. U. Saunders, y P. A. Fricker. Oral administration of the probiotic *Lactobacillus fermentum* VRI-003 and mucosal immunity in endurance athletes. *Br J Sports Med,* 2008.

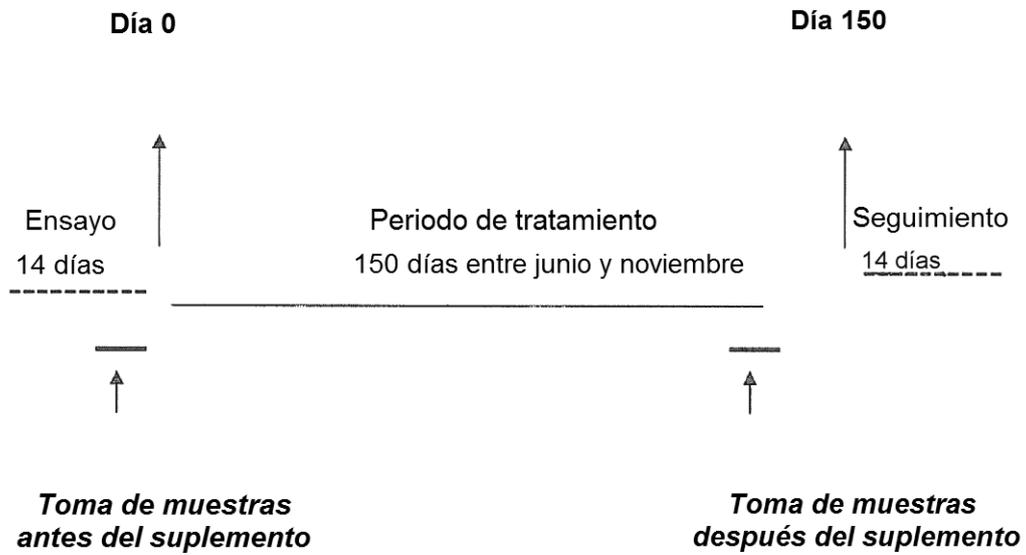
5. de Vrese, M. y J. Schrezenmeir. Probiotics and non-intestinal infectious conditions. *Br J Nutr.* 88 Suppl 1: S59-66, 2002.
6. de Vrese, M. y J. Schrezenmeir. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2008.
7. de Vrese M et al., Probiotic bacteria reduced duration and severity but not the incidence of common cold episodes in a double blind, randomized, controlled trial, *Vaccine*, 10 de noviembre de 2006, vol. 24, n.º 44-46, p6670 (Epub 6 de junio de 2006)
8. de Vrese, M., P. Winkler, P. Rautenberg, T. Harder, C. Noah, C. Laue, S. Ott, J. Hampe, S. Schreiber, K. Heller, y J. Schrezenmeir. Effect of *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5 on common cold episodes: a double blind, randomized, controlled trial. *Clin Nutr.* 24: 481-491, 2005.
9. Dixon R E., Economic costs of respiratory tract infections in the United States, *Am J Med*, 1985, vol. 78, n.º 6B, 45-51
10. Fricker, P. A., D. B. Pyne, P. U. Saunders, A. J. Cox, M. Gleeson, y R. D. Telford. Influence of training loads on patterns of illness in elite distance runners. *Clin J Sport Med.* 15: 246-252, 2005.
11. Genton, L., W. van Gemert, C. Pichard, y P. Soeters. Physiological functions should be considered as true end points of nutritional intervention studies. *Proc Nutr Soc.* 64: 285-296, 2005.
12. Gleeson, M., W. A. McDonald, D. B. Pyne, A. W. Cripps, J. L. Francis, P. A. Fricker, and R. L. Clancy. Salivary IgA levels and infection risk in elite swimmers. *Med Sci Sports Exerc.* 31: 67- 73, 1999.
13. Gleeson, M., D. B. Pyne, y R. Callister. Exercise effects on mucosal immunity and risk of upper respiratory illness. *International Sports Medicine Journal.* 4: 1-14, 2003.
14. Hashem M y Hall C B, Respiratory syncytial virus in healthy adults: the cost of a cold, *Journal of Clinical Virology*, 2003, vol 27, n.º 1, p14-21
15. Kang, W. y K. A. Kudsk. Is there evidence that the gut contributes to mucosal immunity in humans? *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 31: 246-258, 2007.
16. Kekkonen, R. A., T. J. Vasankari, T. Vuorimaa, T. Haahtela, I. Julkunen, y R. Korpela. The effect of probiotics on respiratory infections and gastrointestinal symptoms during training in marathon runners. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 17: 352-363, 2007.
17. Koh, D., Y. Yong, V. Ng, y S. E. Chia. Stress, mucosal immunity, upper respiratory tract infections, and sickness absence. *J Occup Environ Med.* 44: 987-988, 2002.
18. Leder K et al., A community-based study of respiratory episodes in Melbourne, Australia, *Aust. N Z J Public Health*, 2003, vol. 27, n.º 4, p399-404
19. Müns, G., P. Singer, F. Wolf, y I. Rubinstein. Impaired nasal mucociliary clearance in longdistance runners. *Int J Sports Med.* 16: 209-213, 1995.
20. Peters, H. P., W. R. De Vries, G. P. Vanberge-Henegouwen, y L. M. Akkermans. Potential benefits and hazards of physical activity and exercise on the gastrointestinal tract. *Gut.* 48: 435- 439, 2001.
21. Pregliasco F et al., A new chance of preventing winter diseases by the administration of synbiotic formulations, *J Clin Gastroenterol.*, 2008 Sep., vol. 42, supl 3, parte 2, S224-233
22. Pyne, D. B. and M. Gleeson. Effects of intensive exercise training on immunity in athletes. *Int J Sports Med.* 19 Supl 3: S183-191; discusión S191-184, 1998.
23. Pyne, D. B., W. G. Hopkins, A. M. Batterham, M. Gleeson, y P. A. Fricker. Characterising the individual performance responses to mild illness in international swimmers. *Br J Sports Med.* 39: 752-756, 2005.
24. Pyne, D. B., W. A. McDonald, M. Gleeson, A. Flanagan, R. L. Clancy, y P. A. Fricker. Mucosal immunity, respiratory illness, and competitive performance in elite swimmers. *Med Sci Sports Exerc.* 33: 348-353, 2001.
25. Saavedra, J. M. y A. Tschernia. Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications. *Br J Nutr.* 87 Supl 2: S241-246, 2002.
26. Welfare, 2006 Australian Institute of Health and Welfare 2006, Australia's Health 2006, Australia's health n.º 10 N.º de Cat. AUS 73. Canberra: AIHW. Página 107
27. West, N. P., D. B. Pyne, J. M. Kyd, G. M. C. Renshaw, P. Fricker, y A. W. Cripps. The effect of exercise on innate mucosal immunity. *British Journal of Sports Medicine*, 2008.
28. West, N. P., D. B. Pyne, G. Renshaw, y A. W. Cripps. Antimicrobial peptides and proteins, exercise and innate mucosal immunity. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 48: 293-304, 2006.
29. Winkler P et al., Effect of a dietary supplement containing probiotic bacteria plus vitamins and minerals on common cold infections and cellular immune parameters, *Int. J Clin. Pharmacol. Ther.*, julio de 2005, vol. 43, n.º 7, p318-326

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una bacteria y/o un producto de fermentación de una bacteria y/o un lisado celular de una bacteria para su uso en el tratamiento o profilaxis de enfermedades del tracto respiratorio en un sujeto, donde dicha bacteria es *Bifidobacterium lactis* BL04 sola.
2. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad del tracto respiratorio es una enfermedad del tracto respiratorio superior.
- 10 3. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad del tracto respiratorio es una enfermedad del tracto respiratorio inferior.
- 15 4. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la enfermedad del tracto respiratorio se selecciona de una o más del grupo que consiste en: amigdalitis, otitis media; rinitis; rinosinusitis; sinusitis; nasofaringitis; rinofaringitis; resfriado común; faringitis; epiglotitis; supraglotitis; laringitis; laringotraqueítis; traqueítis; dolor de garganta; estornudos; congestión nasal; goteo nasal y tos.
- 20 5. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en la que la enfermedad del tracto respiratorio se selecciona de una o más del grupo que consiste en: bronquitis; bronquitis aguda; neumonía; absceso pulmonar; tos con congestión de pecho y tos con sibilancia.
- 25 6. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la actividad fagocítica de los granulocitos en el sujeto está aumentada.
7. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la actividad fagocítica de los monocitos en el sujeto está aumentada.
- 30 8. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el uso es profiláctico.

Figura 1

Diagrama Esquemático de Diseño Experimental



▲Parámetros del estudio: escala de resiliencia, muestras fecales, saliva y suero/torundas y registro diario (enfermedad, entrenamiento y uso de suplemento). La colonización de *E. coli* resistente a antibióticos se analizará a partir de muestras recogidas antes y después de un viaje a Asia que tuvo lugar durante el tratamiento probiótico.

Figura 2

Diagrama de Flujo CONSORT 2010

