

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 042**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2009 PCT/IB2009/006840**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2010 WO10018461**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2009 E 09786251 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2323675**

54 Título: **Composiciones que comprenden lactobacillus casei CNCM I-1518 (DN-114001) para prevenir o tratar una infección de las vías respiratorias altas en fumadores**

30 Prioridad:

14.08.2008 EP 08290773

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

27.03.2018

73 Titular/es:

**COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)
17, Boulevard Haussmann
75009 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**GUILLEMARD, ERIC;
FLAVIGNY, LAURE y
TANGUY, JÉRÔME**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 661 042 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

Composiciones que comprenden *Lactobacillus casei* CNCM I-1518 (DN-114001) para prevenir o tratar una infección de las vías respiratorias altas en fumadores

5 La presente invención se refiere a una composición que contiene las bacterias *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei* cepa CNCM I-1518, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, para usar en la prevención o tratamiento de una infección de las vías respiratorias altas en un individuo adulto, estimulando la respuesta de linfocitos citolíticos natural y/o el recuento de leucocitos neutrófilos, siendo dicho individuo un fumador de tabaco.

Las enfermedades infecciosas comunes (EIC), definidas como infecciones de las vías respiratorias altas y bajas y la gastroenteritis, son endémicas en la población general, causando considerables molestias.

10 Los diferentes tipos de enfermedades infecciosas comunes en cada categoría y sus principales síntomas asociados usados para el diagnóstico se resumen a continuación en la tabla 1.

Tabla 1

Enfermedades infecciosas comunes	Síntomas
Infecciones de las vías respiratorias altas (IVRA)	
Rinofaringitis (resfriado, coriza aguda)	Rinorrea, estornudos, congestión nasal, dolor de cabeza, astenia, dolor/rigidez muscular, fiebre (rara).
Amigdalitis	Fiebre (excepto infección vírica), dolor de garganta ardiente, amígdalas enrojecidas, inflamadas y con vesículas, adenopatía con dolor en el cuello.
Sinusitis aguda	Dolores de cabeza, dolor de senos paranasales, nariz congestionada, rinorrea purulenta, dolor de garganta, tos, fiebre.
Otitis aguda	Dolor de oídos, sensación de oído tapado, deficiencia auditiva, descarga.
Infecciones de las vías respiratorias bajas (IVRB)	
Bronquitis aguda	Fiebre moderada, tos, expectoración mucosa o purulenta
Neumopatía	Fiebre generalmente alta, escalofríos, tos, expectoración mucosa o purulenta, dolor torácico, disnea.
Gripe y enfermedad de tipo gripe	Escalofríos intensos, fiebre alta, dolores de cabeza, dolor/rigidez muscular, artralgia, astenia, anorexia, tos seca dolorosa, faringe enrojecida.
Infección del tubo digestivo (ITD)	
- Gastroenteritis	Fiebre, dolores de cabeza, dolor/rigidez muscular, dolor abdominal, diarrea, vómitos.

15 En 2002, el resfriado común fue el responsable de millones de días perdidos de trabajo y escuela y da cuenta de 27 millones de visitas al médico en Estados Unidos (Greenberg 2002), mientras que Feeney mostró que los trastornos respiratorios y la gastroenteritis daban cuenta de 50 a 60% de todos los periodos de ausencias en Londres (Feeney A et al. 1998). Además, las infecciones de las vías respiratorias altas son la razón principal del uso inadecuado de antibióticos tanto en niños como en adultos, que conduce a una mayor expansión de la resistencia a antibióticos. Finalmente, para algunas infecciones como los resfriados comunes inducidos por rinovirus, no se han aprobado fármacos antivíricos (Greenberg 2002). Por lo tanto, las infecciones comunes tienen un gran interés en términos de salud pública con consecuencias socioeconómicas.

20 El estrés es uno de los factores que puede actuar en el aumento de riesgo de ser infectado, debido a su acción en el sistema inmunitario. De hecho, los estudios han mostrado que el estrés fisiológico puede regular por disminución las respuestas inmunitarias causando la desregulación de diferentes señales. Se han demostrado algunas "rutas" mediante las cuales el sistema inmunitario es modulado tras el estrés psicológico. Por ejemplo, hay inervación directa de los tejidos linfáticos primarios y secundarios por el sistema nervioso autónomo. Estas "rutas" operan produciendo mediadores biológicos que interactúan con y afectan a los componentes celulares del sistema inmunitario (Yang EV y Glaser R. 2000). Por lo tanto, Yang y Glaser demostraron que los factores estresantes psicológicos tienen la capacidad de modular la respuesta inmunitaria celular que puede producir el aumento de la susceptibilidad de un individuo a patógenos infecciosos (Yang EV y Glaser R. 2000).

25 Algunas situaciones y actividades pueden generar estrés, entre las cuales la actividad del trabajo tiene un interés particular. De hecho, se ha demostrado el impacto de las condiciones de trabajo estresantes en las infecciones mediante estudios llevados a cabo en especial en trabajadores por turnos. Estudios epidemiológicos demostraron que la aparición del resfriado común, enfermedad de tipo gripe y gastroenteritis es diferente entre empleados de diferentes horarios de trabajo. El trabajo por turnos estaba significativamente asociado con una mayor incidencia de las tres infecciones comunes (Mohren DC et al. 2002). Algunos estudios han descrito la función inmunitaria reducida

en relación con el trabajo por turnos, lo cual puede explicar una mayor susceptibilidad a infecciones (Curti R et al. 1982; Kobayashi F et al. 1997).

5 Entre los productos potencialmente activo contra las infecciones comunes, los probióticos han mostrado efectos interesantes en especial en trabajadores adultos. Por ejemplo, se ha mostrado que *Lactobacillus reuteri* ATCC55730 disminuye las bajas por enfermedad a corto plazo causadas por infecciones respiratorias o gastrointestinales, y por lo tanto mejoraba la salud en el lugar de trabajo (Tubelius et al. 2005). En otros estudios, el efecto antiinfeccioso de los probióticos se ha correlacionado con la modulación de parámetros inmunitarios. En adultos, se describió que una mezcla de probióticos (es decir, *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP 07/3 y *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5) disminuía la gravedad y duración de las infecciones por resfriado común y el número de días de fiebre asociada. En este estudio, la mejora de la evolución de la enfermedad estaba asociada con un aumento significativo del recuento de linfocitos T CD8 citotóxicos y supresores en el grupo que había consumido probióticos (De Vrese et al. 2005).

Danone ha desarrollado una bebida láctea probiótica, ACTIMEL®, que contiene *Lactobacillus casei* CNCM I.1518 (= DN-114 001) así como cultivos de yogur característicos (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*).

15 Se ha descrito que el consumo de ACTIMEL® tiene un efecto beneficioso en la evolución de enfermedades gastrointestinales. En niños que van a guarderías, el complemento con ACTIMEL® reducía la incidencia de la diarrea aguda comparado con un grupo de control con complemento de yogur (Pedone et al. 2000). Con el mismo régimen, también se observó una disminución significativa de la duración de la diarrea aguda en niños (Pedone et al. 1999, Agarwal et al. 2001).

20 En otro estudio (Cobo Sanz et al. 2006), niños de 3 a 12 años que recibieron dos Actimel diarios durante 20 semanas mostraron una tendencia a la reducción de la duración e incidencia de algunos trastornos infecciosos, en particular infecciones de las vías respiratorias bajas, (bronquitis o neumonía).

También se llevó a cabo un estudio en una población de personas mayores. Se investigó el efecto del consumo de ACTIMEL® de 3 semanas en la incidencia, duración y fiebre asociada tanto de infecciones gastrointestinales como respiratorias en invierno. En este estudio, el consumo de ACTIMEL® reducía la duración de la enfermedad en comparación con el grupo de control (Turchet et al. 2003).

30 También se mostró que ACTIMEL® modulaba algunos recuentos o actividades de células inmunitarias en varias poblaciones que incluían sujetos estresados. El consumo de ACTIMEL aumenta o inhibe la disminución de algunos parámetros inmunitarios (linfocitos totales, células CD56⁺, es decir, linfocitos citolíticos naturales citotóxicos) en sujetos de 18-23 años de edad sometidos al estrés de exámenes académicos (Marcos et al. 2004). De la misma forma, en un modelo de atletas altamente entrenados, en los que la actividad física tenía efectos agudos y crónicos en el sistema inmunitario, la disminución del número de células NK era significativamente menor después de consumo de ACTIMEL® que después del consumo de leche (Pujol et al. 2000). Con un periodo de 8 semanas de consumo del producto, otros estudios llevados a cabo en una población adulta de mediana edad (51-58 años) mostraron que ACTIMEL® aumenta tanto la actividad citotóxica de las células NK (Parra et al. 2004a; Parra et al. 2004b) como la actividad de estallido oxidativo de monocitos (Parra et al. 2004b). Por lo tanto, esos resultados mostraban que ACTIMEL® puede regular la inmunidad celular en especial la innata, aumentando el tamaño del subconjunto o las actividades específicas de las células inmunitarias.

40 La modulación de la actividad de las células NK también se ha descrito para la cepa de *Lactobacillus casei* Shirota, en ratones recién nacidos infectados con el virus influenza (Yasui et al. 2004), y en sujetos humanos, en fumadores habituales (Morimoto et al. 2005), y en sujetos sanos (Nagao et al. 2000; Takeda et al. 2007).

45 Los autores de la invención ahora han investigado el efecto de ACTIMEL® en la resistencia de los adultos frente a infecciones comunes, en especial en adultos inmunocompetentes menores de 65, que trabajan en condiciones estresantes. Como se muestra en la parte experimental a continuación, demostraron que el efecto del consumo de ACTIMEL® es mayor en los usuarios de tabaco que en los no fumadores. Además, los autores de la invención han mostrado que en la población general, el consumo habitual de ACTIMEL® conduce a una respuesta inmunitaria más fuerte en el caso de EIC, puesto que actúan tanto las células NK como los leucocitos neutrófilos.

50 La presente descripción se refiere al uso de la cepa de *Lactobacillus casei*, CNCM I-1518 (= DN-114 001), a la preparación de una composición para mejorar la resistencia de un fumador de tabaco frente a una infección de las vías respiratorias altas. También se refiere a dicho uso de una cepa de *Lactobacillus casei* para la preparación de una composición para mejorar la respuesta inmunitaria celular, en particular la respuesta de células NK y/o los leucocitos neutrófilos de un individuo en caso de una enfermedad infecciosa común de las vías respiratorias altas, tal como rinoфаринgitis o amigdalitis.

Preferiblemente, dicha composición está dirigida a ser administrada a un sujeto que tiene menos de 65 años.

55 Según la invención, dicha cepa de *Lactobacillus casei* es la cepa que está depositada en la CNCM con la referencia I-1518 descrita por ejemplo en el documento EP0794707 o EP1283714.

5 Ventajosamente, dicha composición comprende al menos 1×10^5 u.f.c por mililitro de dicha cepa de *Lactobacillus casei*, más preferiblemente al menos 1×10^7 u.f.c por mililitro de dicha cepa de *Lactobacillus casei*. Dicha cepa está asociada con *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, y también puede estar asociada con una o más de otras bacterias del ácido láctico de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*, seleccionándose las bacterias del ácido láctico preferidas de un grupo que comprende *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* y/o *Bifidobacterium breve*.

Dicha composición puede estar en forma de un alimento o de un complemento alimenticio. Preferiblemente es una composición de leche fermentada.

10 La presente invención se ilustrará más mediante la siguiente descripción adicional, que se refiere a ejemplos que ilustran las propiedades de una composición que comprende *Lactobacillus casei* para mejorar la resistencia frente a una infección de las vías respiratorias altas en fumadores de tabaco.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

1.1: Población estudiada

15 Demografía:

Las características de la población del estudio se resumen en las siguientes tablas 2 y 3.

Tabla 2: Características de la población estudiada

	ACTIMEL® N=500	Control N=500	Todos N=1000	valor de p
Edad (media ± DE) Q1-Q3 (50% de la población)	31,8 ± 8,9 25-37	32,5 ± 8,9 26-38	32,1 ± 8,9 25-38	(ANOVA) 0,278
Sexo				(?²)
Mujeres	57%	56%	56%	0,702
Hombres	43%	44%	44%	
IMC (media ± DE) Q1-Q3 (50% de la población)	24,0 ± 2,8 22-26	24,2 ± 2,9 22-26	24,1 ± 2,9 22-26	(ANOVA) 0,235
Tipo de actividad				(?²) 0,993
Trabajador en fábrica	4,25%	4,6%	4,4%	
Enfermera	47%	45%	46%	
Bombero	5,8%	6,0%	5,9%	
Agente de policía	16%	16%	16%	
Otros	27%	28%	28%	
Características iniciales				
Tipo de trabajo por turnos				(?²) 0,803
trabajo de 2 turnos	17%	18%	18%	
trabajo de 3 turnos	83%	82%	83%	
Hábito de fumar				(?²) 0,190
No fumador	42%	41%	42%	
Fumador < 10 cig./d.	21%	18%	19%	
Fumador > 10 cig./d.	18%	18%	18%	
Exfumador	19%	22%	21%	
Otros	<1%	1,4%	<1%	
Vacunación contra la gripe				(?²) 0,294
Si	7,0%	5,4%	6,2%	
No	93%	95%	94%	

Tabla 3: Inclusión y retirada del estudio

Número de sujetos		ACTIMEL®	Control	Todos
Cribado (población cribada)				N=1523
Incluidos (Población total)	Si			1000 (66%)
	No			523 (34%)
Razón para la no inclusión	Sujeto no apto			158 (10%)
	Inclusión cerrada			252 (17%)
	Decisión del sujeto			25 (2%)
	Incumplidor			10 (0,6%)
	EIC (en V1 o V2)			72 (5%)
	Otras			6 (0,4%)
Aleatorizado	población IDT	N=500	N=500	N=1000
	población PP	N=443	N=457	N= 900

Exclusiones y retiradas prematuras del estudio

- 5 Un total de 38 sujetos en la población IDT (por intención de tratar) (4%) se retiró antes del final del estudio, mientras que todos los sujetos incluidos en la población PP (por protocolo) completaron el estudio (por definición).

Tabla 4: Retiradas prematuras del estudio

	ACTIMEL® (N=500)	Control (N=500)	Todos (N=1000)
Número de sujetos			
Estado de finalización			
Completado	478 (96%)	484 (97%)	962 (96%)
Suspendido	22 (4,4%)	16 (3,2%)	38 (3,8%)

1.2. Identidad de los productos de investigación

Características de los productos

- 10 Los productos dados durante este estudio pertenecen a la familia de productos lácteos frescos. El presente estudio se llevó a cabo usando ACTIMEL® como el producto activo.

La tabla 5 proporciona la composición de los productos activo y de control.

Pare preservar la metodología de doble ocultación, el aspecto, envasado y sabor del producto activo y de control eran idénticos.

- 15 El producto activo (ACTIMEL®) es una bebida láctea fermentada, aromatizada y edulcorada.

El producto de control es una bebida láctea acidificada, no fermentada, aromatizada y edulcorada.

Tabla 5: Composición del producto, ufc: unidades formadoras de colonias.

Producto	Lípidos	Glúcidos	Proteínas	<i>Lactobacillus casei</i>	Cultivo de yogur
ACTIMEL®	1,5%	12%	2,8%	mínimo 1 x 10 ⁸ ufc/ml	mínimo 5 x 10 ⁷ ufc/ml
Control	1,5%	12%	2,8%	--	--

1.3. Plan del estudio

- 20 Descripción del plan del estudio

El estudio se llevó a cabo en 1 centro, aleatorizado con una estratificación por tipo de actividades, con doble ocultación, controlado en 2 grupos paralelos: producto "ACTIMEL®" frente a "producto de control".

La figura 1 presenta el esquema de los procedimientos del estudio (*: Dependiendo de la participación del subgrupo en "Parámetros biológicos de la sangre").

- 25 Después de la fase de cribado (V1-V2), la fase experimental se divide en 2 partes: una fase de consumo de productos (V2-V5: 12 semanas) y una fase de seguimiento (V5-V6: 4 semanas) sin consumo del producto.

Para cada sujeto, la duración total del estudio era 4,5 meses (2 semanas de restricción alimentaria, 12 semanas de consumo de producto y 4 semanas de seguimiento).

Criterios de evaluación

El criterio principal de evaluación del estudio era el número de todas las EIC comunicadas por el sujeto durante el periodo de consumo del producto de 12 semanas. En este estudio la EIC se definió en 3 categorías principales de infecciones:

- 5 - Infecciones de las vías respiratorias altas (IVRA): rinofaringitis, amigdalitis, sinusitis, otitis
- Infecciones de las vías respiratorias bajas (IVRB): bronquitis, neumopatía, etc.
- Infecciones del tubo digestivo (ITD).

Variables principales de evaluación:

Principal:

- 10 - Comparación entre grupos del número de todas las EIC comunicadas durante las 12 semanas del estudio de consumo del producto.

Secundaria:

- Comparación entre grupos del número de todas las EIC comunicadas durante el seguimiento de 4 semanas y durante toda la fase del estudio [fase de consumo + seguimiento]
- 15 - Comparación entre grupos del número de IVRA o IVRB o ITD, o cada tipo de EIC durante las 12 semanas del estudio de consumo del producto, durante las 4 semanas de seguimiento y durante toda la fase del estudio [fase de consumo + seguimiento]
- Comparación entre grupos del número de sujetos que tienen al menos 1 EIC (cualquier tipo) o 1 IVRA o IVRB o ITD, o un tipo de EIC (p. ej., rinofaringitis o amigdalitis), durante las 12 semanas del estudio de consumo del producto, durante las 4 semanas de seguimiento y durante toda la fase del estudio [fase de consumo + seguimiento].
- 20 - Comparación entre grupos de la evolución, en cada grupo, del hemograma en algunas visitas planificadas y en caso de EIC (cualquier tipo) o IVRA o IVRB o ITD, o cada tipo de EIC, durante las 12 semanas del estudio de consumo del producto, durante las 4 semanas de seguimiento y durante toda la fase del estudio [fase de consumo + seguimiento].
- 25 - Comparación entre grupos del número de días de fiebre durante todas las EIC (cualquier tipo) o IVRA o IVRB o ITD, o cada tipo de EIC, durante las 12 semanas del estudio de consumo del producto, durante las 4 semanas de seguimiento y durante toda la fase del estudio [fase de consumo + seguimiento].
- Comparación entre grupos de la evolución en cada grupo, de los parámetros de la sangre del sistema inmunitario, en algunas visitas planificadas (por parte de los sujetos) y en visitas adicionales en el caso de EIC (cualquier tipo) o IVRA o IVRB o ITD, o cada tipo de EIC, durante las 12 semanas del estudio de consumo del producto, durante las 4 semanas de seguimiento y durante toda la fase del estudio [fase de consumo + seguimiento].
- 30

1.4. Métodos estadísticos

Planes estadísticos y analíticos

El plan de análisis estadístico fue elaborado antes de la revisión con doble ocultación.

- 35 El análisis estadístico incorporaba las recomendaciones de la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (ICH Topic E9 - etapa 4 - 5 de febrero de 1998).

Determinación del tamaño de la muestra

- 40 La determinación del tamaño de la muestra se basó en el criterio de valoración principal: el número acumulado de EIC que aparecen en los tres meses de consumo del producto. Múltiples sucesos de diferentes enfermedades infecciosas que ocurren conjuntamente (p. ej., una infección de las vías respiratorias altas y una gastroenteritis) se han contado por separado y se han sumado incluso si aparecían en el mismo episodio infeccioso.

- 45 La tasa exacta de episodios de enfermedades infecciosas comunes entre los trabajadores de turnos dentro de un periodo de tiempo dado, no se podía anticipar fácilmente porque puede variar mucho según las condiciones estacionales. Sin embargo, se supuso que se podían observar un número medio de 1,5 sucesos en el grupo controlado. Se esperaba una disminución relativa de 15% en el grupo de ACTIMEL® (es decir, el número medio esperado de sucesos era 1,275 en el grupo aleatorizado de ACTIMEL®). La distribución del número acumulado de sucesos infecciosos se supuso que era una distribución de Poisson sobredispersa; se esperaba alguna sobredispersión puesto que las apariciones de sucesos dentro de un sujeto no son independientes.

Con una tasa esperada de 1,5 sucesos a lo largo del periodo de 3 meses en el grupo controlado y usando una regresión de Poisson con una prueba bilateral con el nivel α de 5% asumiendo sobredispersión moderada (parámetro de escala de 1,1), se esperaba que eran necesarios alrededor de 450 sujetos en cada rama que permanecieran en el estudio durante los tres meses para detectar una reducción de 15% en la tasa con al menos una potencia de 80%. Se asumió una tasa de abandono de 5% de sujetos; por lo tanto, era necesario incluir alrededor de 500 sujetos en cada rama. Por lo tanto, era necesario aleatorizar un total de 1.000 sujetos.

Ejemplo 2: Resultados clínicos

2.1: Número de todas las EIC en la subpoblación de fumadores

Como se muestra en la tabla 6, se observó un efecto del producto estadísticamente significativo en favor del grupo de ACTIMEL® en el número de todas las EIC durante la fase del estudio de consumo del producto en la subpoblación de fumadores (media = 0,6 para ACTIMEL® frente a 0,8 para el grupo de control; $p=0,033$ para la población IDT), mientras que este efecto no se observó en la población de no fumadores ($p=0,687$ para la población IDT) (tabla 7).

Tabla 6: Población por intención de tratar - fumadores (Fase = fase de consumo - 12 semanas del estudio de consumo del producto).

		ACTIMEL® (N=194)	Control (N=186)	Todos (N=380)
Número de sujetos				
Número de EIC	0	120 (62%)	91 (49%)	211 (56%)
	1	39 (20%)	59 (32%)	98 (26%)
	2	23 (12%)	22 (12%)	45 (12%)
	3	8 (4,1%)	8 (4,3%)	16 (4,2%)
	4	3 (1,5%)	3 (1,6%)	6 (1,6%)
	5	1 (<1%)	2 (1,1%)	3 (< 1%)
	6	0 (0,0%)	1 (< 1%)	1 (< 1%)
	N	194	186	380
	Media	0,649	0,833	0,739
	DE	1,003	1,100	1,054
	EEM	0,072	0,081	0,054

Tabla 7: Población por intención de tratar - no fumadores (Fase = fase de consumo - 12 semanas del estudio de consumo del producto).

		ACTIMEL® (N=306)	Control (N=314)	Todos (N=620)
Número de sujetos				
Número de EIC	0	167 (55%)	153 (49%)	320 (52%)
	1	73 (24%)	105 (33%)	178 (29%)
	2	40 (13%)	35 (11%)	75 (12%)
	3	16 (5,2%)	15 (4,8%)	31 (5,0%)
	4	7 (2,3%)	5 (1,6%)	12 (1,9%)
	5	1 (< 1%)	0 (0,0%)	1 (< 1%)
	6	2 (< 1%)	1 (< 1%)	1 (< 1%)
	N	306	186	380
	Media	0,804	0,783	0,794
	DE	1,128	0,984	1,057
	EEM	0,064	0,056	0,042

2.2. Aparición de EIC durante la fase de consumo de producto

Tabla 8: Aparición de EIC durante la fase de consumo del producto - 12 semanas del estudio de consumo del producto, población por intención de tratar

		ACTIMEL® (N=500)	Control (N=500)	Todos (N=1000)
Número de sujetos				
Número de EIC	Si	213 (43%)	256 (51%)	469 (47%)
	No	287 (57%)	244 (49%)	531 (53%)

Modelo de regresión logística - Medias y diferencias por mínimos cuadrados: ACTIMEL® - Control: $p=0,005$

Ejemplo 3: Resultados biológicos

Los resultados mostrados a continuación de todos los datos biológicos proceden del análisis de covarianza. De forma más precisa, el análisis estadístico es un cambio desde el inicio ajustado en el valor inicial (en línea con las recomendaciones de la ICH). El cambio sin procesar se expresaba como: valor biológico para la EIC - valor biológico al inicio, calculado para cada sujeto y se aplica el modelo estadístico en los datos disponibles. Además, se proporciona la descripción de los valores iniciales para la información sobre toda la población por ITT con EIC.

3.1. Linfocitos citolíticos naturales: cambio de células NK CD16+/56+/3- desde el inicio en el caso de EIC (parámetro= recuento absoluto de células NK CD16+/56+/3-).

Se observó un recuento absoluto mayor de células NK CD16+/56+/3- clínicamente relevante y estadísticamente significativo en el grupo de ACTIMEL® durante la fase de consumo del producto en el caso de EIC, para todas las EIC (cambio desde el inicio = + 45,048 células/μl para ACTIMEL® frente a -14,500 células/μl para el control; p <0,001), para la IVRA (p= 0,016), para la IVRB (p= 0,009), para la rinofaringitis (p= 0,011), y para la amigdalitis (p= 0,032) en la población IDT (Tabla 9).

Tabla 9: Población por intención de tratar restringida a la subpoblación con EIC/prueba ANOVA

		ACTIMEL®	Control	Todos	
Tiempo = inicio (v2)					
	N	52	63	115	
recuento absoluto de células NK CD16+/56+/3- (/μl)	Media	175,88	181,63	179,03	valor de p = 0,503
	DE	74,21	83,04	78,88	
Cambios desde el inicio, Fase = fase de consumo, todas las muestras de sangre relacionadas con EIC					
		ACTIMEL®	Control	Todos	
Todas las EIC					
	N	42	50	92	
recuento absoluto de células NK CD16+/56+/3- (/μl)	Media	+45,048	-14,500	+12,685	valor de p < 0,001
	DE	80,846	68,999	79,987	
Categoría = IVRA					
	N	34	39	73	
recuento absoluto de células NK CD16+/56+/3- (/μl)	Media	+34,882	-15,590	+7,918	valor de p = 0,016
	DE	91,826	70,633	84,501	
Categoría = IVRB					
	N	13	17	30	
recuento absoluto de células NK CD16+/56+/3- (/μl)	Media	+37,462	-33,353	-2,667	valor de p = 0,009
	DE	48,349	59,634	64,832	
Tipo = 1 - Rinofaringitis					
	N	23	27	50	
recuento absoluto de células NK CD16+/56+/3- (/μl)	Media	+36,609	-30,148	+0,560	valor de p = 0,011
	DE	100,580	65,341	89,090	
Tipo = 2 - Amigdalitis					
	N	17	19	36	
recuento absoluto de células NK CD16+/56+/3- (/μl)	Media	+23,412	-23,368	-1,278	valor de p = 0,032
	DE	81,050	73,445	79,612	

Los autores de la invención también observaron (no se muestran los datos):

- Un porcentaje mayor de células NK CD16+/56+/3- clínicamente relevante y estadísticamente significativo en el grupo de ACTIMEL® en el caso de EIC, para todas las EIC durante la fase de consumo del producto (cambio desde el inicio = +1,95% para ACTIMEL® frente a +0,08% para el control; p= 0,007, para los valores iniciales = 10,35+/-4,67 para ACTIMEL® frente a 9,56+/-4,29 para el control) y para la IVRB durante toda la fase de estudio (p= 0,008) en la población IDT.

- Una actividad lítica mayor de las células NK estadísticamente significativa en el grupo de ACTIMEL® en el caso de EIC, para la amigdalitis durante la fase de consumo del producto (p= 0,047 para la actividad inicial; p= 0,013 para la actividad estimulada por IL-2) en la población IDT.

Por lo tanto, parece que el recuento absoluto de células NK (CD16+CD56+CD3-) es estadísticamente diferente entre grupos y mayor en el grupo de ACTIMEL® de acuerdo con el cambio desde el inicio en el caso de la EIC. Esto se observó durante la fase de consumo del producto para todas las EIC, IVRA e IVRB, y rinofaringitis y amigdalitis. Todos los resultados se confirmaron cuando se tuvieron en cuenta solamente las muestras recogidas durante la EIC (todas con P significativo).

3.2. Cambio de leucocitos y neutrófilos desde el inicio en el caso de la EIC durante la fase de consumo del producto

Se observó un recuento absoluto mayor de leucocitos clínicamente relevante y estadísticamente significativo en el grupo de ACTIMEL® [cambio desde el inicio = +1248 células/μl para ACTIMEL® frente a +165 células/μl para el control] durante la fase de consumo del producto en caso de EIC, para todas las EIC (p=0,034) y para la rinofaringitis (p=0,002) en la población IDT.

Tabla 10: Leucocitos (cambios desde el inicio) durante la fase de consumo del producto en el caso de EIC, IVRA, IVRB, rinofaringitis y amigdalitis.

Leucocitos (10E3/ μ l)		ACTIMEL®	Control	Todos	
Tiempo = inicio (v2)	N	52	63	115	
	Media	6,33	6,60	6,48	valor de p = 0,430
	DE	1,83	1,79	1,81	
Cambios frente al inicio, fase = fase de consumo, todas las muestras de sangre relacionadas con la EIC					
Todas las EIC	N	42	51	93	
	Media	+1,248	+0,165	+0,654	valor de p = 0,034
	DE	2,630	2,239	2,470	
IVRA	N	34	40	74	
	Media	+1,235	+0,275	+0,716	valor de p = 0,109
	DE	2,468	2,199	2,360	
IVRB	N	13	17	30	
	Media	-0,338	+0,006	-0,143	valor de p = 0,319
	DE	2,000	2,858	2,489	
Tipo = 1 - rinofaringitis	N	23	28	51	
	Media	+1,287	-0,354	+0,386	valor de p = 0,002
	DE	2,451	1,608	2,172	
Tipo = 2 - amigdalitis	N	17	20	37	
	Media	+0,624	+0,500	+0,557	valor de p = 0,682
	DE	2,544	2,485	2,478	

- 5 Los autores de la invención también observaron un recuento absoluto mayor de neutrófilos clínicamente relevante y estadísticamente significativo respecto al inicio en el grupo de ACTIMEL® [cambio desde el inicio = +1050 células/ μ l para ACTIMEL® frente a +210 células/ μ l para el control] en el caso de EIC, para todas las EIC durante toda la fase del estudio (p=0,037) y para la rinofaringitis (p=0,002) durante la fase de consumo del producto en la población IDT. En el caso de la rinofaringitis, el valor medio de cambio era +1279 células/ μ l en el grupo de ACTIMEL® y - 231 células/ μ l en el grupo de control para los valores iniciales de 3740 y 3800, respectivamente (tabla 11).
- 10 Se observó un porcentaje mayor de neutrófilos clínicamente relevante y estadísticamente significativo en el grupo de ACTIMEL® [cambio desde el inicio = +5,3% para ACTIMEL® frente a +1,5% para el control] en el caso de EIC, para todas las EIC durante toda la fase del estudio (p= 0,038) y para la rinofaringitis (p= 0,017) durante la fase de consumo del producto en la población IDT (tabla 12). Por lo tanto, la variación del recuento de leucocitos descrita previamente se debe a la modificación del recuento de neutrófilos puesto que no se modificaba significativamente
- 15 ningún otro subconjunto de células en el análisis del hemograma.

Tabla 11: Neutrófilos (recuento absoluto) durante la fase de consumo del producto en el caso de EIC; población por intención de tratar restringida a la subpoblación biológica con EIC/prueba ANOVA

Recuento absoluto de neutrófilos (10E3/ μ l)		ACTIMEL®	Control	Todos	
Tiempo = inicio (v2)					
	N	52	63	115	
	Media	3,74	3,80	3,77	valor de p = 0,829
	DE	1,45	1,26	1,35	
Cambios frente al inicio, todas las muestras de sangre relacionadas con la EIC fase = fase de consumo del producto					
Tipo = 1 - rinofaringitis	N	23	28	51	
	Media	+1,279	-0,231	+0,450	valor de p = 0,002
	DE	2,339	1,433	2,023	

Tabla 12: Neutrófilos (porcentaje) durante la fase de consumo del producto en el caso de EIC; población por intención de tratar restringida a la subpoblación biológica con EIC/prueba ANOVA

Neutrófilos (%)		ACTIMEL®	Control	Todos		
Tiempo = inicio (v2)						
	N	52	63	115		
	Media	57,85	57,19	57,49	valor de p = 0,591	
	DE	7,78	8,36	8,08		
Cambios frente al inicio, todas las muestras de sangre relacionadas con la EIC fase = fase de consumo del producto						
Tipo = 1 - rinofaringitis	N	23	28	51		
	Media	Media	+6,609	-0,071	+2,941	valor de p = 0,017
	DE		10,659	8,641	10,079	

Conclusión

- 5 En una subpoblación muy sensible a las infecciones respiratorias tal como los fumadores, ACTIMEL® redujo el número de todas las EIC. En la población de estudio global, también se observó una diferencia estadísticamente significativa (tabla 8) en favor de ACTIMEL® en la aparición de EIC durante la fase del estudio de consumo del producto (tanto en la población IDT como la población PP).
- 10 En el caso de las EIC, el consumo de ACTIMEL® también aumentó el tiempo de la primera aparición de la infección y reducía la duración acumulada de la fiebre asociada (solo durante la fase entera del estudio para la fiebre).
- Estos efectos clínicos están asociados con un efecto de ACTIMEL® en varios subconjuntos de células inmunitarias, puesto que ACTIMEL® aumentaba significativamente el número de leucocitos, neutrófilos y células NK en la sangre.
- El efecto de ACTIMEL® en parámetros inmunitarios está de acuerdo con su capacidad observada de mejora de la evolución clínica en el caso de EIC y esto puede constituir una base interesante de resultados para la posterior investigación de los mecanismos de acción del ACTIMEL®.
- 15

Referencias

- Agarwal K.N., Bhasin S.K., Faridi M.M., Mathur M. y Gupta S. 2001. Lactobacillus casei in the control of acute diarrhea-a pilot study. *Indian Pediatrics*; 38, 905-910
- 20 Cobo Sanz JM, Mateos JA, Muñoz Conejo A. 2006. Effect of Lactobacillus casei on the incidence of infectious conditions in children. *Nutr Hosp*. 21:547-51.
- Curti R, Radice L, Cesana GC, Zanettini R, Grieco A. 1982. Work stress and immune system: lymphocyte reactions during rotating shift work. Preliminary results. *Med Lav*. 73:564-569
- Feeney A, North F, Head J, Canner R, Marmot M. 1998. Socioeconomic and sex differentials in reason for sickness absence from the Whitehall II study. *Occup Environ Med*.55:91-98
- 25 Greenberg SB. 2002. Respiratory viral infections in adults. *Curr opin Pulm Med*. 8:201-208
- Hessle C, Hansson L A, Wold, A E. 1999. Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clin Exp Immunol*. 116:276-282
- 30 Kobayashi F, Furui H, Akamatsu Y, Watanabe T, Horibe H. 1997. Changes in psychophysiological functions during night shift in nurses. Influence of changing from a full-day to a half-day work shift before night duty. *Int Arch Occup Environ Health*. 69:83-90
- Marcos A., Wärnberg J., Nova E., Gomez S., Alvarez A., Alvarez R., Mateos J.A. y Cobo J.M. 2004. The effect of milk fermented by yogurt cultures plus Lactobacillus casei DN-114001 on the immune response of subjects under academic examination stress. *Eur. J. Nutr*. 43[6]:381-389
- 35 Morimoto K, Takeshita T, Nanno M, Tokudome S, Nakayama K. 2005. Modulation of natural killer cell activity by supplementation of fermented milk containing Lactobacillus casei in habitual smokers. *Prev Med*. 40:589-94.
- Mohren DC, Jansen NW, Kant IJ, Galama JM, van der Brandt PA, Swaen GM. 2002. Prevalence of common infections among employees in different work schedules. *J Occup Environ Med*. 44:1003-1011
- Nagao F, Nakayama M, Muto T, Okumura K. 2000. Effects of a fermented milk drink containing Lactobacillus casei strain Shirota on the immune system in healthy human subjects. *Biosci Biotechnol Biochem*. 64:2706-8.

- Parra D, De-Morentin-B-Martinez, Cobo-J-M, Mateos-A, Martinez-J-A. 2004 a. Monocyte function in healthy middle-aged people receiving fermented milk containing *Lactobacillus casei*. *J-Nutr-Health-Aging*, 8, 4, 208-11.
- 5 Parra D, Martinez-de-Morentin-B-E, Cobo-J-M, Mateos-A, Martinez-J-A. 2004 b. Daily ingestion of fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN114001 improves innate-defense capacity in healthy middle-aged people. *J-Physiol-Biochem*, 60, 2, 85-91.
- Pedone C.A., Arnaud C.C., Postaire E.R., Bouley C.F. y Reinert P. 2000. Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. *Int. J. Clin. Pract.* 54, 568-571
- 10 Pedone C.A., Bernabeu A.O., Postaire E.R., Bouley C.F. y Reinert P. 1999. The effect of supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* (strain DN-114 001) on acute diarrhoea in children attending day care centres. *Int. J. Clin. Pract.* 53, 179-184
- Pujol, P., Huguet, J., Drobnic, F., Banquells, M., Ruiz, O., Galilea, P., Segarra, N., Aguilera, S., Burnat, A., Mateos, J. A. y Postaire, E. R. 2000. The effect of fermented milk containing *Lactobacillus casei* on the immune response to exercise. *Sports Med., Training and Rehab.* 9[3], 209-223
- 15 Takeda K, Okumura K. 2007. Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the human NK-cell activity *J Nutr.* 137(3 Suppl 2):791S-3S
- Tiollier E. 2007. Effect of a probiotics supplementation on respiratory infections and immune and hormonal parameters during intense military training. *Military Medicine* 9:1006-1011
- Tubelius P, Stan V, Zachrisson A. 2005. Increasing work-place healthiness with the probiotic *Lactobacillus reuteri*: a randomised, double-blind control-controlled study. *Environ-Health* vol. 4, p. 25
- 20 Turchet P., Laurenzano M., Auboiron S., Antoine J.M. 2003. Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. *J. of Nutr., Health & Aging*; 7[2], 75-77
- Yasui H, Kiyoshima J, Hori T. 2004. Reduction of influenza virus titer and protection against influenza virus infection in infant mice fed *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11:675-9.
- 25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que contiene la cepa de *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei* CNCM I-1518 y bacterias *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, para usar en la prevención o tratamiento de una infección de las vías respiratorias altas en un individuo adulto, estimulando la respuesta de linfocitos citolíticos naturales y/o el recuento de leucocitos neutrófilos,
siendo dicho individuo un fumador de tabaco.
2. La composición para usar como un medicamento de la reivindicación 1, en donde dicho individuo es menor de 65 años.
- 10 3. La composición para usar como un medicamento de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha infección de las vías respiratorias altas es rinofaringitis o amigdalitis.
4. La composición para usar como un medicamento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha composición comprende al menos 1×10^5 u.f.c. por mililitro de dicha cepa de *Lactobacillus casei*.
5. La composición para usar como un medicamento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha composición comprende al menos 1×10^7 u.f.c. por mililitro de dicha cepa de *Lactobacillus casei*.
- 15 6. La composición para usar como un medicamento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha composición contiene además al menos una bacteria seleccionada del género *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*.
7. La composición para usar como un medicamento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha composición está en forma de un alimento.
- 20 8. La composición para usar como un medicamento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha composición es una composición de leche fermentada.

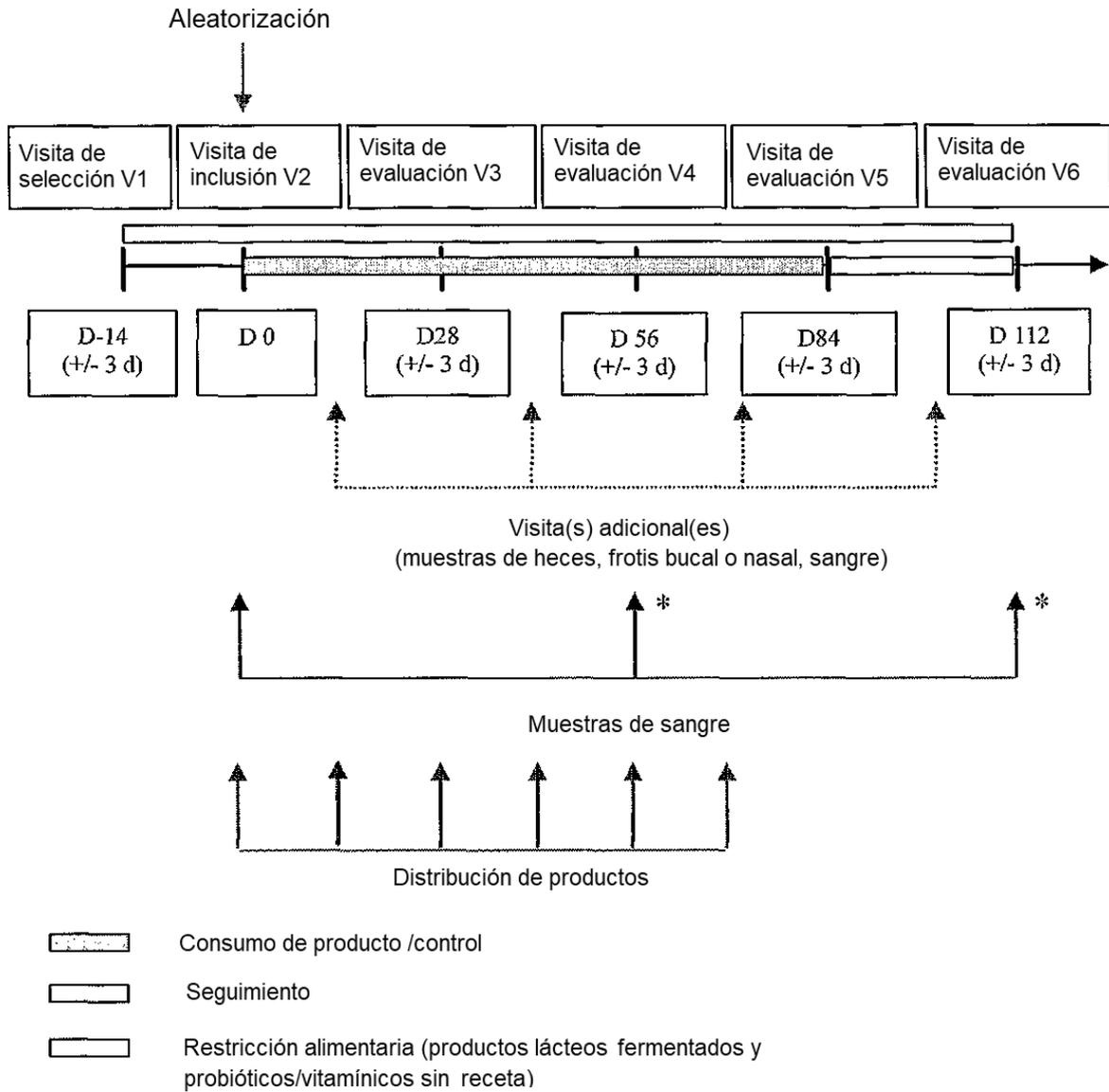


Figura 1