

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 976**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 11/02 (2006.01)

A61P 11/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2013 PCT/EP2013/050552**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013 WO13104783**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2013 E 13702584 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 2802333**

54 Título: **Lactobacillus rhamnosus y Bifidobacterium animalis subsp. lactis para uso en la prevención o el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias altas**

30 Prioridad:

13.01.2012 EP 12151148

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

25.11.2020

73 Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (100.0%)
Boege Allé 10-12
2970 Hoersholm, DK**

72 Inventor/es:

SMITH, TRACEY JANE

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 795 976 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

Lactobacillus rhamnosus y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* para uso en la prevención o el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias altas

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una combinación de *Lactobacillus rhamnosus*, tal como la cepa depositada como ATCC 53103, y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, tal como la cepa depositada como DSM 15954, para uso en reducir la duración y gravedad de infección de las vías respiratorias altas (URI), tal como el resfriado común, en adolescentes y adultos y para aumentar la calidad de vida relacionada con la salud (HRQL) en adolescentes y adultos que tienen infección de las vías respiratorias altas (URI).

10

Antecedentes de la invención

15

Las infecciones de las vías respiratorias (RTI), definidas como cualquier infección de las vías respiratorias, son una causa principal de enfermedad no institucionalizada, y producen una carga en el sistema sanitario y costes asociados. Las infecciones respiratorias altas (URI) son RTI que afectan a las vías respiratorias altas. Las URI son el tipo más común de RTI y son predominantemente víricas con menos del 15% atribuibles a bacterias. La incidencia estimada de las URI víricas en adultos que residen en los Estados Unidos (EE UU) es aproximadamente 2,5 episodios por persona al año, que carga el sistema sanitario e impacta negativamente la productividad en el trabajo y las clases.

20

El término “resfriado común” con frecuencia se usa de forma intercambiable con URI por el público general; sin embargo, la comunidad médica define el resfriado común como una enfermedad clínica en donde la expresión de síntomas resulta de una URI vírica (Barrett et al., 2009). En términos de un diagnóstico médico, la terminología de código ICD9 clasifica la nasofaringitis aguda/resfriado común como código 460. Se ha asociado el estrés psicológico y la mala salud mental (por ejemplo, depresión, ansiedad, y agotamiento) con mayor riesgo para adquirir URI. Los síntomas típicos de las URI incluyen estornudar, rinorrea u obstrucción nasal, dolor de garganta o garganta irritada, ronquera y tos; también pueden estar presentes dolor de cabeza, mialgia, malestar general y fiebre. La gravedad de los síntomas típicamente alcanza el máximo 2-3 días después de la infección, con una duración media de aproximadamente una semana con el 25% de los casos que duran más. Las URI pueden agravar afecciones preexistentes tales como asma, o pueden producir otras enfermedades tal como otitis media, sinusitis o una RTI baja (es decir, bronquitis, bronquiolitis, traqueítis y neumonía).

25

30

35

A pesar de la etiología vírica de la mayoría de las URI, comúnmente se recetan antibióticos para tratar los síntomas, una práctica que contribuye a cepas bacterianas resistentes a fármacos antibióticos. No hay evidencia de que los fármacos de venta sin receta (OTC) tengan ningún efecto sobre la duración de la infección vírica, y ofrecen solo beneficios marginales con respecto al alivio de los síntomas. Además, los fármacos OTC pueden tener efectos secundarios indeseados, tal como somnolencia, xerostomía (boca seca), nerviosismo, irritabilidad, dificultad para dormir, y presión sanguínea elevada. También son posibles consecuencias más graves con los fármacos OTC. Por ejemplo: toxicidad hepática debida a coingestión de paracetamol y alcohol, y hemorragia gastrointestinal o toxicidad renal en respuesta a aspirina y agentes antiinflamatorios no esteroideos.

40

Las características de los síntomas de las URI (por ejemplo, duración y gravedad), y el deterioro funcional en respuesta a los síntomas, tienen impacto en la calidad de vida relacionada con la salud (HRQL) durante las URI (Barrett et al., 2009). Varios aspectos de la HRQL pueden estar negativamente afectados durante las URI, tal como: desempeño físico, dolor corporal, vitalidad, desempeño social y salud mental. Por tanto, hay interés en estrategias que puedan mejorar la HRQL en personas que padecen URI.

45

50

La administración de probióticos, definidos por la Organización Mundial de la Salud como “organismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio al hospedador” es una intervención nutricional segura en la población generalmente sana. Los probióticos se encuentran en el aparato digestivo humano y están comúnmente presentes en yogur y otros productos alimenticios (por ejemplo, bebidas, cereales y barras de chocolate).

55

Se ha investigado la capacidad de los probióticos para modular la función inmunitaria, e impactar positivamente en desenlaces clínicos relacionados con alergias atópicas, alergias respiratorias, RTI, enfermedades gastrointestinales, infecciones periodontales, y afecciones urogenitales femeninas. El suplemento oral de ciertas cepas probióticas ha demostrado efectos inmunomoduladores en adultos sanos.

60

Las cepas de probióticos pueden ayudar a prevenir y tratar las RTI en niños y adultos. Sin embargo, hay algunas limitaciones en los hallazgos del estado de la técnica. Por ejemplo: los tamaños de las muestras eran demasiado pequeños para detectar diferencias entre grupos con respecto a tasas de incidencia; algunos estudios no diferenciaron URI de RTI bajas; los resultados se confundieron por el uso de prebióticos; y la gravedad solo se ha evaluado en dos estudios de adultos sanos normales (Bergren et al., 2011; y de Vrese et al., 2005).

65

El único estudio publicado sobre una composición de *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* para uso en el tratamiento de infecciones respiratorias se refiere a lactantes (Rautava et al., 2009; y documento WO2006007526). El estudio por Rautava et al., 2009, era un ensayo controlado por placebo, aleatorizado, con doble enmascaramiento en 81 lactantes usando una leche maternizada que contenía *Bifidobacterium lactis* Bb-12 y *Lactobacillus rhamnosus* GG durante hasta 12 meses y una leche maternizada sin probióticos como control. La incidencia de RTI recurrentes (≥ 3) fue menor en respuesta a probióticos frente a placebo ($P = 0,031$). Rautava et al., 2009, encontraron que la incidencia de otitis media aguda como consecuencia de URI era menor en respuesta a probióticos frente a placebo ($P = 0,027$). La duración o gravedad no se registró.

El estudio no informó sobre la gravedad de las RTI. Además, el estudio no es generalizable a una población adulta debido a las diferencias inherentes entre los sistemas inmunitarios de niños, en particular lactantes, y adultos.

El documento WO2006/054135 divulga el uso de una mezcla de *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum* para la preparación de un medicamento para uso en la prevención o tratamiento de infecciones respiratorias.

Un número de estudios publicados han investigado la eficacia de probióticos en reducir la incidencia, duración y gravedad de las URI en adultos. Estos estudios proporcionan evidencia de que ciertas cepas de probióticos pueden ser eficaces en reducir la duración y gravedad de las URI y RTI en adultos generalmente sanos, cuando se comparan con controles sin probióticos. Ninguno de estos estudios se hizo con *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.

Los resultados mixtos en los estudios de probióticos publicados subrayan la noción de que no todos los probióticos se crean igual, y los efectos beneficiosos de los probióticos sobre desenlaces de URI parecen ser específicos de la cepa y pueden funcionar óptimamente en combinación.

Compendio de la invención

El fin principal del estudio era evaluar el efecto de una combinación de los probióticos específicos *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12®) sobre la HRQL en adolescentes y adultos que tienen infección de las vías respiratorias altas y si esta combinación sería beneficiosa para mejorar la HRQL en personas que padecen URI. Evaluar múltiples factores de la HRQL durante las URI -incluyendo el estado de síntomas (gravedad y duración) y el estado funcional- está justificado ya que las URI tienen impacto negativo en la productividad.

Se investigaron múltiples medidas de HRQL durante las URI tal como: duración autodeclarada, síntomas y estado funcional. Los desenlaces secundarios exploraron la incidencia autodeclarada de URI, y días perdidos de clase y trabajo debido a las URI. Se encontró que la combinación de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG®) y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12®) se podría usar en reducir la duración y gravedad de infección de las vías respiratorias altas (URI) en adolescentes y adultos y que la combinación de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG®) y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12®) también afecta beneficiosamente la HRQL durante las URI y minimiza los días perdidos de clase debido a las URI.

Los hallazgos del estudio de que la frecuencia e incidencia de las URI no se diferenciaron entre grupos son similares comparados con estudios previamente publicados en adultos (de Vrese et al., 2005) mientras que Berggren et al. (2011) encontraron que la frecuencia de las URI (≥ 1 URI) era significativamente menor en el grupo de probióticos comparado con el grupo de placebo (91 frente a 76 URI, respectivamente). Los resultados conflictivos entre Berggren et al. (2011) y el estudio actual se pueden atribuir a las diferentes cepas de probióticos (*L. casei* DN-114 y *L. plantarum*/*L. paracasei* frente a *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG®) y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12®), respectivamente).

Un estudio anterior no detectó diferencias significativas en puntuaciones de gravedad total entre grupos (Berggren et al., 2011) mientras que de Vrese et al. (2005) describieron que las puntuaciones de gravedad total eran menores en respuesta a probióticos comparado con placebo ($P = 0,056$, $P = 0,057$, y $P < 0,01$, respectivamente). La reducción en las puntuaciones de gravedad en el presente estudio era más pronunciada comparada con el ensayo anteriormente mencionado (52% frente a 20-40%, respectivamente) (de Vrese et al., 2005). Las cepas de probióticos eran diferentes entre estudios, lo que puede explicar resultados desiguales.

Leyenda de las figuras

Figura 1. Duración media de las URI en los grupos de placebo y probióticos.

Figura 2. Gravedad media de las URI en los grupos de placebo y probióticos.

Figura 3. Frecuencia de síntomas de URI individuales. La altura de las barras refleja el porcentaje de encuestas que indicaron presencia de síntomas de URI.

Figura 4. Frecuencia de síntomas de URI individuales, clasificada en una escala de tipo Likert de 7 puntos (1 = muy leve, 7 = grave). La altura de las barras refleja el porcentaje de encuestas en cada clasificación. Los gráficos no muestran el porcentaje de sujetos que no declararon el síntoma. Los porcentajes son representativos del número total de encuestas disponibles para el grupo de placebo (n = 475) y grupo de probióticos (n = 518). Para “goteo nasal”, el 29,7% y el 36,6% de las encuestas en el grupo de placebo y probióticos, respectivamente, indicó una clasificación de “1”.

Figura 5. Frecuencia de tareas funcionales deterioradas debido a URI. La altura de las barras refleja el porcentaje de encuestas que indicaron una tarea funcional deteriorada.

Figura 6. Frecuencia de tareas funcionales deterioradas debido a URI, clasificada en una escala de tipo Likert de 7 puntos (1 = muy leve, 7 = grave). La altura de las barras refleja el porcentaje de encuestas en cada clasificación. Los gráficos no muestran el porcentaje de sujetos que no declararon la tarea funcional. Los porcentajes son representativos del número total de encuestas disponibles para el grupo de placebo (n = 475) y grupo de probióticos (n = 518). Para “dormir bien”, el 21,2% y el 22,1% de las encuestas en el grupo de placebo y probióticos, respectivamente, indicó una clasificación de “1”. Para “respirar fácilmente”, el 23,7% y el 26,0% de las encuestas en el grupo de placebo y probióticos, respectivamente, indicó una clasificación de “1”.

Figura 7. Inclusión y retención de los sujetos.

^aLos 26 completadores parciales incluyen los 18 sujetos que dejaron el estudio antes de la semana 12, y los ocho sujetos que permanecieron en el estudio, pero que fueron inactivos durante una parte de la recogida de datos.

Figura 8. Datos disponibles de WURSS-21 diario.

Nota: las líneas continuas indican el flujo de cada caja a la(s) caja(s) subordinada(s); las líneas discontinuas indican los datos que contribuyeron a los casos totales usados para calcular la duración, gravedad e incidencia de las URI.

¹Datos completos = sin datos ausentes durante la URI; sin datos ausentes el día antes o el día después de que se registrara una URI.

²Datos incompletos = faltan datos durante la URI, o faltan datos el día antes o el día después de que se registrara una URI;

³Datos de encuestas usados para calcular la incidencia solo, y excluidos para los análisis de duración y gravedad;

⁴Puntuación(es) de gravedad ausente(s) interpoladas usando los datos del día antes y el día después de la encuesta ausente.

⁵Datos de encuestas excluidos para análisis de gravedad.

Definiciones

Para el fin de la siguiente especificación y reivindicaciones, los siguientes términos se definen como sigue:

“Adultos” se refiere a seres humanos generalmente sanos de la edad de 18 y más.

“Resfriado común” se define como una enfermedad clínica en donde la expresión de síntomas resulta de una URI inducida por virus (Barrett et al., 2009). Para los fines de esta solicitud de patente, la incidencia autodeclarada del “resfriado común” se capturó a través de una respuesta afirmativa a la pregunta #1 de WURSS-21 dos días seguidos. Por tanto, en el presente contexto este término se usa de forma sinónima con el término “URI” definido posteriormente.

La “HRQL durante episodios de URI” se midió de dos maneras, como: 1) duración autodeclarada de episodios de URI determinado por WURSS-21; y 2) puntuación de gravedad de síntomas autodeclarada combinada con la puntuación del estado funcional determinada a través de WURSS-21. La HRQL con respecto a la duración se expresó en términos de días y la HRQL con respecto a la gravedad de los síntomas y estado funcional se expresó en términos de área bajo la curva, que se determinó al añadir a diario las puntuaciones de WURSS-21 a través de todos los días de la enfermedad (Barrett et al., 2009).

“Lactante” en general se refiere a un ser humano desde aproximadamente el nacimiento hasta 12 meses de edad.

“Leche maternizada para lactantes” se refiere a una composición en forma líquida o en polvo que satisface los requisitos de nutrientes de un lactante al ser un sustituto de la leche humana. Estas formulaciones están reguladas por las regulaciones de la UE y los EE UU que definen los niveles de macronutrientes, vitaminas, minerales y otros ingredientes en un esfuerzo para simular las propiedades nutricionales y otras de la leche materna humana.

“Días perdidos de clase” se define como el número total de días que un sujeto perdió clases en un día determinado debido a URI.

“Días de trabajo perdidos” se define como el número total de días que un sujeto perdió trabajo pagado, pasantía o prácticas debido a URI.

5 “Prevenir” significa parar u obstaculizar una enfermedad, trastorno, o síntoma de una enfermedad o afección a través de alguna acción.

10 La “duración autodeclarada de episodios de URI” se definió como el número de días que un sujeto experimenta un episodio de URI como se indica por WURSS-21. El inicio de la enfermedad se indicó por una respuesta afirmativa a la pregunta #1 en WURSS-21 dos días seguidos, mientras que el final de la enfermedad se indicó por una respuesta negativa a la pregunta #1 en WURSS-21 dos días seguidos (Barrett et al., 2009). La duración del episodio de URI se calculó desde el primer día de una respuesta afirmativa al primer día de una respuesta negativa.

15 El “estado funcional autodeclarado” se definió como el grado al que interfirió una URI con la capacidad del sujeto para completar actividades de la vida diaria (tal como dormir y ejercitarse) y actividades de papel social (tal como interacción con otros), que varía desde “muy leve” a “grave” indicado por WURSS-21.

20 La “incidencia autodeclarada de los episodios de URI” se definió como el número de episodios de URI experimentados por cada sujeto durante el periodo de recogida de datos expresada en categorías (cero, al menos uno, al menos dos, al menos tres, etc...) y como una variable continua (número medio de episodios de URI por sujeto).

La “gravedad autodeclarada de síntomas de URI” se definió como el grado de malestar de un síntoma de URI que varía desde “muy leve” a “grave” indicado por WURSS-21.

25 “Cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad que produce una mejora o remedio de la enfermedad, trastorno o síntomas de la enfermedad o afección.

“Tratar” significa aliviar, mejorar o remediar una enfermedad, trastorno, o síntoma de una enfermedad o afección.

30 Se definió “infección respiratoria alta (URI) como declarar afirmativamente a la pregunta #1 de WURSS-21 (“¿Cómo de enfermo se siente hoy?”) durante 2 días seguidos. Por tanto, en el presente contexto este término se usa de forma sinónima con el término “resfriado común”.

35 La “encuesta de síntomas respiratorios altos de Wisconsin (WURSS-21)” es una encuesta de 21 puntos diseñada para medir cambios en los índices de la HRQL a lo largo del tiempo, específicamente dominios de enfermedad evaluados por el paciente relacionados con el resfriado común, que puede ser modificable en respuesta a una intervención (Barrett et al., 2009). Los desarrolladores de las WURSS hacen una distinción entre las URI como una categoría de “enfermedad” usada por profesionales de la salud, y el resfriado común como un término de “dolencia” usado por el público general. Esta diferencia semántica es la piedra angular de las encuestas, que se diseñaron para evaluar indicadores del estado de síntomas y el estado funcional que con importantes para los pacientes durante episodios de resfriado común. La versión de 44 puntos completa (WURSS-44) y la versión más corta de 21 puntos (WURSS-21) se diseñan para ser administradas a diario y evaluar la HRQL durante episodios de resfriado común considerando el estado de síntomas y el estado funcional. La WURSS-44 contiene los 21 puntos que están en la WURSS-21, pero tiene 21 puntos adicionales de síntomas y estado funcional. En el curso de determinar la validez de la construcción de la WURSS-44, surgió una versión de 21 puntos de la encuesta, llamada WURSS-21. Los puntos del estado de síntomas y funcional de la WURSS-44 con las valoraciones de la mayor “importancia” se incluyeron en la WURSS-21 (Barrett et al., 2009). Las WURSS parecen ser las herramientas más apropiadas para evaluar desenlaces de interés en el estudio de la presente solicitud de patente. Puesto que la WURSS-21 se comporta de forma similar en comparación con la WURSS-44, y necesita menos tiempo para completarse, se eligió esta versión más corta para evaluar los desenlaces en el estudio de la presente solicitud de patente.

50 “Adolescentes” se refiere a seres humanos generalmente sanos de la edad de 13 a 19 años.

Descripción detallada de la invención

55 Para determinar el efecto de una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12®) sobre la HRQL, se usó WURSS-21 para evaluar la duración y gravedad de las URI, considerando tanto gravedad de síntomas como deterioro del estado funcional. Se encontró que la duración mediana de las URI en el grupo de probióticos era significativamente más corta en 2 días en comparación con el grupo de placebo. Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* para uso en reducir la duración y/o gravedad de infección de las vías respiratorias altas (URI) en adolescentes y adultos.

65 La frecuencia e incidencia de URI en este estudio no fue diferente entre los grupos de placebo y probióticos. Estos hallazgos son contrarios a algunos estudios anteriores en niños que han documentado una incidencia reducida en

síntomas de URI o episodios de RTI. El estudio actual varió de este ensayo anterior con respecto a la muestra de estudio (lactantes frente a adultos), que excluye una comparación de los hallazgos.

Para determinar la HRQL durante las URI, este estudio evaluó tanto gravedad de los síntomas como el impacto de los síntomas en la vida diaria usando la WURSS-21. La puntuación mediana de gravedad para el grupo de placebo en este estudio fue 88 puntos, mientras que las puntuaciones medianas de gravedad fue 58 puntos en el grupo de probióticos. Se encontró que el grupo de probióticos tuvo significativamente menos días de enfermedad y puntuaciones de gravedad significativamente menores lo que indica una mayor HRQL en el grupo de probióticos comprado con el grupo de placebo. Además, el grupo de probiótico perdió significativamente menos días de clase comparado con el grupo de placebo.

Por tanto, un segundo aspecto de la invención se refiere a una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* para uso en aumentar la calidad de vida relacionada con la salud (HRQL) en adolescentes y adultos que tienen infección de las vías respiratorias altas (URI).

No es posible comprar estos resultados con otros estudios que emplean probióticos, ya que los ensayos anteriores no usaron la WURSS-21.

El estudio actual encontró que la duración mediana de las URI era aproximadamente dos días (50%) menor en el grupo de probióticos comprado con el grupo de placebo ($p = 0,001$). La duración media de las URI para el grupo de placebo era seis días; por tanto, este hallazgo tiene implicaciones prácticas ya que una reducción de dos días representa el 33% de la duración total de la URI. El estudio actual también encontró que la gravedad mediana de las URI era significativamente menor en el grupo de probióticos comprado con el grupo de placebo en aproximadamente el 52% ($p = 0,0003$). Estos hallazgos tienen implicaciones prácticas ya que las puntuaciones de gravedad consideran tanto la gravedad de los síntomas como el impacto negativo de los síntomas de URI en tareas funcionales. La reducción en las puntuaciones de gravedad en el estudio actual era pronunciada comparada con estudios que usan otras cepas (de Vrese et al., 2005). Estos resultados subrayan la noción de que los efectos beneficiosos de los probióticos parecen ser específicos de la cepa.

Es factible que los estudiantes asistieran a clase independientemente de las URI, ya que la incidencia de los días perdidos de clase era baja relativa a la tasa de infección de URI (84%); sin embargo, también es posible que los sujetos puedan no haber tenido clases programadas los días que estuvieron enfermos. El estudio actual encontró que el grupo de probióticos perdió significativamente menos días de clase comparado con el grupo de placebo (diferencia media = 2 días).

En este estudio, aproximadamente el 6% de los sujetos ($n = 12$) supuestamente faltaron al trabajo, y se perdieron un total de 19 días de trabajo, debido a una URI. Es prematuro sacar conclusiones sobre el número de días de trabajo perdidos debido a las URI, ya que a los sujetos no se les preguntó sobre su estado de empleo durante el periodo de recogida de datos. Es posible que los estudiantes estuvieran motivados para ganar dinero y asistir al trabajo independientemente de una URI.

Un mayor porcentaje de sujetos en el grupo de placebo declaró interferencia con tareas funcionales comparado con el grupo de probióticos; y, la mayoría de los síntomas individuales fueron declarados por un mayor porcentaje de sujetos en el grupo de placebo comparado con el grupo de probióticos. Además, un mayor porcentaje de sujetos en el grupo de probióticos frente al grupo de placebo clasificó los síntomas como menos graves (puntuación de uno, dos, tres o cuatro puntos en la escala de tipo Likert de 7 puntos); y, un mayor porcentaje de sujetos en el grupo de placebo frente al grupo de probióticos clasificó los síntomas y tareas funcionales como más graves (puntuación de cinco, seis o siete en la escala de tipo Likert de 7 puntos). Ningún otro estudio usó WURSS-21 para evaluar diferencias en la gravedad de los síntomas y deterioro del estado funcional en respuesta de probióticos frente a placebo, por tanto, no se hicieron comparaciones. Estas observaciones son probablemente responsables para las puntuaciones de WURSS-21 significativamente mayores en el grupo de placebo frente al grupo de probióticos ($p = 0,0003$). Estos hallazgos tienen implicaciones prácticas. Por ejemplo, las URI parecen tener menos impacto en actividades de la vida diaria en sujetos que tomaron probióticos comparados con placebo.

Aspectos adicionales de la invención se refieren a una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* para uso en reducir al menos uno y preferiblemente varios tal como dos, tres, cuatro o todos los síntomas de dolor de garganta, garganta irritada, tos, ronquera, congestión torácica en adolescentes y adultos que tienen infección de las vías respiratorias altas (URI).

La presente invención también se refiere a una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* para uso en reducir la puntuación mediana de gravedad en adolescentes y adultos que tienen infección de las vías respiratorias altas (URI).

Los hallazgos no son generalizables a otras cepas probióticas. Sin embargo, se contempla que sea generalizable a mutantes y variantes de las cepas usadas en la combinación. Los ejemplos de cepas de *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis* son cepas seleccionadas del grupo que consiste en CHCC5445 (BB-12®) con número de registro

DSM 15954 y mutantes y variantes de la misma, tal como CHCC7158 (HN019, número de depósito DSM17280). Esta cepa se aisló de un producto de leche maternizada para lactantes comercialmente disponible marcado Fernleaf DR-10 bifidus que se vendió en Taiwán durante 2000.

5 En el presente contexto, el término “mutante” se debe entender como una cepa derivada de una de las cepas usadas en la combinación por medio de, por ejemplo, radiación y/o tratamiento químico. El mutante debe ser un mutante funcionalmente equivalente de *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis* depositado como DSM15954 o de *Lactobacillus rhamnosus* depositado como ATCC 53103. Especialmente, el término “mutante” se refiere a una cepa obtenida al someter una cepa (tal como una cepa de la combinación) a cualquier tratamiento de mutagenización convencionalmente usado incluyendo tratamiento con un mutágeno químico tal como sulfonato de etano metano (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV o a un mutante que se produce espontáneamente. Un mutante se puede haber sometido a varios tratamientos de mutagenización (un único tratamiento se debe entender una etapa de mutagenización seguida por una etapa de cribado/selección), pero es actualmente preferido que no más de 20, o no más de 10, o no más de 5 tratamientos se lleven a cabo. En un mutante actualmente preferido, menos del 15 5%, o menos el 1% o incluso menos del 0,1% de los nucleótidos en el genoma bacteriano se han cambiado con otro nucleótido, o delecionado, comparado con la cepa madre. El mutante o variante debe pertenecer a la misma especie que la cepa madre.

Además, puesto que el presente estudio evaluó la combinación de *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12®) los hallazgos no son generalizables a las cepas de probióticos independientes entre sí.

Los hallazgos descritos en la presente solicitud de patente se basan en un subgrupo de adultos generalmente sanos que tienen edades de 18 a 25 años, pero se consideran aplicables a adolescentes y adultos generalmente sanos incluyendo ancianos, es decir, adultos de la edad de más de 70 años. El estudio se realizó en mujeres no embarazadas, pero se contempla que los resultados también serán aplicables a mujeres embarazadas. La combinación puede ser particularmente útil para personas en riesgo de adquirir una URI tal como personas con estrés psicológico o que tienen mala salud mental como se ha esbozado anteriormente.

30 En la presente invención, la forma de administración de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* no es crítica siempre que la cantidad terapéuticamente eficaz se administre a la persona en necesidad de ello.

Las composiciones preparadas según la invención se pueden administrar en forma de alimentos o de suplementos alimentarios. Por ejemplo, pueden ser productos lácteos, y en particular productos lácteos fermentados que comprenden dichas cepas combinadas con fermentos de yogur, u otros productos alimenticios tal como una barra de snack, o bebidas tales como zumo.

La *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* y *Lactobacillus rhamnosus* también se puede suministrar como un suplemento alimentario en forma de polvo, comprimido, tal como una pastilla o un comprimido efervescente, en forma capsular, como un componente de una emulsión o una pasta, o en cualquier otro soporte adecuado determinado por los expertos en la materia que puede ser un soporte eficaz para microorganismos vivos. Una combinación de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* y *Lactobacillus rhamnosus* se puede proporcionar en bolsitas individuales, cápsulas, chicle, o en composiciones más generales tal como gotas de aceite.

45 La combinación para uso según la invención preferiblemente comprende *Lactobacillus rhamnosus* GG depositado como cepa ATCC 53103 y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12®) depositado como DSM 15954. *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12®) están comercialmente disponibles de Chr. Hansen A/S, Hoersholm, Dinamarca y de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DSMZ), respectivamente.

50 Según la presente invención la combinación se puede usar para reducir la duración y/o gravedad de infección respiratoria alta (URI), y en particular del resfriado común. Preferiblemente, con el fin de obtener un efecto óptimo, la combinación se debe administrar a diario durante al menos una semana, y ventajosamente durante un periodo más largo tal como al menos 2 semanas, al menos 4 semanas, al menos 6 semanas, al menos 9 semanas, y preferiblemente 12 semanas como en el presente estudio, en una cantidad correspondiente a al menos 10^6 , tal como al menos 10^7 , preferiblemente al menos 10^8 , en general entre 10^9 y 10^{12} de tanto *Lactobacillus rhamnosus* como *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.

Ejemplos

60 El estudio era un ensayo controlado por placebo, con doble enmascaramiento, aleatorizado, prospectivo. El fin principal de este estudio era evaluar el efecto de LGG® y BB-12 sobre la HRQL durante las URI. La muestra de población fue una muestra aleatoria de estudiantes universitarios que vivían en el campus en residencias universitarias en FSU (Framingham, MA) entre el 17 de enero, 2011 y el 11 de mayo, 2011. Los investigadores se adhirieron a la Política de la FSU Respecto al Uso de Sujetos Humanos en Investigación (log #ACC07-08/030 A004) (Comité de Ética

de la Universidad Estatal de Framingham, 2010) y la Política de UMDNJ sobre Protección de Sujetos Humanos (00-01-05-10:10) (Comité de Ética de la Universidad de Medicina y Odontología de Nueva Jersey, 2006a).

Se invitó a todos los estudiantes que vivían en el campus en residencias universitarias en FSU (Framingham, MA) en enero de 2011 a participar en el estudio. Los sujetos se excluyeron de participación y se les pidió no firmar el formulario de consentimiento si: 1) su carnet de conducir o tarjeta de identificación estatal indicaba que eran menores de 18 años de edad o mayores de 25 años de edad; 2) experimentaban alergias perennes crónicas (tal como, alergias al polvo o moho); 3) estaban embarazadas; o 4) habían sido diagnosticados con asma, diabetes de tipo 1, síndrome de fatiga crónica, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (ya que estos estados médicos afectan a la función inmunitaria). Los criterios de exclusión médicos también se manifestaron en el formulario de cribado, que se pidió a los estudiantes que completaran después de firmar el formulario de consentimiento y antes de que se produjera la recogida de datos iniciales.

Los sujetos se excluyeron de participación y se les pidió no firmar el formulario de consentimiento si: 1) su carnet de conducir o tarjeta de identificación estatal indicaba que eran menores de 18 años de edad o mayores de 25 años de edad; 2) experimentaban alergias perennes crónicas (tal como, alergias al polvo o moho); 3) estaban embarazadas; o 4) habían sido diagnosticados con asma, diabetes de tipo 1, síndrome de fatiga crónica, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (ya que estos estados médicos afectan a la función inmunitaria). Los criterios de exclusión médicos también se manifestaron en el formulario de cribado, que se pidió a los estudiantes que completaran después de firmar el formulario de consentimiento y antes de que se produjera la recogida de datos iniciales. Los estudiantes también fueron excluidos de participación y se les pidió que no firmaran el formulario de consentimiento si tenían pancreatitis aguda; si estaban experimentando un tratamiento para cáncer; o, estaban tomando fármacos inmunosupresores para una enfermedad autoinmunitaria o post-trasplante. Se pidió a los sujetos que se abstuvieran de consumir suplementos nutricionales no relacionados con el estudio que contenían probióticos (por ejemplo, Culturelle®) y yogures especiales (por ejemplo, DanActive™ o Activia™) durante el estudio, así como Airborne® y cualquier preparación de hierbas que contuviera los siguientes ingredientes: Echinacea, quercetina, sello de oro, propóleo y umckaloabo. Esta información estaba enumerada en el formulario de consentimiento y se manifestó durante la sesión informativa inicial del estudio. Se recordó a los sujetos de las restricciones alimentarias en una base semanal después de completar el cuestionario semanal.

Se mantuvieron dos periodos de inclusión en el estudio con el fin de maximizar la participación, que se denominan en el presente documento periodo de inclusión #1 y periodo de inclusión #2. Se pidió a los sujetos consumir barras de probióticos o placebo a diario durante 12 semanas, y completar la WURSS-21. También se pidió a los sujetos, una vez a la semana, completar el Cuestionario Semanal. Los sujetos completaron todas las encuestas anteriormente mencionadas a través de la aplicación en línea, "Survey Monkey" (www.surveymonkey.com). Los sujetos se reunieron con el personal del estudio una vez cada dos o tres semanas (para adaptarse al calendario académico) durante el semestre de primavera de 2011 para obtener un suministro de dos o tres semanas de probióticos/placebo. Se pidió a sujetos enviar un mensaje de texto a diario al número de móvil designado manifestando que habían tomado su probiótico/placebo y completado la(s) encuesta(s). Si un sujeto tenía capacidades limitadas de enviar mensajes de texto, o tenían problemas con su teléfono móvil, se les permitía informar del cumplimiento diario a través de correo electrónico. El personal del estudio registraba el cumplimiento con el probiótico/placebo y cuestionario(s) en el Registro de Recogida de Datos cuando recibían un mensaje de texto o correo electrónico. El cumplimiento también fue registrado por los sujetos a través de la siguiente pregunta en la encuesta diaria, en línea: "¿Ha consumido su probiótico/placebo hoy?".

Se recordó a los sujetos a diario (7 días a la semana incluyendo fines de semana, vacaciones y vacaciones de primavera) que debían tomar su probiótico/placebo y completar el/los cuestionario(s) antes de las 7 pm cada día. El personal del estudio hizo un seguimiento con todos los sujetos que no habían enviado un mensaje de texto o correo electrónico a las 7 pm al enviarlos un mensaje de texto o correo electrónico que contenía la siguiente declaración: "Por favor, consuma su probiótico y haga la encuesta [enlace a la encuesta], si no lo ha hecho todavía. Por favor, responda a este mensaje para confirmar la realización". La correspondencia de cumplimiento y seguimiento con sujetos se registró en el Registro de Recogida de Datos. Si el sujeto no respondía para medianoche, entonces se le consideró no cumplidor para ese día.

Se administraron probiótico y placebo como un polvo con sabor a fresa. El polvo estaba embalado en una "barra" de aluminio pequeña. Cada barra de probiótico contenía aproximadamente mil millones de unidades formadoras de colonias (UFC) de cada uno de *Lactobacillus rhamnosus* subsp. LGG® y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12®) en forma de polvo. Las barras de placebo eran similares en sabor y aspecto a la barra de probiótico, pero no contenían probióticos. Chr. Hansen A/S fabricó las barras de probiótico y placebo y marcó cada barra con un código numérico para identificar placebo o activo. Los sujetos, el investigador principal (IP), o ayudantes de investigación no sabían qué código representaba el probiótico y qué código representaba el placebo. El código se proporcionó a una agencia independiente (Combat Feeding Directorate, Natick Soldier Research, Development, and Engineering Center, Natick, MA) que mantuvo posesión del código durante la duración del periodo de recogida de datos. Cuando se completó el análisis descriptivo y de limpieza de los datos, el código de enmascaramiento se dio al IP. Estudios de almacenamiento anteriores han indicado que estas cepas probióticas particulares son no precederas a temperatura

ambiente (aproximadamente 70 grados Fahrenheit) durante al menos 12 meses; sin embargo, los recuentos de LGG® y BB-12® vivas se repitieron a las dos semanas del final de este estudio para asegurar el control de calidad.

5 Los sujetos se aleatorizaron para recibir probiótico o control/placebo a diario durante 12 semanas. El IP usó "GraphPad", un generador de números aleatorio basado en internet (GraphPad Random Numer Generator, 2005), para generar la lista de aleatorización. Según la página web del programa, este programa "está sembrado con la hora del día, de modo que funciona de forma diferente cada vez que se usa. Cada sujeto se asignó primero a un grupo de forma no aleatoria. Después la asignación de cada sujeto se intercambió con la asignación de un sujeto elegido aleatoriamente" (GraphPad Random Numer Generator, 2005). El proceso entero se repitió dos veces para asegurar aleatorización. El IP generó una lista aleatorizada para el primer periodo de inclusión y otra lista aleatorizada para el 10 segundo periodo de inclusión, después de que los sujetos consintieran participar y antes de que empezara la recogida de datos. Esto aseguró que se aleatorizó un número igual de sujetos a los grupos de probiótico y placebo. Los suministros de dos y tres semanas de cada sujeto se embalaron en bolsas de plástico con cierre de cremallera y se marcaron individualmente con números de identificación del estudio únicos que variaban de 001 hasta 231 usando la lista de aleatorización. Estos números se correspondían con los números del sujeto en cada formulario de recogida de datos del sujeto. Una persona identificada que no era parte del personal del estudio (es decir, el coordinador de los servicios de salud para estudiantes en FSU) mantuvo la lista de aleatorización que indica la asignación a probiótico o placebo en caso de que se tuviera de desenmascarar un sujeto (por ejemplo, en el caso de un efecto adverso grave).

20 La asignación aleatoria de sujetos se realizó secuencialmente en el orden en que los sujetos se inscribieron en el estudio. El IP asignó a cada sujeto un número secuencial empezando con 001 y acabando con 231, en el orden que los formularios de consentimiento se firmaron y devolvieron al IP, que se documentó en una "lista de identificación maestra". Este número sirvió como el único número de identificación del sujeto. Todos los probióticos y placebo se almacenaron en una localización seca, fresca (menos de 70 grados Fahrenheit) durante el periodo de recogida de 25 datos.

Se aconsejó a los sujetos que almacenaran sus barras de probiótico/placebo en una localización seca, fresca (menos de 70 grados Fahrenheit). Se aconsejó a los sujetos consumir solo una barra al día. Si los sujetos olvidaban tomar su probiótico/placebo en un día determinado, se les decía a través del formulario de consentimiento y las Instrucciones 30 para Consumir Probiótico/Placebo que no tomaran una dosis de compensación al día siguiente. También se informó a los sujetos a través del formulario de consentimiento e instrucciones que el consumo de más de una barra al día podría producir gas, hinchazón y náuseas. Los días laborables cuando los sujetos recogieron su nuevo suministro de probióticos/placebo, se les pidió que devolvieran las barras de probiótico/placebo vacías y no abiertas de las dos o tres semanas previas. Si los sujetos olvidaban traer sus barras vacías o sin abrir, se les pedía volver a su habitación en la residencia inmediatamente para recuperarlas. Si esto no era posible, el sujeto organizaba una cita alternativa con el personal del estudio para entregar sus barras vacías o sin abrir. Los sujetos devolvieron su último suministro de barras de probiótico/placebo vacías o sin abrir, y recogieron su tarjeta regalo final, o bien el jueves 28 de abril (periodo de inclusión #1) o el miércoles 11 de mayo (periodo de inclusión #2).

40 Se usó WURSS-21 para determinar si un participante en el estudio padecía una URI; y, posteriormente, su HRQL durante el curso de la URI. Se administró WURSS-21 a través de una aplicación en línea (www.SurveyMonkey.com). WURSS-21 está compuesta de un punto de gravedad global (enumerado primero), un punto de cambio global (enumerado el último), 10 puntos basados en síntomas (enumerados del segundo al undécimo) y nueve puntos de estado funcional (enumerados del duodécimo al vigésimo) (Barrett et al., 2009). Todos los sujetos respondieron la 45 pregunta #1 de WURSS-21, "¿Cómo de enfermo se siente hoy?" cada día durante el periodo de recogida de datos. Se solicitó al sujeto que respondiera las restantes 20 preguntas si, y solo si, no respondían "no enfermo" a la pregunta #1.

50 Se registró un episodio de URI si el sujeto contestaba afirmativamente a la pregunta #1 dos días seguidos. Si un sujeto declaraba un episodio de URI a los siete días de recuperarse de un episodio previo de URI (indicado al responder "no" a la pregunta #1 dos días seguidos) entonces este episodio se consideró como parte de la infección previa. Sin embargo, si un sujeto declaraba un episodio de URI más de siete días después de recuperarse de un episodio anterior, entonces este episodio se registraba como una nueva infección (Barrett et al., 2009).

55 Se generaron dos puntuaciones de HRQL a partir de WURSS-21. La primera puntuación de HRQL estaba relacionada con la duración del episodio de URI. La duración autodeclarada de un episodio de URI se determinó usando respuestas a la pregunta #1 de WURSS-21. El inicio de la enfermedad se indicaba por una respuesta afirmativa a la pregunta #1 dos días seguidos, mientras que el final de la enfermedad se indicaba por una respuesta negativa a la pregunta #1 dos días seguidos (Barrett et al., 2009). La duración se calculó desde el primer día de una respuesta afirmativa hasta 60 (pero sin incluir) el primer día de una respuesta negativa.

La segunda puntuación de HRQL, generada a partir de WURSS-21, evaluaba tanto la gravedad de síntomas como el estado funcional; y, se expresó en términos de área bajo la curva (AUC) que se determinó al añadir las puntuaciones diarias de WURSS-21 (el posible intervalo de respuesta era 0-133) a través de todos los días de la enfermedad (Barrett et al., 2009).

Los sujetos autodeclaraban a través del Cuestionario Semanal si: faltaron a clase o al trabajo (incluyendo una pasantía o prácticas) como consecuencia de una URI; o tomaron antibióticos o corticoesteroides por alguna razón. Se preguntó a los sujetos si faltaron a clases en los siete días previos debido a una URI. Si respondían "sí" se les solicitaba que indicaran cuántos días habían perdido alguna clase. También se preguntó a los sujetos si faltaron al trabajo en los siete días previos (incluyendo trabajo pagado, una pasantía o unas prácticas) como consecuencia de una URI; y, si "sí", se les solicitaba que indicaran cuántos días habían faltado al trabajo.

Todos los sujetos permanecieron en el estudio independientemente del cumplimiento con la intervención del estudio y realización de los cuestionarios. Se retiró a los sujetos de participación en el estudio si el IP determinó que no era en su mejor interés seguir con la participación, por ejemplo, si el sujeto informaba que se le había diagnosticado recientemente con una afección médica especificada en los criterios de exclusión.

Todos los datos del estudio se analizaron usando el software estadístico IBM SPSS versión 19.0 (IBM Corporation, Somers, NY). Los datos del estudio se introdujeron periódicamente a lo largo de todo del periodo de recogida de datos. Se estableció la significación a $p \leq 0,05$. Los desenlaces en los problemas dos a cuatro se analizaron usando un análisis de intención de tratar, basado en orientación del Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) Statement (Schulz et al., 2010). El análisis de intención de tratar (la última observación realizada) incluía todos los datos de desenlace, independientemente de cumplimiento con probiótico/placebo y baja. Por ejemplo, si un sujeto se retiró del estudio en la semana ocho, todos los casos de URI que se produjeron antes de la baja se incluyeron en el análisis. El análisis se llevó a cabo usando los datos obtenidos durante el periodo de intervención de 12 semanas entero y, de nuevo, usando los datos obtenidos durante las semanas 2-12 del periodo de intervención, ya que los episodios de URI durante la primera semana pueden no reflejar de forma adecuada la intervención. Los datos de los sujetos se excluyeron si consumieron algún antibiótico o esteroide en algún momento durante el periodo de recogida de datos. Para el análisis con respecto al cumplimiento con la intervención, los datos de los sujetos se incluyeron durante las semanas en que consumieron su probiótico/placebo al menos 5 veces. Si un sujeto no pudo completar los dos o más días seguidos, y no comunicó si padecía o no una URI en esos días, los datos se consideraron "ausentes".

Calidad de vida relacionada con la salud: Duración de URI

Si un sujeto no pudo completar durante un episodio de URI, pero indicó que padecía una URI el día antes y el día después que el día que falta, entonces se asumió que padecía una URI en el día que falta; y, el día que falta se incluyó entonces en el cálculo de la duración. Esta suposición se hizo basada en tres factores: 1) observaciones clínicas que indican que los síntomas típicamente persisten a diario hasta la resolución; 2) el 'final de la enfermedad' se definió por un sujeto que contestaba 'no enfermo' a la pregunta #1 dos días seguidos (Barrett et al., 2009); y 3) la suposición se aplicó igualmente a ambos grupos, limitando así el sesgo.

Calidad de vida relacionada con la salud: Gravedad de URI

Si un sujeto falló los dos o más días seguidos durante un episodio de URI, o no pudo completar la encuesta el primer o el último día de un episodio de URI, entonces la puntuación de la gravedad de síntomas/estado funcional no se calculó para esa URI. En otros casos donde un sujeto falló el uno o más días consecutivos durante un episodio de URI, la puntuación de la gravedad del día que falta se interpoló haciendo la media de la puntuación de gravedad del día antes y el día después del punto de datos que falta. Esta suposición se hizo puesto que la gravedad de los síntomas de URI parece cambiar a lo largo del tiempo de una manera lineal (Barrett et al., 2009); y, la suposición se aplicó igualmente a ambos grupos limitando así el sesgo.

Se generaron dos puntuaciones de HRQL a partir de WURSS-21. La primera puntuación de HRQL estaba relacionada con la duración del episodio de URI y la segunda puntuación de HRQL evaluaba tanto gravedad de síntomas como estado funcional. La primera y segunda puntuaciones de HRQL se describieron en la muestra total y dentro de cada variable continua, expresadas como el número de días y la AUC media para cada episodio de URI, respectivamente. La AUC se calcula al añadir las puntuaciones diarias (las respuestas pueden variar de 0-133) a través de todos los días de enfermedad (Barrett et al., 2009). Cada URI se consideró un caso separado, por ejemplo, si el sujeto #50 tuvo dos URI durante el periodo de recogida de datos, entonces cada URI se describió por separado. La estadística descriptiva (media, mediana, intervalo, y desviación estándar) se describió para estas variables continuas. La distribución normal de las variables continuas se evaluó usando la estadística de Shapiro-Wilk. Un valor p menor que o igual a 0,05 indica una separación de normal. Si los datos estaban distribuidos normalmente, las diferencias entre los grupos de probióticos y placebo se determinaban usando prueba de la T de muestras independientes. Si los datos no estaban normalmente distribuidos, los datos se analizaron usando la prueba de la U de Mann-Whitney, el equivalente no paramétrico de una prueba de la T independiente.

Resultados

Doscientos treinta y un sujetos consistieron participar en el estudio, y se aleatorizaron a Placebo o Probiótico. De los 231 sujetos que inicialmente se inscribieron en el estudio, el 14% (n = 33; Placebo, n = 20, 61%, Probiótico, n = 13, 39%) no lograron atender la sesión en ensayo inicial y/o consumir al menos una dosis de placebo o probiótico. Los 33 sujetos anteriormente mencionados no se incluyeron en ningún análisis de datos. De los 231 sujetos que inicialmente

se inscribieron, el 86% (n = 198; Placebo, n = 97, 49%; Probiótico, n = 101, 51%) atendieron el ensayo inicial y consumieron al menos una dosis de placebo o probiótico; y, esto describe la muestra de intención de tratar, denominada la muestra total para el resto de este documento. De estos 198 sujetos, la tasa de retención fue el 91% (N = 180; Placebo, n = 85, 47%; Probiótico, n = 95, 53%).

De los 198 sujetos en la muestra total, el 4% (n = 8; Placebo, n = 4, 50%; Probiótico, n = 4, 50%) fueron inactivos durante alguna parte del periodo de recogida de datos (es decir, no lograron recoger nuevos suministros de probiótico/placebo y/o no realizaron las encuestas diarias). Estos ocho sujetos eligieron no retirarse del estudio; y, sus datos de las semanas de participación activa se incluyeron en el análisis estadístico.

Un total de 43 efectos adversos (EA) se describieron durante el periodo de estudio. Ninguno de los efectos adversos cumplió los criterios para un problema no anticipado según 45 CFR parte 46 como se especifica en el formulario de IRB UMDNJ titulado "Problemas/Efectos Adversos no Anticipados en Informe de Investigación en Sujetos Humanos a IRB" (Comité de Ética de la Universidad de Medicina y Odontología de Nueva Jersey, 2006b).

De los 43 EA descritos, infección gastrointestinal vírica autodiagnosticada fue el más comúnmente declarado (n = 19, 44%; Placebo, n = 9, 47%; Probiótico, n = 10, 53%), lo que se puede esperar dado que el estudio se realizó durante los meses de invierno cuando la incidencia de gastroenteritis vírica aguda es máxima. La flatulencia aumentada y el meteorismo son potenciales efectos secundarios conocidos asociados con el consumo de probióticos, y fueron el segundo efecto adverso más común que se produjo en el 16% de los sujetos (n = 7; Placebo, n = 4, 57%; Probiótico, n = 3, 43%).

Los resultados de las pruebas de la U de Mann-Whitney para BMI, edad, peso, y circunferencia de la cintura demostraron que estas características no se diferenciaban significativamente entre grupos (p > 0,05). Los resultados de las pruebas de la t de muestras independientes indicaron que la altura no se diferenciaba significativamente entre grupos (t = 1,344(196), p = 0,181).

El setenta y seis por ciento (n = 151) de los sujetos en la muestra total era mujeres; y, la prueba exacta de Fisher indicó que la distribución de hombres y mujeres no se diferenciaba significativamente entre los grupos de probiótico y placebo (p = 0,242).

La prueba exacta de Fisher indicó que la distribución de razas no se diferenciaba significativamente entre los grupos de probiótico y placebo (p = 0,185). La mayoría de los sujetos (83%, n = 165) en la muestra total (N = 198), se clasificaron a sí mismos como 'Blanco o Caucásico'. La prueba de la chi cuadrado de Pearson indicó que la distribución de etnias (es decir, 'Blanco o Caucásico', 'Negro o Afroamericano', y 'Otros') no se diferenciaba significativamente entre los grupos ($\chi^2 = 0,283(2)$, p = 0,868).

De los 198 sujetos en la muestra total, el 39% (n = 77; Placebo, n = 39, 51%; Probiótico, n = 38, 49%) no experimentaron ninguna URI. En el restante 61% (n = 121; Placebo, n = 58, 48%; probiótico, n = 63; 52%) se declararon 167 casos de URI (Placebo = 83 casos, 50%; Probiótico n = 84 casos, 50%) durante el periodo de recogida de datos. Estos 167 casos de URI se usaron para evaluar la incidencia de episodios de URI en la muestra total, y dentro y entre grupos. Hubo 36 casos (Placebo = 13, 36%, Probiótico = 23, 64%) donde los sujetos fallaron al menos dos días seguidos, y no comunicaron a través del teléfono, mensaje de texto o correo electrónico si padecían o no una URI en esos días; por tanto, estos datos se consideraron ausentes.

En un esfuerzo para examinar la incidencia de las URI durante el curso del estudio, la incidencia autodeclarada se presentó por semana y se revisó. La mayoría de los casos de URI se produjo durante las primeras cinco semanas del periodo de recogida de datos (n = 105, 63%; Placebo, n = 51, 49%; Probiótico, n = 54, 51%) mientras que solo el 16% (n = 27; Placebo, n = 14, 17%; Probiótico, n = 13, 15%) de casos URI se produjo durante las últimas cuatro semanas del estudio.

De los 198 sujetos totales, el 42% (n = 84) experimentaron una URI, mientras que el 19% (n = 37) de todos los sujetos experimentaron más de una URI, durante el periodo de recogida de datos. La incidencia de URI no fue significativamente diferente entre los grupos de placebo y probióticos.

El cuestionario tiene tres subescalas (síntomas nasales, síntomas de garganta y puntos de actividad/función). Por tanto, para confirmar la fiabilidad de la encuesta, se calculó el α de Cronbach por separado para cada subescala usando puntuaciones de gravedad el día tres de una URI autodeclarada. El α de Cronbach para síntomas nasales, síntomas de garganta y puntos de actividad/función varió de 0,900-0,964, lo que indica buena fiabilidad. Además, las correlaciones entre cada punto y la puntuación total para cada subescala fueron todas mayores de 0,6, lo que indica buena correlación.

Una limitación al usar datos autodeclarados para evaluar las URI es que algunos síntomas de URI son similares a síntomas de alergia (por ejemplo, rinorrea); por tanto, es posible que este estudio clasificara incorrectamente episodios de alergia como URI. El estudio intentó minimizar esta amenaza a la validez interna recogiendo la mayoría de los datos durante el invierno y principio de la primavera, excluyendo sujetos con alergias crónicas, y asignando

aleatoriamente los sujetos al grupo de tratamiento y comparación. Además, de las 167 URI descritas durante el estudio, solo el 16% se produjeron durante la estación de alergia; y, el porcentaje de URI descritas durante la estación de alergias era similar entre los grupos de placebo y probióticos (17% y 15%, respectivamente).

5 La figura 8 detalla los datos disponibles del diario en la muestra total (N = 198). El efecto de los probióticos en la HRQL durante las URI considera la duración de la enfermedad. De los 167 casos de URI declarados durante el periodo de recogida de datos (Placebo, n = 83 casos, 50%; Probiótico, n = 84 casos, 50%), se calculó la duración para 158 casos (95%; Placebo = 79 casos, 50%; Probiótico = 79 casos, 50%) y la gravedad se calculó para 143 casos (86%; Placebo = 69 casos, 48%; Probiótico = 74 casos, 52%).

10 De estos 167 casos, hubo 119 casos (71%; Placebo = 55 casos, 46%; Probiótico = 64 casos, 54%) con datos completos, en donde, se completó en todos los días consecutivos de la URI y el día anterior y el día después de la URI. Se calcularon incidencia, duración y gravedad para todos los casos de URI con datos completos.

15 Todas las URI con datos incompletos (es decir, datos ausentes durante una URI o el día antes o el día después de que una URI se registrara, n = 48 casos, 29%) se incluyeron en el cálculo de incidencia, pero la duración y gravedad solo se calcularon en algunos de estos casos como se indica en la sección de métodos (página 109-110) y se resume a continuación:

20 De los 48 casos con datos incompletos, hubo 15 casos totales (31%; Placebo, n = 10, 67%; Probiótico, n = 5, 33%) donde los sujetos fallaron en dos o más días consecutivos durante una URI y/o el primer o último día de la URI, y comunicaron que estaban 'enfermos' o 'no enfermos' en los días que faltaban. Estos 15 casos se usaron para calcular la duración, pero no la gravedad. De los 48 casos de URI con datos incompletos, hubo 24 casos (50%; Placebo, n = 14, 58%; Probiótico, n = 10, 42%) donde los sujetos fallaron en uno o más días consecutivos durante una URI. En ocho de estos 24 casos (33%; Placebo, n = 4, 50%; Probiótico, n = 4, 50%), los sujetos comunicaron que estuvieron 'enfermo' o 'no enfermo' el día(s) que fallaron. En otros 16 casos (67%; Placebo, n = 10, 63%; Probiótico, n = 6, 38%), se asumió que el sujeto padecía una URI el día que faltaba. Los 24 casos de URI mencionados anteriormente se usaron para calcular tanto duración como gravedad, ya que las puntuaciones de gravedad diarias se interpolaron haciendo la media de las puntuaciones de gravedad del día antes y el día después de la encuesta que faltaba.

30 Calidad de vida relacionada con la salud durante infecciones respiratorias altas

En la muestra total (N = 198), hubo 1003 días totales de URI (Placebo, n = 562; 56%; Probiótico, n = 441, 44%). La figura 1 y la correspondiente tabla proporciona estadística descriptiva que concierne a la duración de las URI en la muestra total y por grupo. La duración media de URI del grupo de placebo y probióticos también se muestra en la figura 1. La duración media de URI para el grupo de placebo fue 1,5 días más larga comparada con el grupo de probióticos. La estadística de Shapiro-Wilk indicó que la duración de las URI no estaba normalmente distribuida ni para el grupo de placebo ni de probióticos (0,865, $p < 0,0001$, y 0,745, $p < 0,0001$, respectivamente). Por tanto, las diferencias entre los grupos de probióticos y placebo se determinaron usando una prueba no paramétrica. La prueba de la U de Mann-Whitney indicó que la duración de URI era significativamente mayor en el grupo de placebo (Mdn = 6) comparado con el grupo de probióticos (Mdn = 4), $U = 2530,00$, $z = -2,07$, $p = 0,001$ (unilateral). El grupo de placebo tuvo un orden medio de 72,03.

45 La figura 2 y la correspondiente tabla detalla las puntuaciones de gravedad de las URI, generadas por WURSS-21, en la muestra total y por grupo. La puntuación media de gravedad de cada grupo también se muestra en la figura 2. Hubo una diferencia del 57% (es decir, 57 puntos) en la puntuación media de gravedad entre el grupo de placebo (157,30) y el grupo de probióticos (100,43). La estadística de Shapiro-Wilk indicó que las puntuaciones de gravedad no estaban distribuidas normalmente ni para el grupo de placebo ni para el de probióticos (0,743, $p < 0,0001$, y 0,660, $p < 0,0001$, respectivamente). Por tanto, la diferencia entre los grupos se determinó usando una prueba no paramétrica. La prueba de la U de Mann-Whitney indicó que la puntuación de gravedad de URI era significativamente mayor para el grupo de placebo (Mdn = 88) comparado con el grupo de probióticos (Mdn = 58), $U = 1965,00$, $z = -2,38$, $p = 0,0003$ (unilateral). El grupo de placebo tuvo un orden medio de 80,52 y el grupo de probióticos tuvo un orden medio de 64,05.

55 El análisis para duración y gravedad se repitió usando datos que se obtuvieron durante las semanas 2-12 solo. Consistente con los resultados en la página 140-143, estos análisis adicionales indicaron que la duración de las URI era más corta y la gravedad de las URI era menor en el grupo de prebiótico comparado con placebo ($p < 0,01$). Estos hallazgos sugieren que la HRQL era mayor en el grupo de prebióticos comparado con el grupo de placebo.

60 De las 167 URI que se produjeron durante el periodo de recogida de datos, hubo 993 días de encuestas (placebo, n = 518, 52%; probióticos, n = 475, 48%) que se usaron para explorar la contribución de síntomas individuales de URI (puntos 2-11 de WURSS-21) y deterioro de tereas funcionales (puntos 12-20 de WURSS-21) respecto a la puntuación de gravedad total. Los síntomas más frecuentemente declarados para los grupos de placebo y probióticos parecen ser 'goteo nasal' (n = 709, 71%; Placebo, n = 356, 50%; Probiótico, n = 353, 50%) y 'cansado' (n = 704, 71%; Placebo, n = 370, 53%; probiótico, n = 334, 47%).

65

5 Como se muestra en la figura 3, una mayoría de los síntomas individuales fueron declarados por un porcentaje mayor de sujetos en el grupo de placebo comparado con el grupo de probióticos. En general, las clasificaciones estaban desviadas a la izquierda (desviadas positivamente), con la mayoría de los sujetos que clasificaba los síntomas individuales con una puntuación de 1 (muy leve). Sin embargo, como se muestra en la figura 4 un mayor porcentaje de sujetos en el grupo de probióticos clasificó los síntomas como menos graves (puntuación de uno, dos, tres o cuatro) comparado con el grupo de placebo, mientras que un mayor porcentaje de sujetos en el grupo de placebo clasificó los síntomas como más graves (puntuación de cinco, seis o siete) comparado con el grupo de probióticos.

10 La frecuencia de las respuestas relacionadas con la interferencia de las URI en tareas funcionales se presenta en las figuras 5 y 6. Las tareas funcionales menos comúnmente declaradas que estaban deterioradas por las URI fueron 'trabajo fuera de casa' (n = 217, 22%; Placebo, n = 133, 61%; probiótico, n = 84, 39%) y 'trabajo dentro de casa' (n = 189, 19%; Placebo, n = 123, 65%; Probiótico, n = 66, 35%). Un mayor porcentaje de sujetos en el grupo de placebo declaró interferencia con tareas funcionales comparado con el grupo de probióticos. En general, las clasificaciones estaban desviadas hacia la izquierda (desviadas positivamente), con la mayoría de los sujetos que clasifica las tareas funcionales con una puntuación de 1 (muy leve). Sin embargo, como se muestra en la figura 5 un mayor porcentaje de sujetos en el grupo de placebo clasificó las tareas funcionales como más grave (puntuación de cuatro, cinco, seis o siete) comparado con el grupo de probióticos.

20 De los 198 sujetos en la muestra total, se declararon 19 días de trabajo perdidos (10%, Placebo, n = 11, 58%; Probiótico, n = 8, 42%) y 49 días de clase perdidos (25%, Placebo, n = 34, 69%; probiótico, n = 15, 31%). Hubo dos sujetos en la muestra total (1%, Placebo, n = 1, 50%; probiótico, n = 1, 50%) que no pudieron hacer la encuesta semanal menos de siete días después de experimentar una URI, y no indicaron si faltaron al trabajo o clase debido a la URI. De los 198 sujetos totales, el 94% (n = 186; Placebo, n = 92, 50%; Probiótico, n = 94, 51%) indicaron que no habían perdido ningún día de trabajo debido a una URI.

25 De los 198 sujetos en la muestra total, la mayoría (n = 171, 86%; Placebo, n = 79, 46%; Probiótico, n = 92, 54%) indicaron que no faltaron a ninguna clase debido a una URI. Más sujetos en el grupo de probióticos alcanzaron cero días de clase perdidos comparado con el grupo de placebo (diferencia de n = 13, 9,7%). La prueba de la U de Mann-Whitney indicó que el número de días perdidos de clase era significativamente mayor para el grupo de placebo (Mdn = 0) comparado con el grupo de probióticos (Mdn = 0), U = 4421,00, z = -0,45, p = 0,002 (unilateral). El grupo de placebo tuvo un orden promedio de 104,42 y el grupo de probióticos tuvo un orden promedio de 94,77.

35 El análisis para días perdidos de trabajo y clases debido a episodios de URI se repitió usando datos que se obtuvieron durante las semanas 2-12 solo. Estos análisis adicionales indicaron que el número de días de trabajo perdidos era igual entre grupos (p > 0,05) mientras que el número de días de clase perdidos era significativamente menor para el grupo de probióticos comparado con el grupo de placebo, p < 0,05 (unilateral).

Referencias

40 Barrett, B., Brown, R. L., Mundt, M. P., Thomas, G. R., Barlow, S. K., Highstrom, A. D., & Bahrainian, M. (2009). Validation of a short form Wisconsin Upper Respiratory Symptom Survey (WURSS-21). *Health Quality of Life Outcomes*, 7, 76-96.

45 Berggren, A., Lazou, A., I, Larsson, N., & Onning, G. (2011). Randomised, double-blind and placebo-controlled study using new probiotic lactobacilli for strengthening the body immune defence against viral infections. *European Journal of Nutrition*, 50, 203-210.

50 de Vrese M., Rautenberg, P., Laue, C., Koopmans, M., Herremans, T., & Schrezenmeir, J. (2005). Probiotic bacteria stimulate virus-specific neutralizing antibodies following a booster polio vaccination. *European Journal of Nutrition*, 44, 406-413.

Rautava, S. E., Salminen, S., & Isolauri, E. (2009). Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy—a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr*, 101, 1722-1726.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium aminalis* subsp. *lactis* para uso en reducir la duración y/o la gravedad de infección de las vías respiratorias altas (URI) en adolescentes y adultos que tienen infección de las vías respiratorias altas (URI).
2. Una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium aminalis* subsp. *lactis* para uso según la reivindicación 1 en reducir la puntuación de gravedad mediana.
- 10 3. Una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium aminalis* subsp. *lactis* para uso según la reivindicación 1 en aumentar la calidad de vida relacionada con la salud (HRQL).
- 15 4. Una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium aminalis* subsp. *lactis* para uso según la reivindicación 1 en reducir el síntoma de dolor de garganta.
5. Una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium aminalis* subsp. *lactis* para uso según la reivindicación 1 en reducir el síntoma de garganta irritada.
- 20 6. Una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium aminalis* subsp. *lactis* para uso según la reivindicación 1 en reducir el síntoma de tos.
7. Una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium aminalis* subsp. *lactis* para uso según la reivindicación 1 en reducir el síntoma de ronquera.
- 25 8. Una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium aminalis* subsp. *lactis* para uso según la reivindicación 1 en reducir el síntoma de congestión torácica.
- 30 9. Una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium aminalis* subsp. *lactis* para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde el *Lactobacillus rhamnosus* es la cepa depositada como ATCC 53103 y el *Bifidobacterium aminalis* subsp. *lactis* es la cepa depositada como DSM 15954.
- 35 10. Una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium aminalis* subsp. *lactis* para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde se debe administrar una cantidad diaria de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium aminalis* subsp. *lactis* entre alrededor de 10^6 y 10^{12} ufc.
11. Una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium aminalis* subsp. *lactis* para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en donde la combinación se debe administrar a diario.
- 40 12. Una combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium aminalis* subsp. *lactis* para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en donde la combinación de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium aminalis* subsp. *lactis* se debe administrar durante un periodo de al menos una semana.

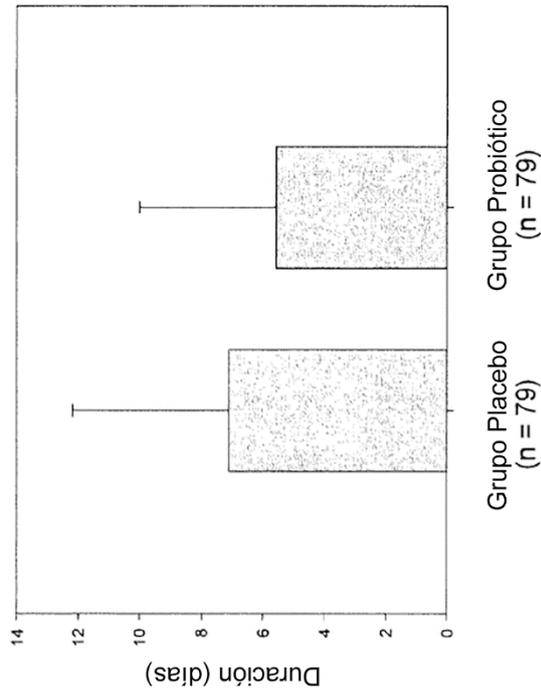


Figura 1. Duración media de las URI en los grupos de placebo y probióticos

Duración de las URI en la muestra total y por grupo

Muestra Total (N = 158)		Placebo (n = 79)		Probiótico (n = 79)							
Media	Mediana	DE	Orden	Media	Mediana	DE	Orden				
6.35	5.00	4.80	2-25	7.11	6.00	5.07	2-25	5.58	4.00	4.41	2-21

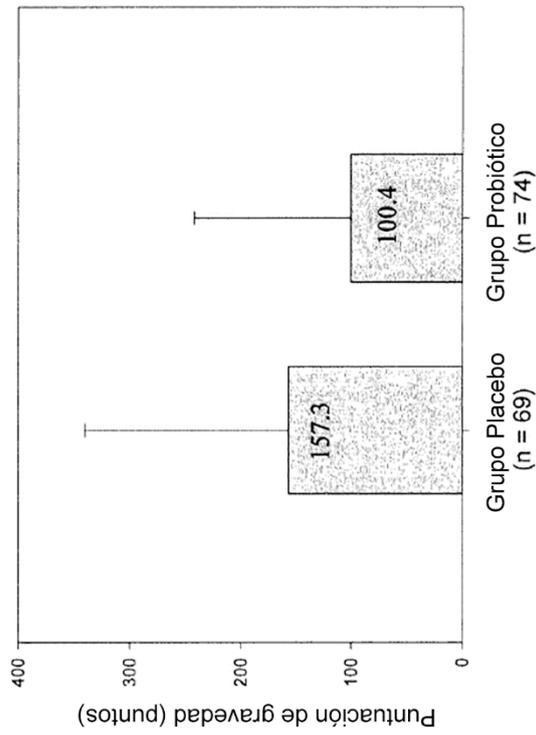


Figura 2. Gravedad media de las URI en los grupos de placebo y probióticos

Puntuaciones de gravedad* de las URI en la muestra total y por grupo

Muestra Total (N = 143)				Placebo (n = 69)				Probiótico (n = 74)			
Media	Mediana	DE	Orden	Media	Mediana	DE	Orden	Media	Mediana	DE	Orden
127.87	66.00	164.69	5-832	157.30	88.00	183.39	6-801	100.43	58.00	140.88	5-832

*Las puntuaciones de gravedad se generaron por WURSS-21 y abarcaban síntomas y su impacto en la vida diaria

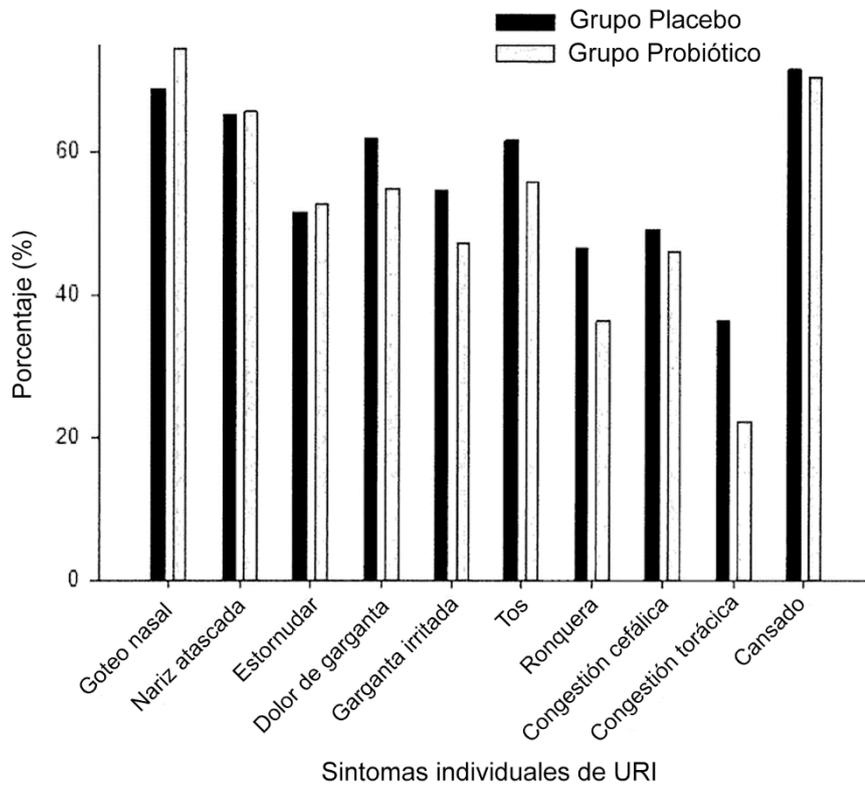


Figura 3. Frecuencia de síntomas individuales de URI. La altura de las barras refleja el porcentaje encuestas que indicaron la presencia de síntomas de URI

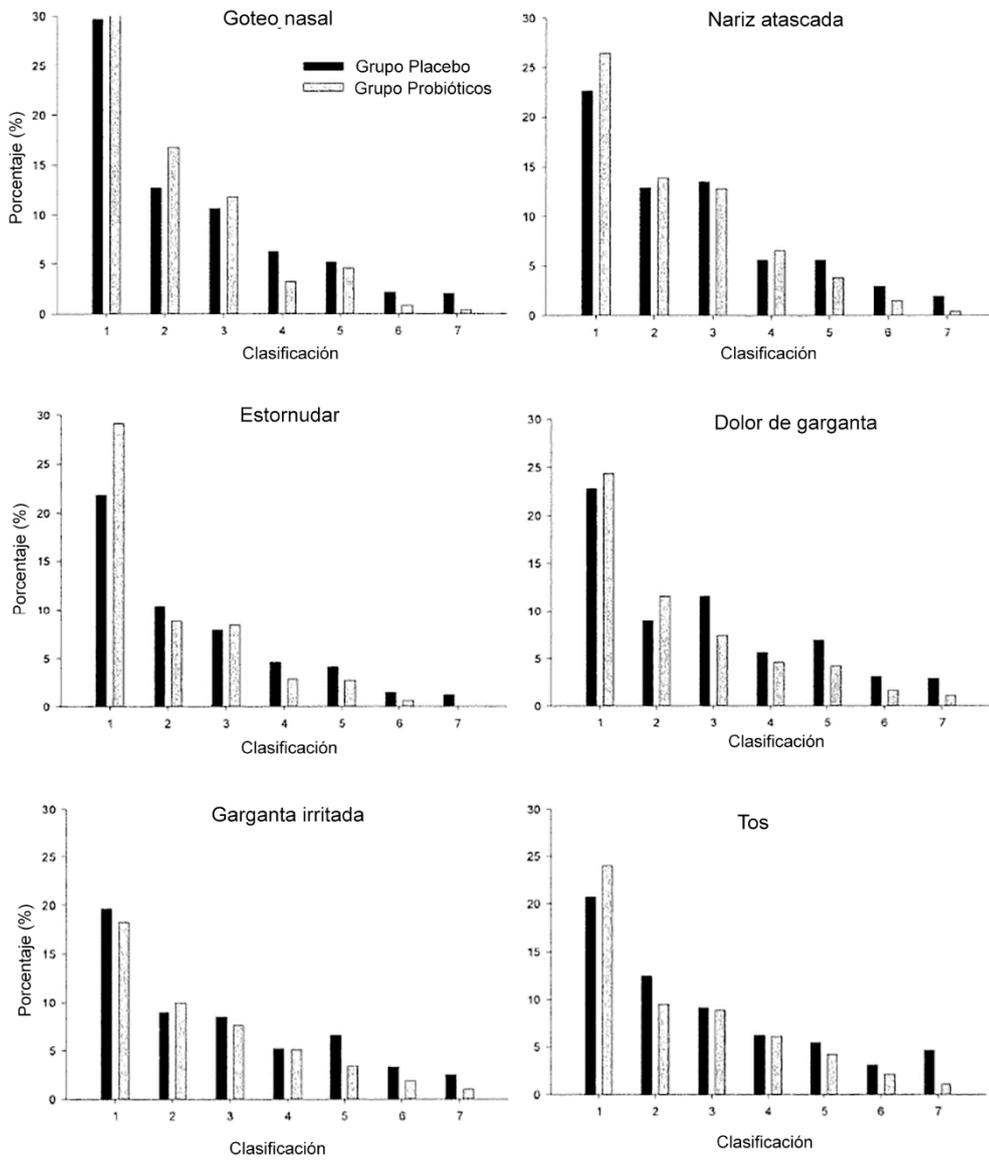


Figura 4

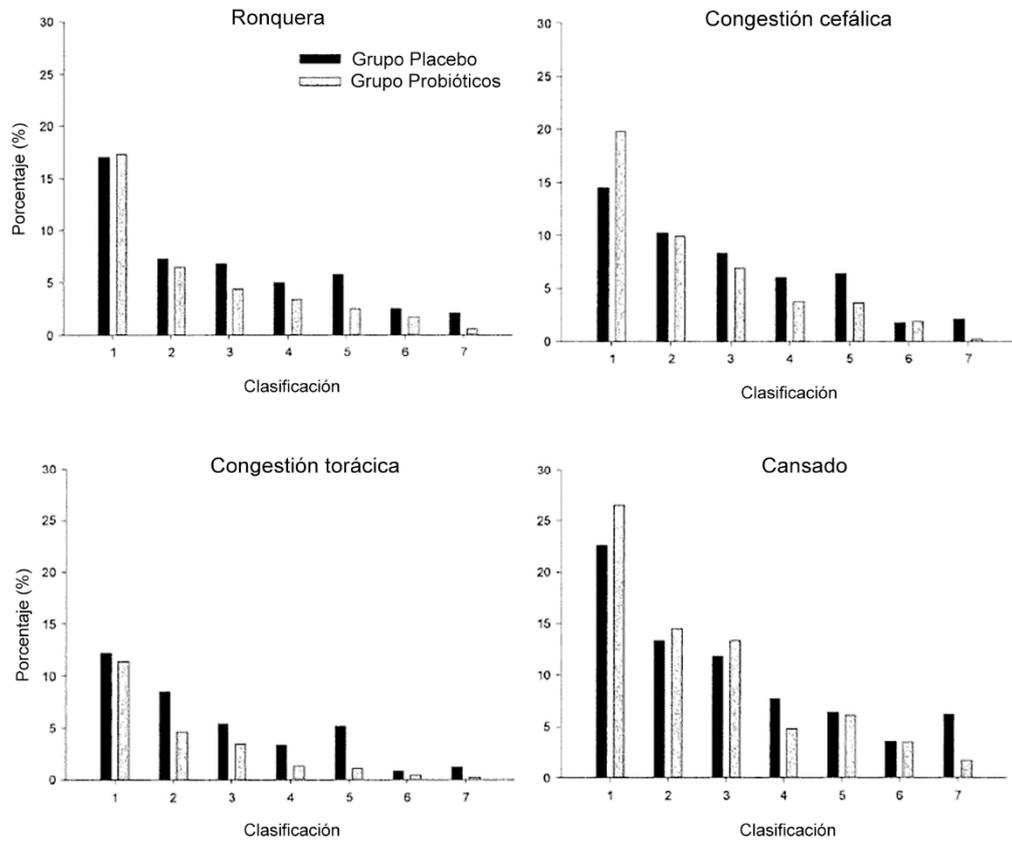


Figura 4 continuada

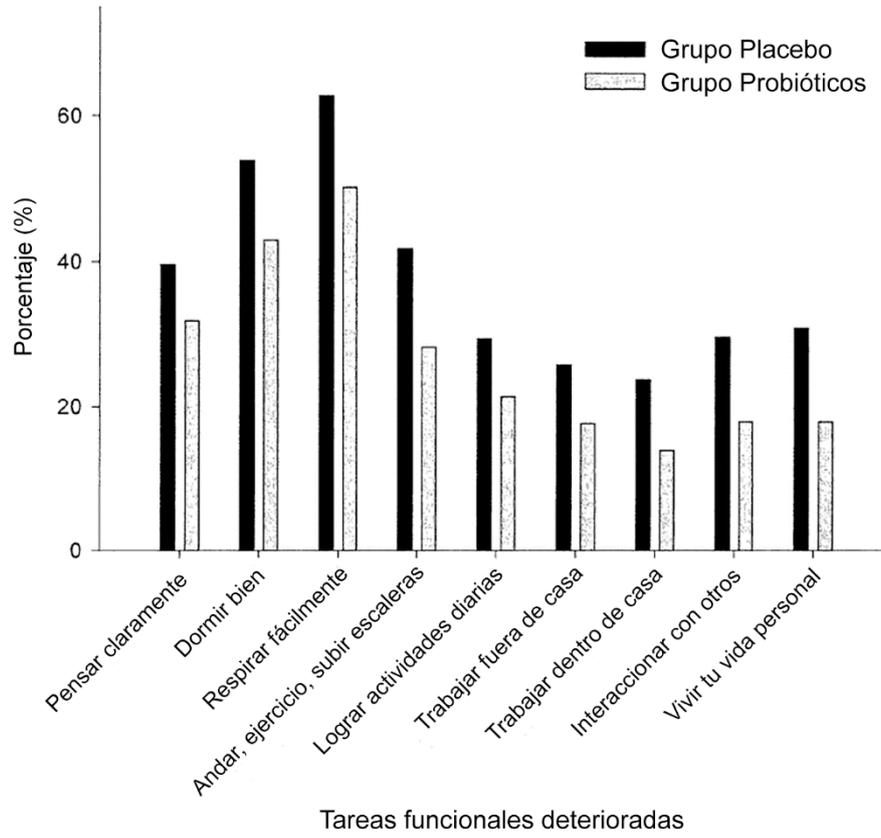


Figura 5

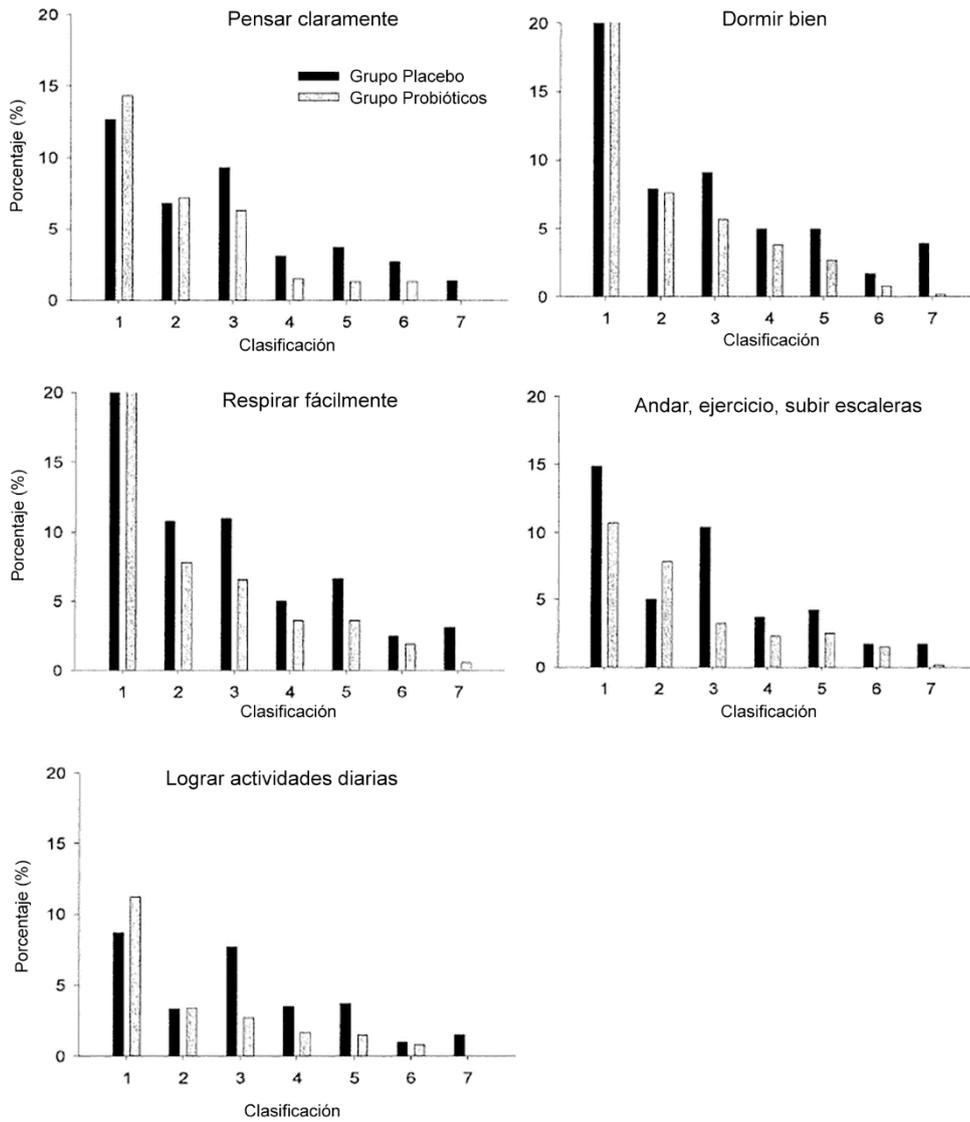


Figura 6

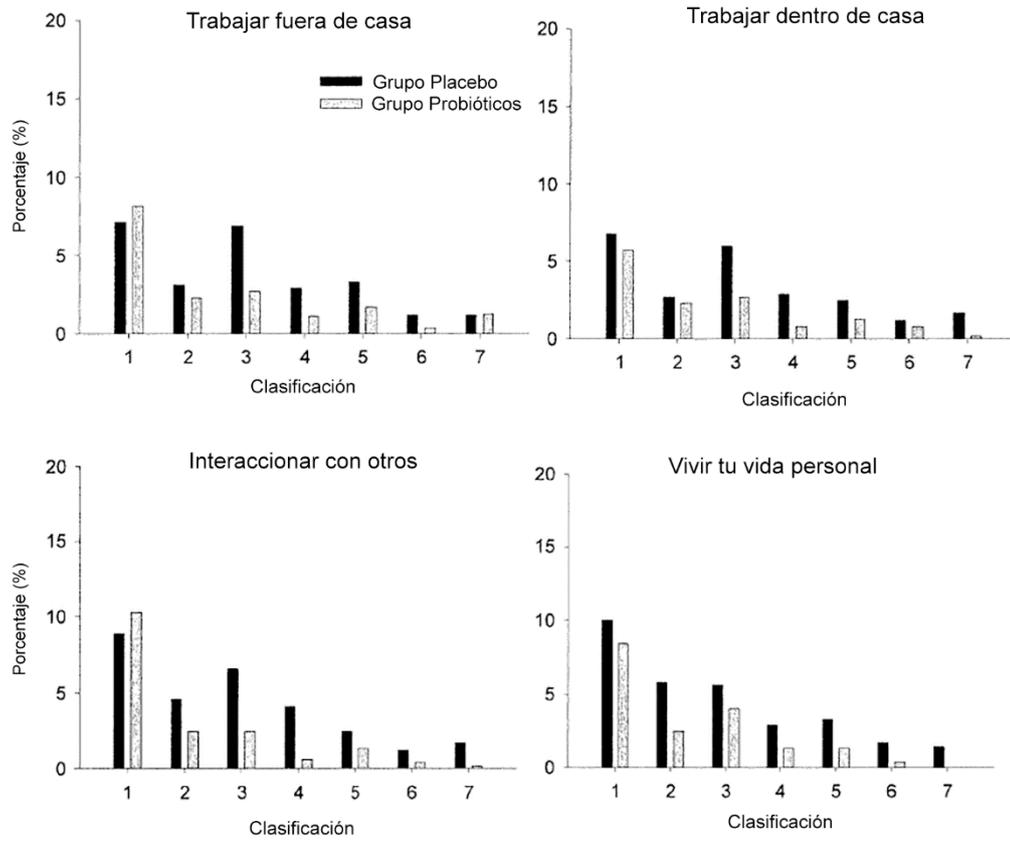


Figura 6 continuada

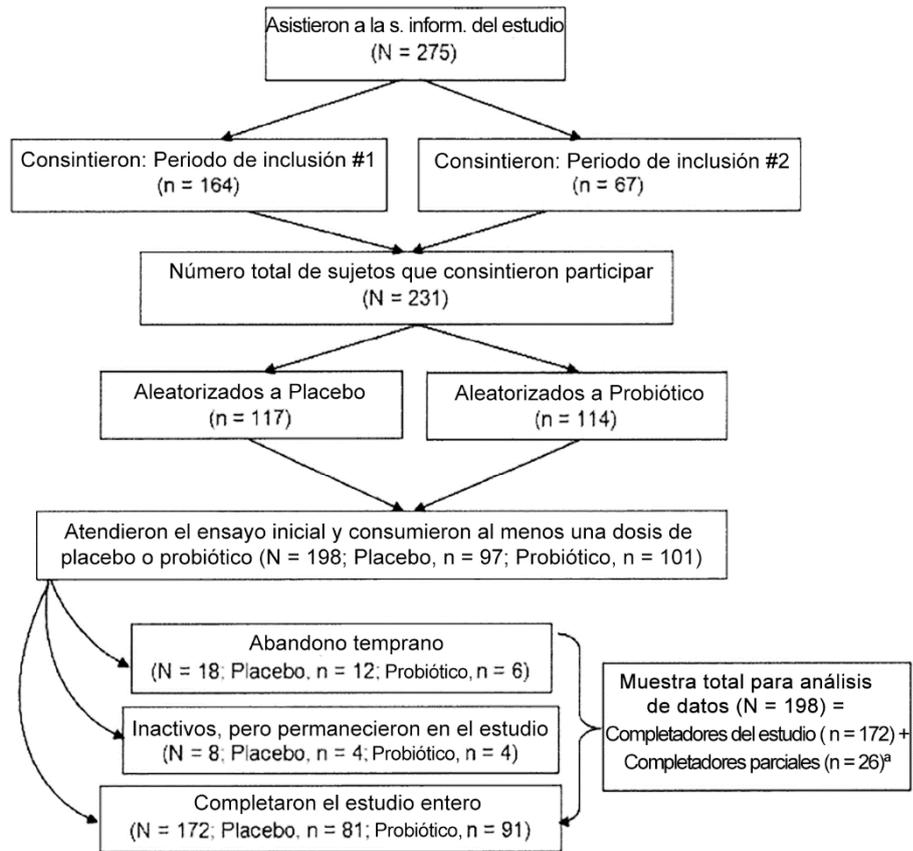


Figura 7

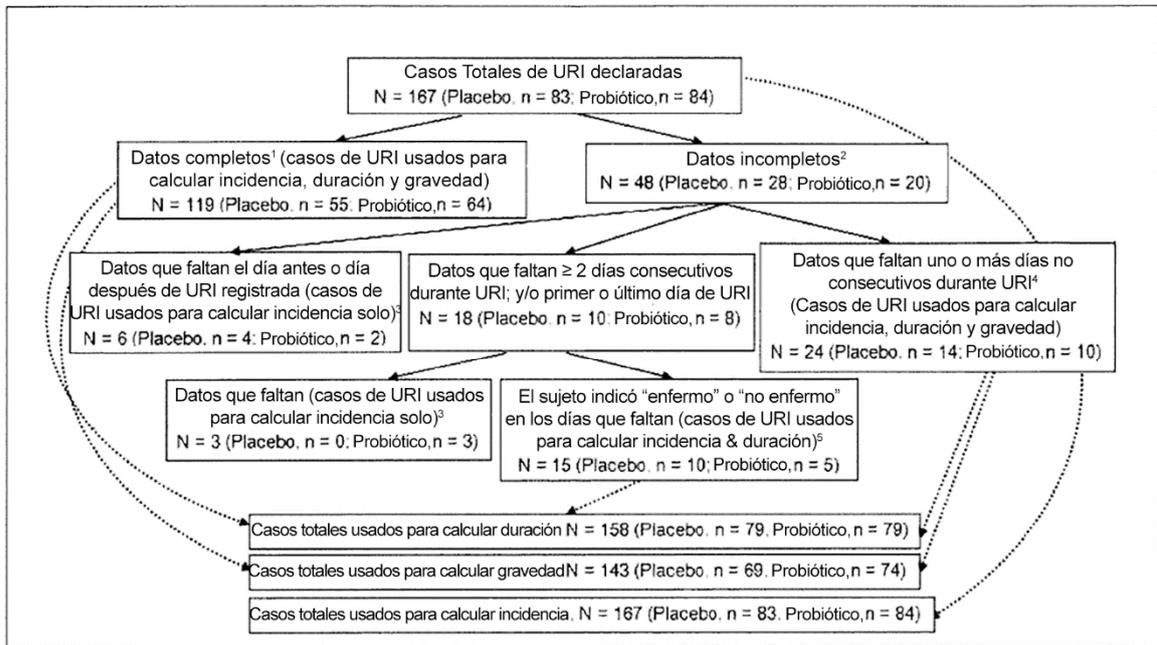


Figura 8