

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 716**

51 Int. Cl.:

A61K 35/745	(2015.01) A61K 9/16	(2006.01)
A61K 35/747	(2015.01) A61K 9/20	(2006.01)
A23L 33/135	(2006.01) A61P 3/00	(2006.01)
A61K 9/48	(2006.01)	
A61K 9/00	(2006.01)	
A61K 9/02	(2006.01)	
A61K 9/06	(2006.01)	
A61K 9/08	(2006.01)	
A61K 9/10	(2006.01)	
A61K 9/107	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2021 PCT/EP2021/050631**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.07.2021 WO21144333**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2021 E 21710181 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024 EP 4048299**

54 Título: **Composición probiótica para su uso como antioxidante**

30 Prioridad:

15.01.2020 EP 20382019

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

01.07.2024

73 Titular/es:

**BIOPOLIS, S.L. (100.0%)
Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático
Augustín Escardino, Benlloch, nº 9 Edf. 2
46980 Paterna (Valencia), ES**

72 Inventor/es:

**CHENOLL CUADROS, MARIA EMPAR;
MARTORELL GUEROLA, PATRICIA;
GENOVÉS MARTÍNEZ, SALVADOR;
RAMÓN VIDAL, DANIEL;
LÓPEZ ROMÁN, FRANCISCO JAVIER;
ÁVILA GANDÍA, VICENTE y
CÁNOVAS GARCÍA, FERNANDO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 974 716 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

Composición probiótica para su uso como antioxidante

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se encuadra dentro del campo de la medicina, preferiblemente la medicina deportiva, y los alimentos probióticos o suplementos nutricionales que ejercen un efecto antioxidante. Particularmente, la invención se engloba dentro de las composiciones probióticas alimentarias o farmacéuticas destinadas a la reducción del estrés oxidativo, preferiblemente provocado por la realización de un ejercicio físico intenso.

Estado de la técnica

Las especies reactivas del oxígeno (ROS), como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($HO \cdot$), son especies radicales y no radicales de oxígeno provocadas por la reducción parcial de éste. Las ROS celulares se generan endógenamente en el proceso de fosforilación oxidativa mitocondrial, o pueden surgir de interacciones con fuentes exógenas tales como compuestos xenobióticos. Cuando las ROS colapsan el sistema de defensa celular antioxidante, ya sea a través de un aumento en su concentración o debido a una disminución de la capacidad antioxidante celular, se produce el estrés oxidativo. Esta reacción daña a los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Además, está implicada en diversos procesos patológicos como la carcinogénesis, la neurodegeneración, la aterosclerosis, la diabetes y el envejecimiento. De hecho, hay una multitud de enfermedades que se han relacionado con el estrés oxidativo y la generación de radicales libres. Por esto, terapias antioxidantes y dietas ricas o enriquecidas con antioxidantes ayudan a prevenir, o al menos a disminuir, el deterioro funcional orgánico originado por un exceso de estrés oxidativo.

Afortunadamente, el organismo humano ha desarrollado una serie de mecanismos de defensa enzimáticos y no enzimáticos contra los efectos nocivos de las ROS. Así, las enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), juegan un papel importante en la prevención del daño provocado por los radicales libres en los organismos vivos.

El ejercicio físico, realizado de forma regular, tiene muchos beneficios para la salud, incluyendo un descenso en la mortalidad y un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes. Sin embargo, la contracción musculoesquelética de forma prolongada e intensa genera radicales libres y provoca daño oxidativo a los constituyentes celulares. Así, la inducción de estrés oxidativo durante el ejercicio físico se ha propuesto como una causa de daño a nivel de la membrana del miocito, lo que conduce a una exacerbada respuesta inflamatoria y, por consiguiente, al padecimiento de excesivo dolor y fatiga muscular posteriores al ejercicio.

La Organización Mundial de la Salud considera los probióticos como microorganismos vivos que tienen efectos beneficiosos para la salud si se administran en cantidades apropiadas. En los últimos años, el número de estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, relacionados con las propiedades antioxidantes de los probióticos ha aumentado significativamente (Kleniewska, P., *et al.*, 2016, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, doi:10.1155/2016/1340903; Poljsak, B., 2011, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, doi:10.1155/2011/194586; Hybertson, B. M., *et al.*, 2011, *Mol. Aspects Med.*, 32, 234–246; Banegas JR, *et al.*, 2006, *Rev Esp Cardiol.*, 6: 3-12).

Un ejemplo de ello es el estudio descrito por Ali Akbar Mohammadi, *et al.* (Ali Akbar Mohammadi, *et al.*, 2015, *Int J Prev Med.*, 6: 82) donde se analizó y demostró el efecto antioxidante y antiinflamatorio de una cápsula probiótica, administrada como suplemento nutricional a trabajadores de la industria petroquímica a razón de 1 cápsula/día durante 6 semanas. Dicha cápsula estaba compuesta por una mezcla de las especies bacterianas *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum* y *Streptococcus thermophilus*. Los resultados de dicho ensayo permitieron concluir que dicha cápsula probiótica ejercía efectos beneficiosos sobre biomarcadores de estrés oxidativo.

Una cepa particular de *L. casei*, descrita en CN101333505, se ha propuesto también como producto antioxidante.

Por otro lado, las cepas bacterianas *B. longum* CECT7347 y *L. casei* CECT9104 se han descrito en combinación con *B. animalis* subsp. *lactis*, formando parte de una composición probiótica, para su uso en el tratamiento y/o prevención de dermatitis atópica (EP3272396).

Otro ejemplo de composición probiótica que comprende una cepa de *B. animalis* subsp. *lactis* y las cepas *B. longum* CECT7347 y *L. rhamnosus* CECT8361 se ha descrito en el documento EP3222282, donde ésta se propone para su uso en el tratamiento y/o prevención de psoriasis.

Por último, el documento EP3241893 describe una formulación que comprende una cepa de *B. longum* CECT7347 y de *L. rhamnosus* CECT8361 para su uso en el incremento de la fertilidad masculina.

65

En resumen, es deseable disponer de composiciones probióticas alternativas a las existentes con propiedades antioxidantes, capaces de reducir los efectos nocivos que el estrés oxidativo provoca a nivel molecular en el organismo, especialmente tras la realización de un ejercicio físico intenso.

5 Descripción de la invención

La presente invención proporciona una composición probiótica que consiste en las cepas *L. rhamnosus* CECT8361, *L. casei* CECT9104 y *B. longum* CECT7347, junto con vehículos y/o excipientes alimentarios y/o farmacéuticamente aceptables, para su uso como antioxidante. Esta composición es particularmente útil en el tratamiento y/o prevención del daño, a nivel molecular, provocado por el estrés oxidativo durante o tras la realización de un ejercicio físico.

Las cepas *L. rhamnosus* CECT8361, *L. casei* CECT9104 y *B. longum* CECT7347, fueron aisladas de heces de un bebé español de edad inferior a 3 meses con alimentación basada en lactancia materna exclusiva. En todos los casos las cepas fueron aisladas en medio selectivo para lactobacilos y bifidobacterias e identificadas inequívocamente mediante secuenciación del gen del ARNr 16S.

Los ejemplos mostrados más adelante demuestran que la ingesta, preferiblemente diaria y durante seis semanas, de la composición de la invención provoca en humanos un descenso del daño oxidativo a lípidos y ADN generado como consecuencia de la realización de un ejercicio físico de elevada intensidad y duración. En particular, los niveles de malondialdehído sérico y LDL oxidada (representativos del daño oxidativo a lípidos) y de 8-oxo 2'-deoxiguanosina en orina (representativo del daño oxidativo al ADN) se incrementaron en menor medida en sujetos que consumieron la composición de la invención. Se demuestra así que la ingesta de la misma mejora el estatus antioxidante de los sujetos. Por último, dichos ejemplos evidencian que la administración de la composición de la invención es segura, ya que durante el ensayo clínico desarrollado no se apreciaron efectos adversos asociados a su ingesta, ni modificaciones en el hemograma ni en la función hepática y renal de los sujetos sometidos a estudio.

Por ello, un aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante "composición de la invención", que consiste en las bacterias *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium longum*, junto con uno o más vehículos y/o excipientes alimentarios y/o farmacéuticamente aceptables, donde *L. rhamnosus* es la cepa BPL0015 depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT8361, *L. casei* es la cepa BPL0004 depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT9104 y *B. longum* es la cepa IATA-ES1 depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT7347.

La composición de la invención es una composición probiótica. Se entiende por "composición probiótica" aquella composición que comprende, al menos, un microorganismo vivo o partes del mismo que, cuando es ingerido, interacciona con el metabolismo del individuo produciendo un efecto beneficioso en él.

Lactobacillus rhamnosus es una bacteria que se encuentra mayoritariamente en productos fermentados (lácteos y de origen vegetal), así como en leches infantiles. La clasificación científica de *L. rhamnosus* es: Reino: *Bacteria*, Filo: *Firmicutes*, Clase: *Bacilli*, Orden: *Lactobacillales*, Familia: *Lactobacillaceae*, Género: *Lactobacillus*, Especie: *Lactobacillus rhamnosus*.

La cepa *L. rhamnosus* CECT8361 fue aislada a partir de heces de un niño de menos de tres meses de vida, sano y alimentado con lactancia materna exclusiva. Esta cepa fue depositada el 27 de mayo de 2013 bajo el Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo como Autoridad Internacional de Depósito (con sede en el Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, C/ Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia) ESPAÑA). El número de depósito asignado fue CECT 8361. A esta cepa también se hará referencia en la presente invención como BPL0015.

Lactobacillus casei es una bacteria que se encuentra mayoritariamente en productos fermentados (lácteos y de origen vegetal), así como en leches infantiles. La clasificación científica de *L. casei* es: Reino: *Bacteria*, Filo: *Firmicutes*, Clase: *Bacilli*, Orden: *Lactobacillales*, Familia: *Lactobacillaceae*, Género: *Lactobacillus*, Especie: *Lactobacillus casei*.

La cepa *L. casei* CECT9104 fue aislada a partir de heces de un niño de menos de tres meses de vida, sano y alimentado con lactancia materna exclusiva. Esta cepa fue depositada el 25 de febrero de 2016 bajo el Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo como Autoridad Internacional de Depósito (con sede en el Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, C/ Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia) ESPAÑA). El número de depósito asignado fue CECT9104. A esta cepa también se hará referencia en la presente invención como BPL0004.

Bifidobacterium longum es una bacteria Gram positiva, catalasa-negativa, con forma bífida, que se encuentra de manera habitual en el tracto gastrointestinal, donde produce ácido acético y láctico principalmente. La clasificación

científica de *B. longum* es: Reino: *Bacteria*, Filo: *Firmicutes*, Clase: *Actinobacteria*, Orden: *Bifidobacteriales*, Familia: *Bifidobacteriaceae*, Género: *Bifidobacterium*, Especie: *Bifidobacterium longum*.

5 La cepa *B. longum* CECT 7347 fue aislada a partir de heces de un niño sano de menos de tres meses de edad alimentado con lactancia materna exclusiva y depositada el 20 de diciembre de 2007 bajo el Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo como Autoridad Internacional de Depósito (con sede en el Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, C/ Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia) ESPAÑA). El número de depósito asignado fue CECT7347. A esta cepa también se hará referencia en la presente invención como IATA-ES1 o ES1.

10 La composición de la invención además comprende uno o más vehículos y/o excipientes alimentarios y/o farmacéuticamente aceptables. Aunque no forma parte de la presente invención, la composición también puede comprender otro microorganismo, preferiblemente otra bacteria. Esta otra bacteria puede pertenecer tanto a los géneros bacterianos anteriormente descritos (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*), como a otros géneros bacterianos como por ejemplo, pero sin limitarnos, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* o *Veillonella*, entre otros; así como a especies levaduriformes pertenecientes a los géneros *Kluyveromyces*, *Pichia* o *Saccharomyces*, entre otros. La composición también puede comprender uno o más principios activos con efecto antioxidante, como, por ejemplo, pero sin limitarnos, ácidos grasos, glutatión, extractos de plantas (en especial aquellos ricos en polifenoles como antocianinas, carotenos, curcumina, licopeno, luteína, melatonina, resveratrol o zeaxantina), péptidos, selenio, diferentes vitaminas como la A, C o E, entre otros.

25 Aunque no forma parte de la presente invención, las bacterias que derivan de *L. rhamnosus*, *B. longum* y *L. casei* (o de sus correspondientes cepas *L. rhamnosus* BPL0015 CECT8361, *L. casei* BPL0004 CECT9104 y *B. longum* IATA-ES1 CECT7347) se describen en el presente documento y éstas pueden formar parte de la composición probiótica como alternativa a las cepas específicamente indicadas, siempre y cuando conserven la capacidad de prevenir, remitir y/o mejorar los daños provocados por el estrés oxidativo en el organismo. Ejemplos de cepas derivadas de las cepas específicamente indicadas en la invención pueden ser mutantes y organismos modificados genéticamente que presenten variaciones en su genoma respecto al genoma de las cepas descritas en la invención, pero donde dichas variaciones no afectan a la capacidad de las cepas de prevenir, remitir y/o mejorar los daños provocados por el estrés oxidativo en el organismo. Las cepas derivadas de *L. rhamnosus*, *B. longum* y *L. casei* (o de sus correspondientes cepas *L. rhamnosus* BPL0015 CECT8361, *L. casei* BPL0004 CECT9104 y *B. longum* IATA-ES1 CECT7347) pueden producirse de forma natural o de forma intencionada por métodos de mutagénesis conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, pero sin limitarse, el crecimiento de la cepa original en presencia de agentes mutagénicos o causantes de estrés o mediante ingeniería genética dirigida a la mutación deseada. También se contemplan organismos genéticamente modificados derivados de *L. rhamnosus*, *B. longum* y *L. casei* (o de sus correspondientes cepas *L. rhamnosus* BPL0015 CECT8361, *L. casei* BPL0004 CECT9104 y *B. longum* IATA-ES1 CECT7347) que conservan su capacidad de prevenir, remitir y/o mejorar los daños provocados por el estrés oxidativo en el organismo y, por lo tanto, de ser usados en el tratamiento y/o prevención del estrés oxidativo. Un ensayo para comprobar si un microorganismo tiene capacidad de prevenir, remitir y/o mejorar los daños provocados por el estrés oxidativo en el organismo se describe en los ejemplos que acompañan a la presente descripción.

45 Por otro lado, aunque no forma parte de la presente invención, también se describen en el presente documento los componentes celulares, metabolitos y/o las moléculas secretadas por *L. rhamnosus*, *B. longum* y *L. casei* (o sus correspondientes cepas *L. rhamnosus* BPL0015 CECT8361, *L. casei* BPL0004 CECT9104 y *B. longum* IATA-ES1 CECT7347), así como las composiciones que comprenden dichos componentes celulares, metabolitos y/o moléculas secretadas y los usos de los mismos para el tratamiento y/o la prevención del estrés oxidativo. Entre los "componentes celulares" se podrían incluir los componentes de la pared celular (como, por ejemplo, el peptidoglicano), los ácidos nucleicos, los componentes de la membrana u otros como proteínas, lípidos e hidratos de carbono y sus combinaciones (como lipoproteínas, glicolípidos o glicoproteínas). Los "metabolitos" incluyen cualquier molécula producida o modificada por la bacteria como consecuencia de su actividad metabólica, durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos o durante el almacenamiento del producto (composición de la invención). Ejemplos de estos metabolitos son, pero sin limitarse, los ácidos orgánicos e inorgánicos, proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas, lípidos, hidratos de carbono, lipoproteínas, glicolípidos, glicoproteínas, vitaminas, sales, minerales y los ácidos nucleicos. Las "moléculas secretadas" incluyen cualquier molécula secretada o liberada al exterior por la bacteria durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos (por ejemplo, de elaboración de alimentos o fármacos) o durante el almacenamiento del producto. Ejemplos de estas moléculas son, pero sin limitarse, los ácidos orgánicos e inorgánicos, proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas, lípidos, hidratos de carbono, lipoproteínas, glicolípidos, glicoproteínas, vitaminas, sales, minerales y ácidos nucleicos.

60 El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes contenidos en la composición de la invención, es decir, de las cepas de la invención, o que estabiliza dichos componentes y/o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia o de aportar sabores que la hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los componentes unidos (por ejemplo, almidones, azúcares o celulosas), de endulzar, de aportar un colorante, de proteger el principio activo (por ejemplo, para aislarlo del aire y/o la humedad), de completar el contenido de una pastilla, una cápsula o cualquier

otra forma de presentación o de desintegrar para facilitar la disolución de los componentes, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término "excipiente" se define como aquella materia que se añade a los principios activos para posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas y/o determinar las propiedades físico-químicas de la composición y su biodisponibilidad. El excipiente "farmacéuticamente aceptable" debe permitir la actividad de los componentes activos contenidos en la composición, es decir, debe ser compatible con la viabilidad y funcionalidad de las cepas de la invención.

El "vehículo" o "portador" es, preferiblemente, una sustancia inerte. Las funciones del vehículo son facilitar la incorporación de otros componentes o compuestos, permitir una mejor dosificación y/o administración y/o dar consistencia y forma a la composición. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea para diluir cualquiera de los componentes contenidos en la composición de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que, aun sin diluir dichos componentes, es capaz de permitir una mejor dosificación y/o administración y/o dar consistencia y forma a la composición. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitarse, agua, soluciones salinas, alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, almidón, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite perfumante, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos petroetiales, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Además, el excipiente y el vehículo deben ser alimentarios o farmacológicamente aceptables, es decir, deben haber sido evaluados y estar permitidos para que no causen daño al sujeto al que se le administra la composición de la invención. Adicionalmente, el excipiente y/o el vehículo pueden ser naturales, es decir, existir en la naturaleza, o no naturales, aquellos que, si están en la naturaleza, no se encuentran de forma natural en combinación con las bacterias de la invención.

Las bacterias *L. rhamnosus*, *B. longum* y *L. casei*, preferiblemente las cepas *L. rhamnosus* BPL0015 CECT8361, *L. casei* BPL0004 CECT9104 y *B. longum* IATA-ES1 CECT7347, tienen que estar presentes en la composición de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva para que puedan ejercer su efecto de prevenir, remitir y/o mejorar los daños provocados por el estrés oxidativo en el organismo.

En la presente invención se entiende por "cantidad terapéuticamente efectiva" aquella cantidad que, cuando se administra a un sujeto, es suficiente para producir el efecto deseado. Como sabe el experto en la materia, la cantidad terapéuticamente efectiva puede variar en función de, por ejemplo, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del sujeto, al igual que en función del modo y tiempo de administración, o de la velocidad de excreción, entre otros factores. Así, en una realización más preferida de la composición de la invención, *L. rhamnosus* se encuentra en una concentración del 45%, *L. casei* se encuentra en una concentración del 45% y *B. longum* se encuentra en una concentración del 10%, con respecto a la concentración total de bacterias incluidas en la composición.

En otra realización preferida, la cantidad total de bacterias en la composición de la invención es 10⁹ UFC.

La composición de la invención puede estar formulada para su administración farmacéutica, es decir, formando parte de productos farmacológicos que serán administrados al sujeto (por ejemplo, por vía oral, vía tópica, etc.), y/o para su administración alimentaria, es decir, formando parte de los alimentos que son consumidos en la dieta de un sujeto, y/o para su administración como un complemento o suplemento nutricional. Por lo tanto, en otra realización preferida, la composición de la invención es una composición farmacéutica o alimentaria.

Una "composición farmacéutica" o "fármaco" es un conjunto de componentes o compuestos activos que está formado, al menos, por los microorganismos *L. rhamnosus*, *B. longum* y *L. casei*, preferiblemente, *L. rhamnosus* BPL0015 CECT8361, *L. casei* BPL0004 CECT9104 y *B. longum* IATA-ES1 CECT7347, en cualquier concentración, preferiblemente en las indicadas más arriba, y que, adicionalmente, puede comprender uno o más componentes o compuestos que posean alguna actividad biológica y/o farmacológica que, tras su administración a un sujeto, pueden aumentar, reforzar y/o impulsar la actividad de las cepas comprendidas en la composición de la invención. Como entiende el experto en la materia, los componentes o compuestos adicionales deben ser compatibles con las bacterias de la composición de la invención. En el contexto de la presente invención, dentro del término "composición farmacéutica" también se engloban las composiciones veterinarias.

Una "composición alimentaria" o "composición nutricional" se refiere a aquel alimento o suplemento nutricional que afecta beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar al sujeto que lo consume. En la presente invención, dicha composición alimentaria está destinada a prevenir, remitir y/o mejorar los daños provocados por el estrés oxidativo en el organismo. La composición alimentaria a la que se refiere la presente invención incluye, pero sin limitarnos, un alimento, un alimento funcional, un probiótico, o un complemento o suplemento nutricional. En el caso de que la composición de la invención esté formulada como una composición nutricional, dicha composición puede ser un alimento o ir incorporada en un alimento o producto alimenticio destinado a la alimentación animal, preferiblemente humana. La composición alimentaria puede

seleccionarse de entre un alimento (que puede ser, pero sin limitarnos, un alimento para fines nutricionales específicos o un alimento medicinal) y un suplemento nutricional.

5 El término "suplemento" o "complemento", sinónimo de cualquiera de los términos "suplemento dietético", "suplemento nutricional", "suplemento alimentario", "suplemento alimenticio" o "complemento alimenticio", y similares, hace referencia a aquellos productos o preparados cuyo fin es complementar la dieta normal, consistentes en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico beneficioso sobre el individuo. La "sustancia" que tiene un efecto nutricional o fisiológico beneficioso sobre el individuo son los microorganismos *L. rhamnosus* BPL0015 CECT8361, *L. casei* BPL0004 CECT9104 y *B. longum* IATA-ES1
10 CECT7347, que forman parte de la composición de la invención. El complemento alimenticio puede encontrarse en forma simple o combinada y ser comercializado en forma dosificada, es decir, en cápsulas, pastillas, tabletas, píldoras y otras formas similares, bolsitas de polvos, ampollas de líquido y botellas con cuentagotas y otras formas similares de líquidos y polvos que deben tomarse en cantidad unitaria.

15 La composición también puede formar parte de los denominados "alimentos o suplementos nutricionales para grupos especiales", es decir, alimentos o suplementos que satisfacen necesidades nutricionales particulares. En particular, la composición de la invención está preferiblemente destinada a individuos que realizan un ejercicio físico intenso, más preferiblemente de manera regular.

20 Ejemplos de alimentos que pueden comprender la composición de la invención incluyen, pero sin limitarse, piensos, productos lácteos, productos vegetales, productos cárnicos, aperitivos, chocolates, bebidas, alimentos en polvo deshidratados, geles alimentarios, alimentos infantiles, cereales, fritos, bollería industrial y galletas. Ejemplos de productos lácteos incluyen, pero sin limitarse, productos derivados de la leche fermentada (por ejemplo, yogur o queso) o no fermentada (por ejemplo, helado, mantequilla, margarina o suero lácteo). El producto vegetal es, por ejemplo, un cereal en cualquier forma de presentación, fermentado (por ejemplo, producto fermentado en base soja o producto fermentado en base avena) o no fermentado, y un aperitivo. La bebida puede ser leche no fermentada o batidos en formato líquido o polvo para su restitución con agua. El producto alimentario o alimento que comprende la composición de la invención puede seleccionarse del grupo que consiste en: zumos de frutas o vegetales, helados, formulaciones infantiles, leche, yogur, queso, leche fermentada, leche en polvo, cereales, productos de repostería, productos en base de leche, producto cárnico, bebidas y productos dulces en base goma (por ejemplo, gominolas, con o sin azúcares añadidos).
25
30

En otra realización preferida, la composición de la invención está formulada para su administración oral.

35 Aunque no forma parte de la presente invención, la composición descrita en el presente documento puede ser administrada a un sujeto a través de la dieta.

La forma de presentación de la composición de la invención se adaptará al tipo de administración utilizada. Por ello, la composición puede estar formulada en forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes o bajo cualquier otra forma de administración clínicamente permitida. Teniendo en cuenta que la forma de administración preferida es oral, en una realización preferida, la composición de la invención se presenta en forma sólida, para administración oral. Aunque no forma parte de la presente invención, también se puede utilizar formas de presentación semisólidas o líquidas. Ejemplos de formulaciones sólidas son comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos o granulados, partículas o comprimidos recubiertos, supositorios, tabletas, pastillas, geles, películas dispersables o microesferas. Más preferiblemente, la composición de la invención se presenta en forma de cápsula.
40
45

Alternativamente, pueden usarse sistemas para administrar de forma sostenida la composición de la invención, incluyendo, por ejemplo, su encapsulación en liposomas, las microburbujas, las micropartículas o las microcápsulas y similares. Las formas de liberación sostenida adecuadas, así como los materiales y métodos para su preparación, son ampliamente conocidos en el estado de la técnica. Así, la forma administrable por vía oral de la composición de la invención podría ser una forma de liberación sostenida que comprende adicionalmente un recubrimiento o matriz. El recubrimiento o matriz de liberación sostenida incluye, pero sin limitación, proteínas, polímeros naturales, semisintéticos o sintéticos, insolubles en agua o modificados, ceras, grasas, alcoholes grasos, ácidos grasos, plastificantes naturales semisintéticos o sintéticos, o una combinación de dos o más de todos los anteriores. Los recubrimientos entéricos pueden aplicarse usando procesos convencionales conocidos por los especialistas en la técnica.
50
55

Otro aspecto de la invención se refiere a la composición de la invención para su uso como medicamento.

60 El término "medicina" o "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para la prevención, alivio, tratamiento, reducción o curación de enfermedades o condiciones clínicas en los animales, preferiblemente el hombre. En el contexto de la presente invención, la enfermedad o condición clínica es la presencia de estrés oxidativo en el organismo o el daño molecular, preferiblemente a lípidos y ADN, provocado por el estrés oxidativo.
65

Otro aspecto de la invención se refiere a la composición de la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención del estrés oxidativo en un sujeto. Aunque no forma parte de la presente invención, la composición descrita en el presente documento puede ser utilizada en el tratamiento y/o prevención del daño molecular, preferiblemente sobre lípidos y ADN, provocado por el estrés oxidativo en un sujeto. En una realización preferida de la invención, el estrés oxidativo es provocado por la realización de una actividad física o ejercicio físico.

El "estrés oxidativo" es aquella condición causada por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y/o peróxidos y la capacidad del organismo de reparar el daño resultante. Desbalances en este estado celular normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN. En el ser humano, el estrés oxidativo, y por ende las denominadas especies reactivas del oxígeno (ROS), participan en los mecanismos etiopatogénicos primarios o en sus consecuencias en más de cien enfermedades de gran importancia clínica y social, como la aterosclerosis, la enfermedad de Parkinson, encefalopatía miálgica, sensibilidad química múltiple, periodontitis, varicocele y la enfermedad de Alzheimer y también puede ser importante en el envejecimiento.

El estrés oxidativo está causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad del sistema biológico implicado para restaurar los reactivos intermedios y/o reparar el daño resultante. Los efectos del estrés oxidativo dependen de la magnitud de los cambios ocurridos, y de si la célula es capaz de superar las pequeñas perturbaciones y recuperar su estado original. Una oxidación moderada puede desencadenar apoptosis, mientras que un estrés oxidativo severo puede causar necrosis e incluso la muerte celular. Un aspecto particularmente destructivo del estrés oxidativo es la producción de ROS, que incluyen los radicales libres y los peróxidos. La mayoría de estas ROS se producen en un nivel bajo en condiciones normales de metabolismo aeróbico y el daño que causan a las células es reparado constantemente. Sin embargo, bajo los graves niveles de estrés oxidativo que causa la necrosis, el daño produce agotamiento de ATP impidiendo la muerte celular por apoptosis controlada, provocando que la célula muera liberando al medio numerosos compuestos citotóxicos.

Tal y como se utiliza en la presente invención el término "ejercicio físico" o "actividad física" se refiere a cualquier movimiento corporal producido por los músculos esqueléticos que exija gasto de energía y que además consista en una actividad física planificada, estructurada, repetitiva y realizada con un objetivo relacionado con la mejora o el mantenimiento de uno o más componentes de la aptitud física, por ejemplo, el deporte. Dentro de este término se incluye el ejercicio físico profesional, así como el recreativo o de ocio. Por otro lado, los quehaceres diarios (trabajo, cuidado y mantenimiento del hogar, cuidado de la familia, etc.) en muchas ocasiones comportan un gasto energético comparable con el realizado tras un ejercicio físico dirigido. Por ello, dichos quehaceres también se incluyen dentro del término "actividad física" empleado en la presente invención. Se incluye, así, dentro de este término el desgaste físico intenso propiciado por quehaceres diarios de alta intensidad (trabajos con alto desgaste físico, cuidado del hogar y de la familia, etc.). El ejercicio físico o actividad física al que se refiere la presente invención puede ser aeróbico o anaeróbico, preferiblemente aeróbico.

El ejercicio físico o actividad física a la que se refiere la presente invención es un ejercicio físico intenso, es decir, de elevada intensidad y duración (preferiblemente de al menos 30 minutos, más preferiblemente de al menos 60 minutos; o > 6 MET). La intensidad refleja la velocidad a la que se realiza la actividad, o la magnitud del esfuerzo requerido para realizar dicho ejercicio o actividad. La intensidad de diferentes formas de actividad física varía de una persona a otra. La intensidad de la actividad física depende de lo ejercitado que esté cada uno y de su forma física. Para expresar la actividad física, se utilizan los MET. Los MET son la razón entre el metabolismo de una persona durante la realización de un trabajo y su metabolismo basal (1 MET = el costo energético de estar sentado tranquilamente y es equivalente a un consumo de 1 kcal/kg/h). Se calcula que, en comparación con esta situación, el consumo calórico es unas 3 a 6 veces mayor (3-6 METs) cuando se realiza una actividad de intensidad moderada y más de 6 veces mayor (> 6 METs) cuando se realiza una actividad vigorosa.

Aunque no forma parte de la presente invención, la composición descrita en el presente documento se puede administrar antes, durante o después de la realización del ejercicio físico, preferiblemente antes o durante, más preferiblemente antes.

En una realización preferida, la composición de la invención se administra una vez al día, preferiblemente en el desayuno. En otra realización preferida, la composición de la invención se administra durante 6 semanas.

Aunque no forma parte de la presente invención, la composición descrita en el presente documento es para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades o condiciones clínicas relacionadas con o asociadas al estrés oxidativo, tales como, por ejemplo, pero sin limitarnos, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, aterosclerosis y diabetes.

Se entiende por "prevención" evitar que se produzca el daño molecular, preferiblemente a lípidos y ADN, asociado al estrés oxidativo en un individuo, en particular, cuando dicho individuo tiene predisposición a ello, por ejemplo, porque realiza habitualmente ejercicio físico intenso.

El término "tratar" o "tratamiento" comprende inhibir o remitir el daño molecular, preferiblemente a lípidos y ADN, asociado al estrés oxidativo.

5 Aunque no forma parte de la presente invención, la presente descripción también se refiere al uso de la composición de la invención como antioxidante. Este uso se refiere, preferiblemente, a un uso no terapéutico, es decir, a un uso cosmético, más preferiblemente para el tratamiento y/o prevención del envejecimiento en un sujeto.

10 El término "sujeto", "individuo" u "organismo", tal y como se usa en la presente invención, se refiere a cualquier animal, preferiblemente sano, perteneciente a cualquier especie, preferiblemente mamíferos, más preferiblemente humanos. Ejemplos de sujetos incluyen, sin limitarse, animales de interés comercial tales como aves (gallinas, avestruces, pollos, ocas, perdices, etc.), conejos, liebres, animales domésticos (perros, gatos, etc.), ganado ovino, ganado caprino (cabras, etc.), ganado porcino (jabalíes, cerdos, etc.), ganado equino (caballos, ponis, etc.), ganado vacuno o bovino (toros, vacas, bueyes, etc.), animales de interés cinegético, tales como ciervos, venados, renos, etc.; y los seres humanos.

15 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20 Descripción de las figuras

Fig. 1. Malondialdehído sérico para cada uno de los grupos (placebo y probiótico), para cada uno de los test y en los instantes inicial y final de cada test. *p<0,05 Comparación entre el instante inicial y final para cada una de las pruebas.

25 **Fig. 2. Incremento del malondialdehído sérico durante la realización de los test de ejercicio para cada uno de los grupos (placebo y probiótico). *p<0,05 Comparación entre pruebas.**

30 **Fig. 3. LDL oxidada sérica para cada uno de los grupos (placebo y probiótico), para cada uno de los test y en los instantes inicial y final de cada test. *p<0,05 Comparación entre el instante inicial y final para cada una de las pruebas.**

Fig. 4. Incremento de LDL oxidada sérica durante la realización de los test de ejercicio para cada uno de los grupos (placebo y probiótico). *p<0,05 Comparación entre pruebas.

35 **Fig. 5. 8-oxo 2'-deoxiguanosina en orina de 24 horas (pg/ml) para cada uno de los grupos (placebo y probiótico), para cada uno de los test y en los instantes inicial y final de cada test. *p<0,05 Comparación entre el instante inicial y final para cada una de las pruebas.**

40 **Fig. 6. Incremento de la 8-oxo 2'-deoxiguanosina en orina de 24 horas (pg/ml) durante la realización de los test de ejercicio para cada uno de los grupos (placebo y probiótico). *p<0,05 Comparación entre pruebas.**

Ejemplos

45 A continuación, se ilustrará la invención mediante un ensayo clínico nutricional realizado por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad de la composición de la invención en la reducción del daño molecular provocado por el estrés oxidativo durante la realización de un ejercicio físico de elevada intensidad y duración.

50 Ejemplo 1. Ensayo clínico para determinar la eficacia de la composición de la invención, frente a placebo, en la disminución del estrés oxidativo durante la realización de un ejercicio físico de elevada intensidad y duración, así como para determinar la tolerancia y seguridad de dicha composición.

1.1. Diseño del estudio

55 Se realizó un ensayo clínico aleatorizado, controlado con placebo, con dos ramas paralelas a estudio en función del producto consumido (experimental o placebo), doble ciego y unicéntrico, diseñado con el objetivo de evaluar el efecto del producto sobre la reducción del estrés oxidativo generado por un ejercicio de elevada intensidad y duración.

60 Los sujetos seleccionados fueron individuos sanos, varones, con edades comprendidas entre 18 y 45 años, de raza caucásica, seleccionados de la población general, que realizaban ejercicio físico aeróbico entre 2 y 4 veces a la semana. Se excluyeron del estudio aquellos sujetos con antecedentes de cualquier enfermedad crónica, especialmente las enfermedades del aparato digestivo, que hayan padecido cirugía abdominal en los tres meses anteriores al estudio, con antecedentes de asma bronquial o enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de las vías respiratorias reactivas como el asma bronquial, bradicardia sinusal, segundo o tercer grado de bloqueo auriculoventricular, insuficiencia cardíaca manifiesta o shock cardiogénico, antecedentes de hipersensibilidad alérgica o mala tolerancia a cualquier componente de los productos en estudio, participación en otro ensayo clínico en los tres

meses anteriores al estudio, sujetos diagnosticados y/o en tratamiento por hipertensión arterial, sujetos fumadores (>10 cigarrillos al día), sujetos con índice de masa corporal mayor de 35 Kg/m² (IMC>30), sujetos con antecedentes de abuso farmacológico, alcohólico o de otras sustancias u otros factores que limiten su capacidad de cooperar durante el estudio.

5 Como control, se seleccionó un placebo de idénticas características organolépticas, y del mismo aspecto que el producto en investigación.

Las características del producto a estudio fueron las siguientes:

- 10 - Forma farmacéutica: cápsulas, tanto el producto en investigación como el placebo.
- Contenido: en ningún caso los excipientes modificaron ni la farmacocinética ni la farmacodinámica de los principios activos, únicamente se añadieron por motivos tecnológicos.
- Vía de administración: oral
15 - Posología: 1 cápsula/día.
-Tiempo de consumo: 6 semanas.

La composición de la invención consistía en una mezcla de:

- *L. rhamnosus* BPL0015 (CECT8361) (45%)
20 - *L. casei* BPL0004 (CECT9104) (45%), y
- *B. longum* IATA-ES1 (CECT7347) (10%)

El producto final contenía 10⁹ UFC/cápsula.

25 1.2. Desarrollo del estudio

Para poder demostrar los objetivos propuestos se sometió a los individuos a un modelo de estrés oxidativo consistente en la realización de una actividad física de alta intensidad y duración (90 minutos). De esta forma se incrementó el estrés oxidativo de los individuos del estudio y se pudo observar la eficacia del producto (composición de la invención) frente a placebo, en la mejora del estado oxidativo de los sujetos. El modelo oxidativo propuesto consistió en una prueba preliminar y dos pruebas de esfuerzo no maximales de intensidad elevada y constante, que en adelante serán denominadas como test 1 y test 2. A continuación, se describe cada una de ellas.

- Prueba preliminar: el objetivo de esta prueba fue poder calcular de manera individualizada la intensidad a la cual los sujetos (ciclistas) debían realizar la actividad física posterior, es decir los test 1 y 2. Durante el desarrollo de esta prueba los sujetos no ingirieron ninguno de los productos en estudio (probiótico o placebo). Esta prueba se realizó en un rodillo de bicicleta con resistencia electromagnética (Technogym Spin Trainer) sobre el cual se coloca la bicicleta con una carga de inicio que simula una velocidad de 12 km/h e incrementos de carga de 2 Km/h cada minuto, manteniendo una pendiente constante del 2%. Los ciclistas emplearon desarrollo libre. Para poder calcular la intensidad de la actividad física posterior, se realizó monitorización ergoespirométrica y electrocardiográfica a los sujetos. De esta manera, previamente, el sujeto fue preparado para el análisis de los gases respiratorios (respiración a respiración, circuito abierto, analizador de gases marca Jaeger Oxicom Pro) durante el desarrollo de la prueba. La variable principal evaluada durante la realización de esta prueba fue el consumo máximo/pico de oxígeno absoluto y relativo (VO₂ max) que es el máximo volumen de oxígeno medido en ml/min o ml/Kg x min detectado en la prueba o valor máximo de dicha variable a partir del cual no se produce incremento del mismo, aunque se incremente la intensidad del esfuerzo. A continuación, tras 7 días de periodo de lavado para el estrés oxidativo generado en la prueba preliminar, se desarrolló la siguiente prueba.

- 1ª prueba de actividad física (test 1): 1 semana después de realizar la primera prueba, los sujetos a estudio realizaron la siguiente, que consistió en una actividad física de elevada intensidad por un tiempo de 90 minutos. El deportista realizó el test de esfuerzo de intensidad constante en rodillo de bicicleta con resistencia electromagnética sobre el cual se colocó la bicicleta del sujeto. La carga máxima mantenida equivalía a una frecuencia cardiaca correspondiente al 75% de su consumo máximo de oxígeno calculado en la prueba preliminar y se mantuvo una pendiente constante del 2%. El objetivo de esta prueba era provocar en el sujeto un elevado estrés oxidativo, y así poder evaluar el efecto antioxidante del producto en investigación y el placebo. Durante la prueba, los individuos a estudio no consumieron ninguno de los productos, sólo agua *ad libitum*. Cuando los sujetos realizaron el test 1 comenzó el periodo de 6 semanas de consumo del producto (probiótico o placebo).

- 2ª prueba de actividad física (test 2): después de 6 semanas de consumo del producto, los sujetos a estudio realizaron esta prueba, que consistió en la misma actividad física de elevada intensidad que se realizó en el test 1.

Antes y después de realizar los test 1 y 2, los individuos se sometieron a la extracción de sangre y a una recolección de orina de 24 horas. La toma de muestras de sangre se llevó a cabo media hora antes de que los sujetos realizaran

tanto el test 1 como el test 2 y media hora después de los mismos. De la misma forma, el día anterior y posterior a la realización de cada uno de los test, se realizó recolección de orina de 24 horas. Después de la contabilización del volumen total de orina excretado durante las 24 horas se extrajo una muestra de 9 ml y se congeló a -80° C en tres crioviales distintos hasta su análisis posterior.

5

1.3. Variables analizadas en el estudio

Todas las variables se analizaron en situación basal y tras 6 semanas de consumo ininterrumpido del producto.

10 1.3.1. Variables de daño oxidativo generado por un ejercicio de elevada intensidad y duración.

Tanto el ejercicio físico aeróbico, como anaeróbico, provocan un incremento en la producción de diferentes radicales libres. Cierta nivel de estos compuestos oxidantes ejerce efectos positivos sobre las funciones inmunitarias del organismo, sobre el recambio tisular y la resistencia celular, e incluso sobre la propia contracción muscular y adaptación al ejercicio sistemático. Sin embargo, el ejercicio físico puede desencadenar un desequilibrio entre la producción de los radicales libres y los mecanismos de defensa antioxidantes del organismo, provocando diferentes daños moleculares, evidentes a través de diferentes marcadores biológicos de daño molecular sobre los lípidos, proteínas y ADN. En este estudio, los sujetos fueron sometidos a una fuente de estrés oxidativo (test 1 y test 2) para poder evaluar el efecto antioxidante del probiótico frente a placebo, es decir, la capacidad de frenar el daño oxidativo provocado por un ejercicio de elevada intensidad y duración que pueda superar las defensas antioxidantes.

Daño oxidativo a los lípidos

25 - Análisis del malondialdehído sérico. El análisis de malondialdehído sérico se realizó mediante el uso de MDAoxLDL ELISA (MDA (Malonildialdehyde) ELISA KIT ELABSCIENCE Houston, Texas (USA)). Esta determinación se realizó en el suero obtenido de las extracciones sanguíneas realizadas media hora antes y después de cada uno de los test de esfuerzo realizados.

30 - Análisis de LDL oxidada. Cuantificación en suero de LDL en su forma oxidada, mediante el uso de MDA-oxLDL ELISA (Human OxLDL (Oxidized Low Density Lipoprotein) ELISA KIT ELABSCIENCE Houston, Texas (USA)). Esta determinación se realizó en el suero obtenido de las extracciones sanguíneas realizadas media hora antes y después de cada uno de los test de esfuerzo realizados.

35 Daño oxidativo al ADN

Análisis de 8-oxo 2'-deoxiguanosina en orina de 24 horas. El análisis de 8-oxo 2'-deoxiguanosina en orina de 24 horas se realizó mediante el uso de ADN/ARN Oxidative Damage EIA Kit (8OHdG (8-Hydroxideoxyguanosine) ELISA KIT ELABSCIENCE Houston, Texas (USA)). Esta determinación se realizó en las muestras obtenidas en la orina de 24 horas recolectada antes y después de cada uno de los test de esfuerzo realizados.

40

1.3.2. Variables de seguridad.

45 Se realizó un análisis de bioquímica sanguínea donde se determinarán los valores de las enzimas GOT, GPT, GGT, LDH y de bilirrubina para la valoración de la función hepática, y biomoléculas tales como urea y creatinina para la valoración de la función renal. Así mismo se realizó un hemograma para valorar la serie roja, blanca y plaquetas. La obtención de la muestra sanguínea se realizó en dos ocasiones a lo largo del estudio, en situación basal y final.

Se realizó además un registro y evaluación de los acontecimientos adversos.

50 1.4. Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo (media y desviación estándar) de todas las variables en estudio, tanto de las condiciones basales de cada una de ellas como de su evolución. Este análisis se realizó para el grupo total de individuos que participaron en el estudio.

55

La homogeneidad de la población en el estado basal con respecto a variables demográficas, antecedentes médicos y otros parámetros clínicos también fue analizada. Para las variables cuantitativas se desarrollaron comparaciones de t-Student entre las dos ramas del estudio. Las variables cualitativas fueron analizadas mediante test de homogeneidad basados en la distribución Chi-cuadrado cuando los valores esperados lo hicieron posible y mediante test exactos de Fisher en caso contrario.

60

Para analizar las diferencias entre los grupos (experimental y control) en la evolución de las distintas variables se realizó un análisis de varianza para medidas repetidas con dos factores intrasujeto (Prueba: antes del consumo y después de 8 semanas del consumo y tiempo: antes y después de cada test) y un factor intersujeto (producto: producto experimental y producto placebo). De esta manera se establecieron diferencias en cada una de las variables

65

analizadas, atendiendo a estos factores. Para el análisis post-hoc se realizó test de Tukey o de Bonferroni. Se realizaron las comparaciones para aquellos efectos significativos con la opción de asumir o no igualdad de varianzas.

5 En el conjunto de pruebas estadísticas el nivel de significación utilizado fue de 0,05. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software informático SPSS 21.0.

1.5. Resultados

10 Iniciaron el estudio 45 sujetos, de los que 1 fue excluido antes de la realización del primer test. Los 44 sujetos restantes fueron aleatorizados en los dos grupos a estudio. Durante el estudio se perdió en el seguimiento 1 sujeto en el grupo placebo por no acudir a las visitas. Por tanto, se realizó el análisis de 43 sujetos: 22 consumieron el producto probiótico y 21 consumieron el producto placebo.

15 Atendiendo al grupo que consumió el producto probiótico, su edad media era de $25,3 \pm 7,2$ años, mientras que en el grupo placebo, la edad media era de $27,1 \pm 8,4$ años.

1.5.1. Análisis del malondialdehído sérico.

20 Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 1. Estadísticos de los niveles de malondialdehído en suero (ng/ml) (media, error típico, diferencia de medias, P1 nivel de significación para la diferencia entre los niveles antes y después de cada test y P2 nivel de significación para la diferencia en el incremento de los niveles para el placebo y probiótico).

			Media	E. T.	Dif. Med.	P1	P2
Placebo	Prueba 1	Antes	347,4	84,8	143,7	,094	,975
		Después	491,1	145,3			
	Prueba 2	Antes	312,9	64,3	141,5	,149	
		Después	454,4	113,3			
Probiótico	Prueba 1	Antes	433,2	82,9	254,2	,003	,005
		Después	687,4	142,0			
	Prueba 2	Antes	358,0	62,9	46,6	,623	
		Después	404,6	110,7			

25 Al realizar el análisis comparativo se obtuvo lo siguiente:

30 - Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se aprecian diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial, por lo que se puede afirmar que los grupos eran homogéneos para esta variable en el instante inicial de cada uno de los test.

35 - Grupo placebo. Durante la realización del primer test se aprecia un incremento no significativo ($P < 0,094$) de los niveles de malondialdehído sérico secundario al daño generado por el ejercicio físico de elevada duración en intensidad. Al realizar el segundo test, posterior a la ingesta del producto placebo, el ejercicio físico produjo el mismo incremento en los niveles de este parámetro que en el test 1 ($p < 0,149$). Por tanto, no se puede afirmar que el consumo del placebo haya modificado el comportamiento de esta variable durante la realización de las pruebas físicas (Fig. 1).

40 - Grupo experimental. Se aprecia un incremento significativo ($P < 0,001$) de los niveles de malondialdehído sérico durante la realización del primer test. Al realizar el segundo test, posterior a la ingesta del producto probiótico, el ejercicio físico produjo un incremento mucho menor de este parámetro que en el test 1 ($p < 0,623$). Al comparar los cambios en este parámetro en el test 1 con los obtenidos en el test 2 se apreciaron diferencias significativas ($p < 0,005$), es decir en el segundo test, los sujetos que consumieron el producto probiótico presentaron un menor incremento de malondialdehído que durante la realización del primer test (Fig. 1). Por tanto, se puede afirmar que el consumo del producto probiótico modificó el comportamiento de esta variable durante la realización de las pruebas físicas.

45 Al comparar la evolución entre ambos grupos (Fig. 2), se observaron diferencias significativas ($p = 0,047$), es decir, se puede afirmar que el comportamiento de ambos productos es distinto, por lo que se puede concluir que la ingesta del producto probiótico durante 6 semanas produce mejoras significativas con respecto al placebo para esta variable.

50 1.5.2. Análisis de LDL oxidada.

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

55 Tabla 2. Estadísticos de los niveles de LDL oxidada en suero (ng/ml) (media, error típico, diferencia de medias, P1 nivel de significación para la diferencia entre los niveles antes y después de cada test y P2 nivel de significación para la diferencia en el incremento de los niveles para el placebo y probiótico).

			Media	E. T.	Dif. Med.	P1	P2
Placebo	Prueba 1	Antes	740,3	61,5	159,3	,000	,536
		Después	899,6	64,1			
	Prueba 2	Antes	777,8	69,2	196,6	,001	
		Después	974,4	78,9			
Probiótico	Prueba 1	Antes	646,2	60,1	162,8	,000	,042
		Después	809,0	62,6			
	Prueba 2	Antes	772,9	67,6	40,4	,467	
		Después	813,3	77,1			

Al realizar el análisis comparativo se obtuvo lo siguiente:

5 - Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se apreciaron diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial, por lo que se puede afirmar que los grupos eran homogéneos para esta variable en el instante inicial de cada uno de los test.

10 - Grupo placebo. Durante la realización del primer test se apreció un incremento significativo ($P < 0,001$) de los niveles de LDL oxidada sérica secundario al daño generado por el ejercicio físico de elevada duración en intensidad. Al realizar el segundo test, posterior a la ingesta del producto placebo, el ejercicio físico produjo el mismo incremento en los niveles de este parámetro que en el test 1 ($p < 0,001$) (Fig. 3). Por tanto, no se puede afirmar que el consumo del placebo haya modificado el comportamiento de esta variable durante la realización de las pruebas físicas.

15 - Grupo experimental. Se apreció un incremento significativo ($P < 0,001$) de los niveles de LDL oxidada sérica durante la realización del primer test. Al realizar el segundo test, posterior a la ingesta del producto probiótico, el ejercicio físico produjo un incremento mucho menor de este parámetro que en el test 1 ($p < 0,467$) (Fig. 3). Al comparar los cambios en este parámetro en el test 1 con los obtenidos en el test 2 se apreciaron diferencias significativas ($p < 0,042$), es decir, en el segundo test, los sujetos que consumieron el producto probiótico presentaron menor incremento de LDL oxidada que durante la realización del primer test. Por tanto, se puede afirmar que el consumo del producto probiótico modificó el comportamiento de esta variable durante la realización de las pruebas físicas.

25 Al comparar la evolución entre ambos grupos (Fig. 4), se observaron diferencias significativas ($p = 0,05$), es decir, se puede afirmar que el comportamiento de ambos productos es distinto, por lo que se puede concluir que la ingesta del producto probiótico durante 6 semanas produce mejoras significativas con respecto al placebo para esta variable.

1.5.3. Análisis de 8-oxo 2'-deoxiguanosina en orina de 24 horas.

Los estadísticos descriptivos se exponen en la siguiente tabla:

30 Tabla 3. Estadísticos de los niveles de 8-oxo 2'-deoxiguanosina en orina de 24 horas (pg/ml) (media, error típico, diferencia de medias, P1 nivel de significación para la diferencia entre los niveles antes y después de cada test y P2 nivel de significación para la diferencia en el incremento de los niveles para el placebo y probiótico).

			Media	E. T.	Dif. Med.	P1	P2
Placebo	Prueba 1	Antes	10,7	2,0	12,4	,000	,620
		Después	23,1	3,8			
	Prueba 2	Antes	11,8	2,4	11,5	,000	
		Después	23,4	3,3			
Probiótico	Prueba 1	Antes	13,3	2,0	15,7	,000	,000
		Después	29,0	3,7			
	Prueba 2	Antes	13,6	2,4	4,8	,007	
		Después	18,4	3,2			

35 Al realizar el análisis comparativo se obtuvo lo siguiente:

40 - Comparación de los valores de la variable en el estado inicial. No se apreciaron diferencias significativas al comparar los valores de esta variable en el instante inicial, por lo que se puede afirmar que los grupos eran homogéneos para esta variable en el instante inicial de cada uno de los test.

45 - Grupo placebo. Durante la realización del primer test se apreció un incremento significativo ($p < 0,001$) de los niveles de 8-oxo 2'-deoxiguanosina en orina de 24 horas secundario al daño generado por el ejercicio físico de elevada duración en intensidad. Al realizar el segundo test, posterior a la ingesta del producto placebo, el ejercicio físico produjo el mismo incremento en los niveles de este parámetro que en el test 1 ($p < 0,001$) (Fig. 5). Por tanto, no se puede

afirmar que el consumo del placebo haya modificado el comportamiento de esta variable durante la realización de las pruebas físicas.

5 - Grupo experimental. Se apreció un incremento significativo (15,7 pg/ml; $p < 0,001$) de los niveles de 8-oxo 2'-
 deoxiguanosina en orina de 24 horas durante la realización del primer test. Al realizar el segundo test, posterior a la
 ingesta del producto probiótico, el ejercicio físico produjo un incremento mucho menor de este parámetro que en el
 test 1 aunque también significativo (4,8 pg/ml; $p < 0,007$) (Fig. 5). Al comparar los cambios en este parámetro en el test
 1 con los obtenidos en el test 2 se apreciaron diferencias significativas ($p < 0,001$), es decir, en el segundo test los
 10 sujetos que consumieron el producto probiótico presentaron un menor incremento de 8-oxo 2'-deoxiguanosina en
 orina de 24 horas que durante la realización del primer test (Fig. 5). Por tanto, podemos afirmar que el consumo del
 producto probiótico modificó el comportamiento de esta variable durante la realización de las pruebas físicas.

Al comparar la evolución entre ambos grupos (Fig. 6), se observaron diferencias significativas ($p = 0,001$), es decir, se
 puede afirmar que el comportamiento de ambos productos es distinto, por lo que se puede concluir que la ingesta del
 15 producto probiótico durante 6 semanas produce mejoras significativas con respecto al placebo para esta variable.

En conclusión, la ingesta del producto probiótico de la invención durante 6 semanas disminuyó el daño oxidativo a
 lípidos y ADN generado por un ejercicio físico de elevada intensidad y duración.

20 El ejercicio de elevada intensidad y duración genera un daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN. Este puede ser
 evidenciado al analizar distintos metabolitos: el daño oxidativo a lípidos ocasiona un incremento de la malondialdehído
 sérica e incremento del colesterol-LDL oxidado sérico, y el daño oxidativo al ADN ocasiona un incremento de los
 niveles de 8-oxo 2'-deoxiguanosina en orina. La ingesta del probiótico disminuyó el incremento de malondialdehído
 sérico, col-LDL oxidado sérico y 8-oxo 2'-desoxiguanosina en orina de 24 horas. Es decir, tras la ingesta del probiótico
 25 se apreció una disminución del daño oxidativo a lípidos y ADN generado por un ejercicio físico de elevada intensidad
 y duración; este ejercicio ha demostrado previamente generar daño oxidativo a lípidos y ADN.

1.5.4. Variables de seguridad.

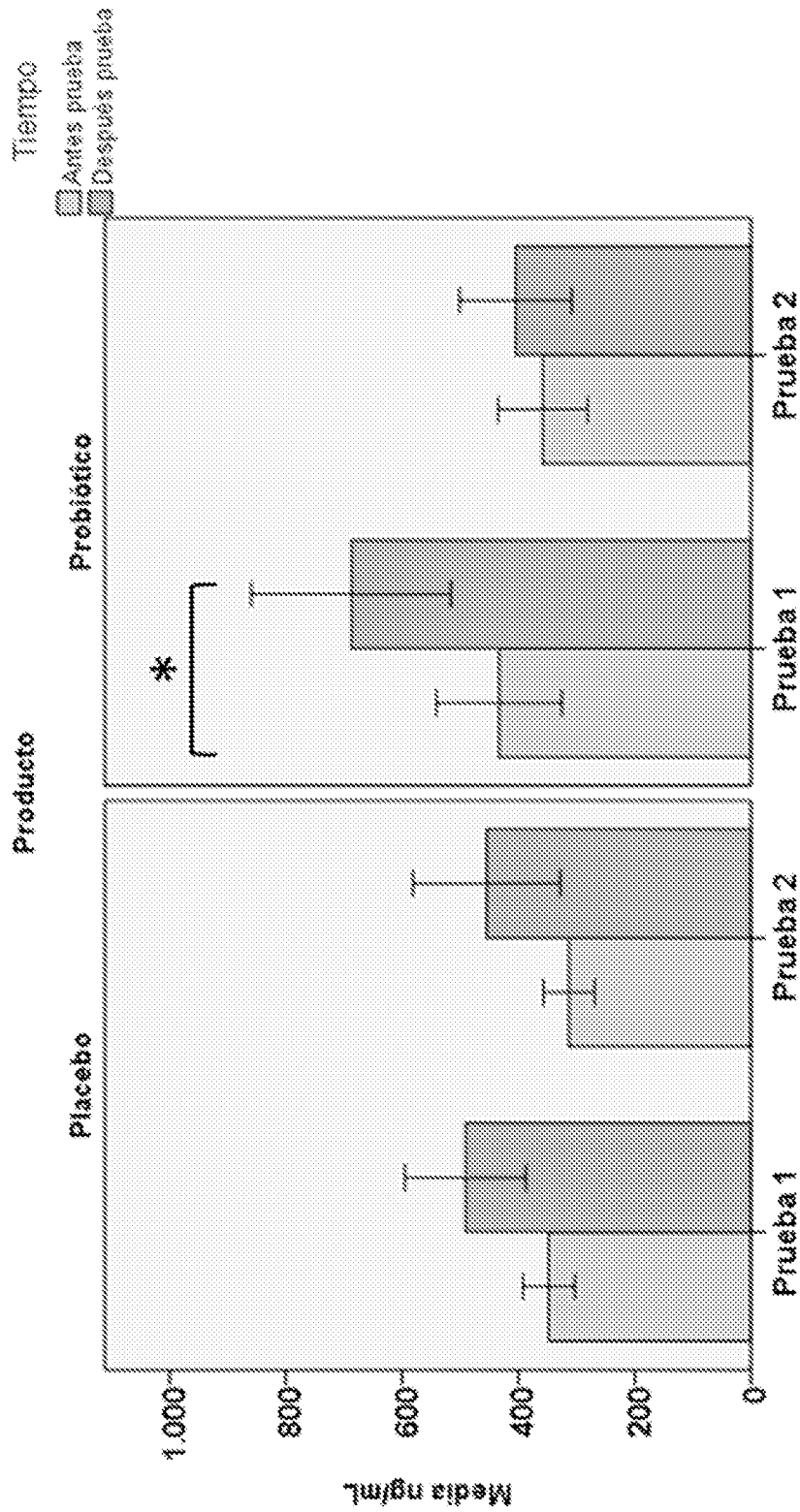
30 No se evidenciaron acontecimientos adversos relacionados con la ingesta del probiótico de la invención en ninguno
 de los sujetos del estudio. Tampoco se evidenciaron modificaciones en el hemograma, ni en la función hepática ni
 renal de los sujetos evaluados. Por tanto, la ingesta de la composición de la invención es segura.

En conclusión, el consumo diario del probiótico de la invención durante 6 semanas:

35 - Disminuyó el daño oxidativo a lípidos y al ADN generado por un ejercicio físico de elevada intensidad y duración.
 - Mejoró el estatus antioxidante de los sujetos.
 - No mostró acontecimientos adversos relacionados con su ingesta en ninguno de los sujetos del estudio, ni
 40 modificaciones en la función hepática ni renal de los sujetos evaluados, por lo que se puede concluir que es seguro.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que consiste en las bacterias *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium longum*, junto con uno o más vehículos y/o excipientes alimentarios y/o farmacéuticamente aceptables, donde *L. rhamnosus* es la cepa BPL0015 depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT8361, *L. casei* es la cepa BPL0004 depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT9104 y *B. longum* es la cepa IATA-ES1 depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT7347.
- 10 2. La composición según la reivindicación 1, donde *L. rhamnosus* se encuentra en una concentración del 45%, *L. casei* se encuentra en una concentración del 45% y *B. longum* se encuentra en una concentración del 10%, con respecto a la concentración total de bacterias incluidas en la composición.
- 15 3. La composición según la reivindicación 1 o 2, donde la cantidad total de bacterias en dicha composición es 10⁹ UFC.
- 20 4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha composición es una composición farmacéutica o alimentaria.
- 25 5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, formulada para su administración oral.
- 30 6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicha composición se presenta en forma sólida.
- 35 7. La composición según la reivindicación 6, donde dicha composición se presenta en forma de cápsula.
- 40 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso como medicamento.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento y/o prevención del estrés oxidativo en un sujeto.
10. Composición para su uso según la reivindicación 9, donde el estrés oxidativo es provocado por la realización de una actividad física.
11. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde dicha composición se administra una vez al día.
12. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde dicha composición se administra durante 6 semanas.



Barra de error: $\pm 1 ET$

Fig. 1

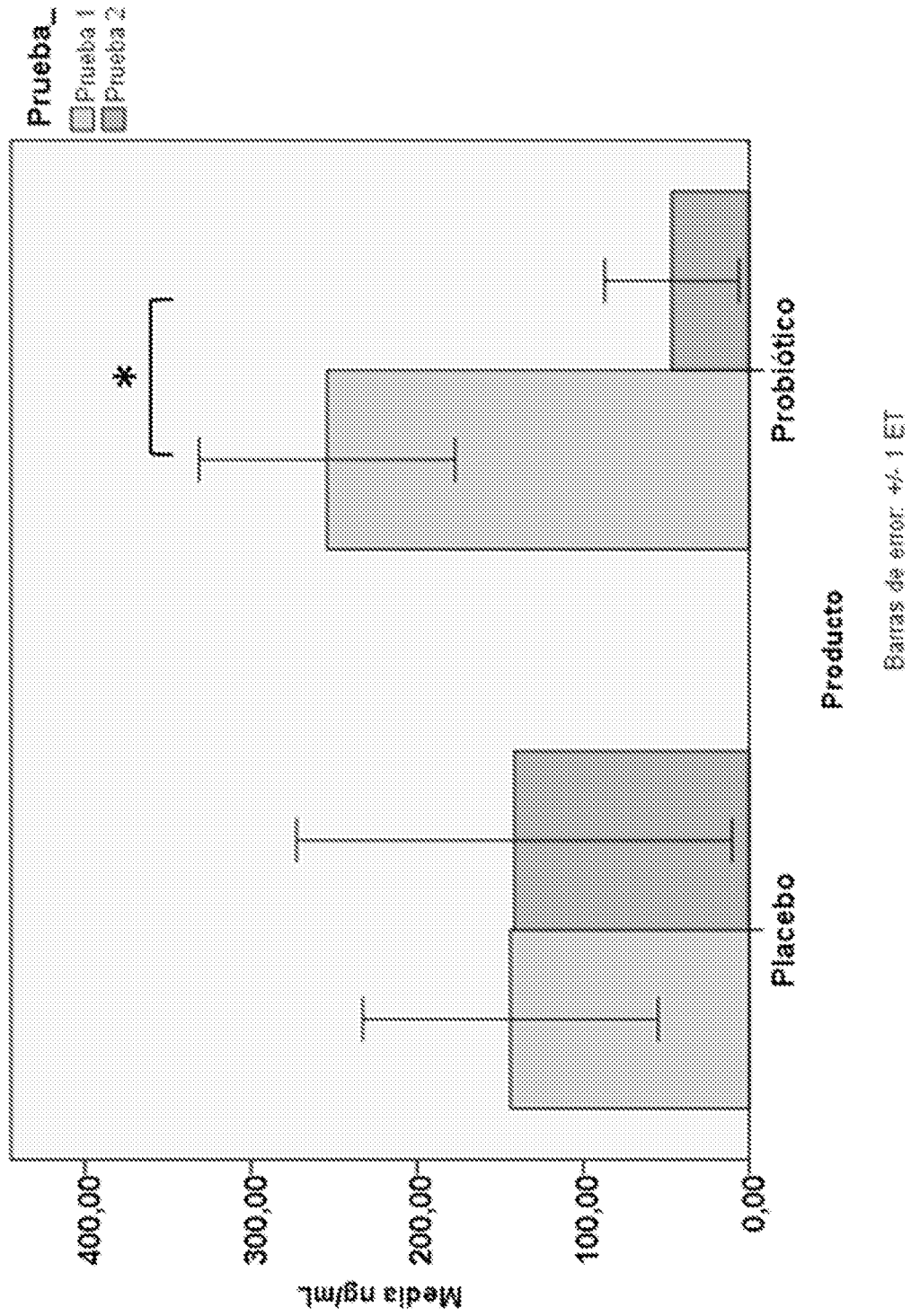


Fig. 2

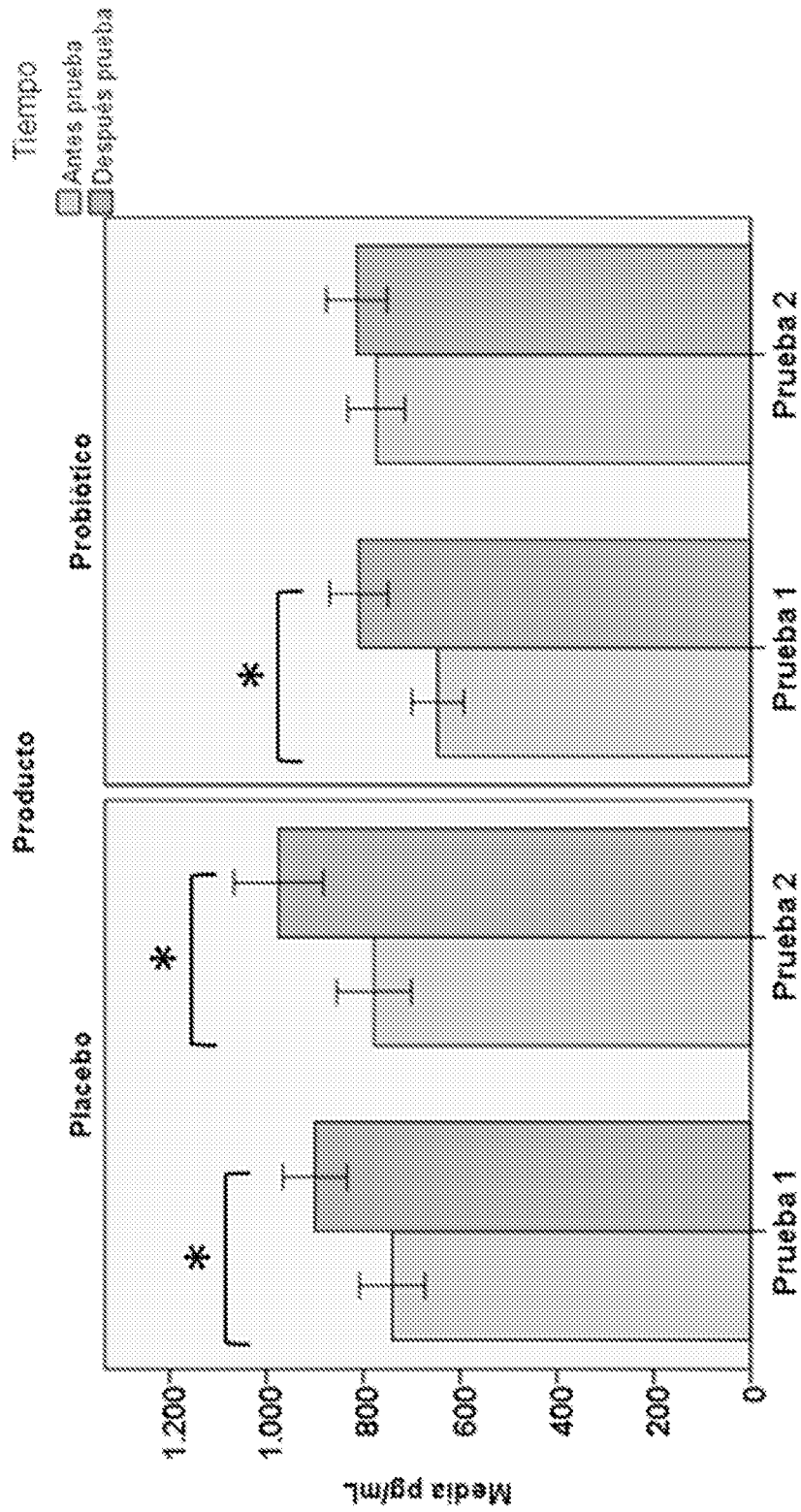
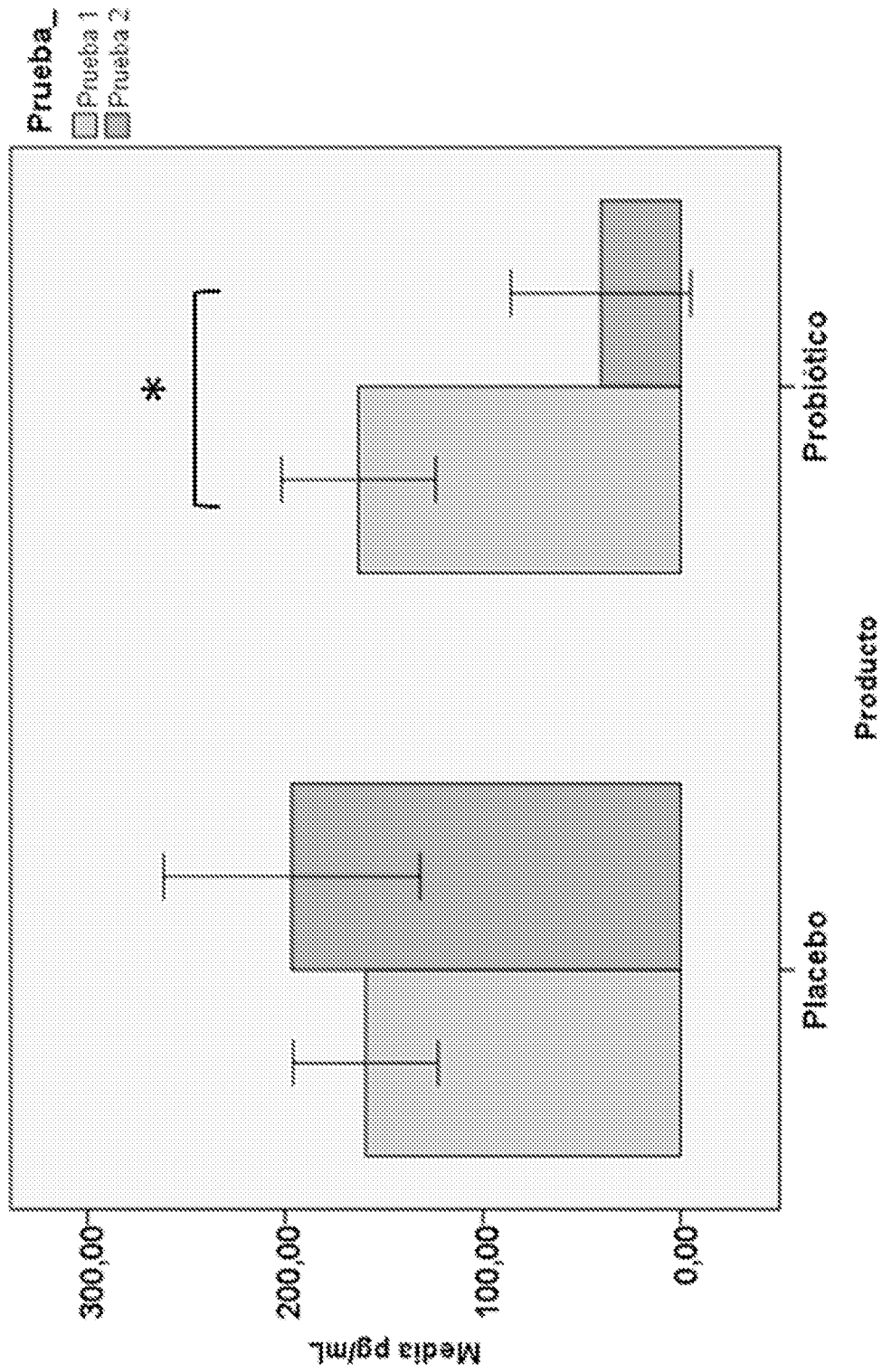
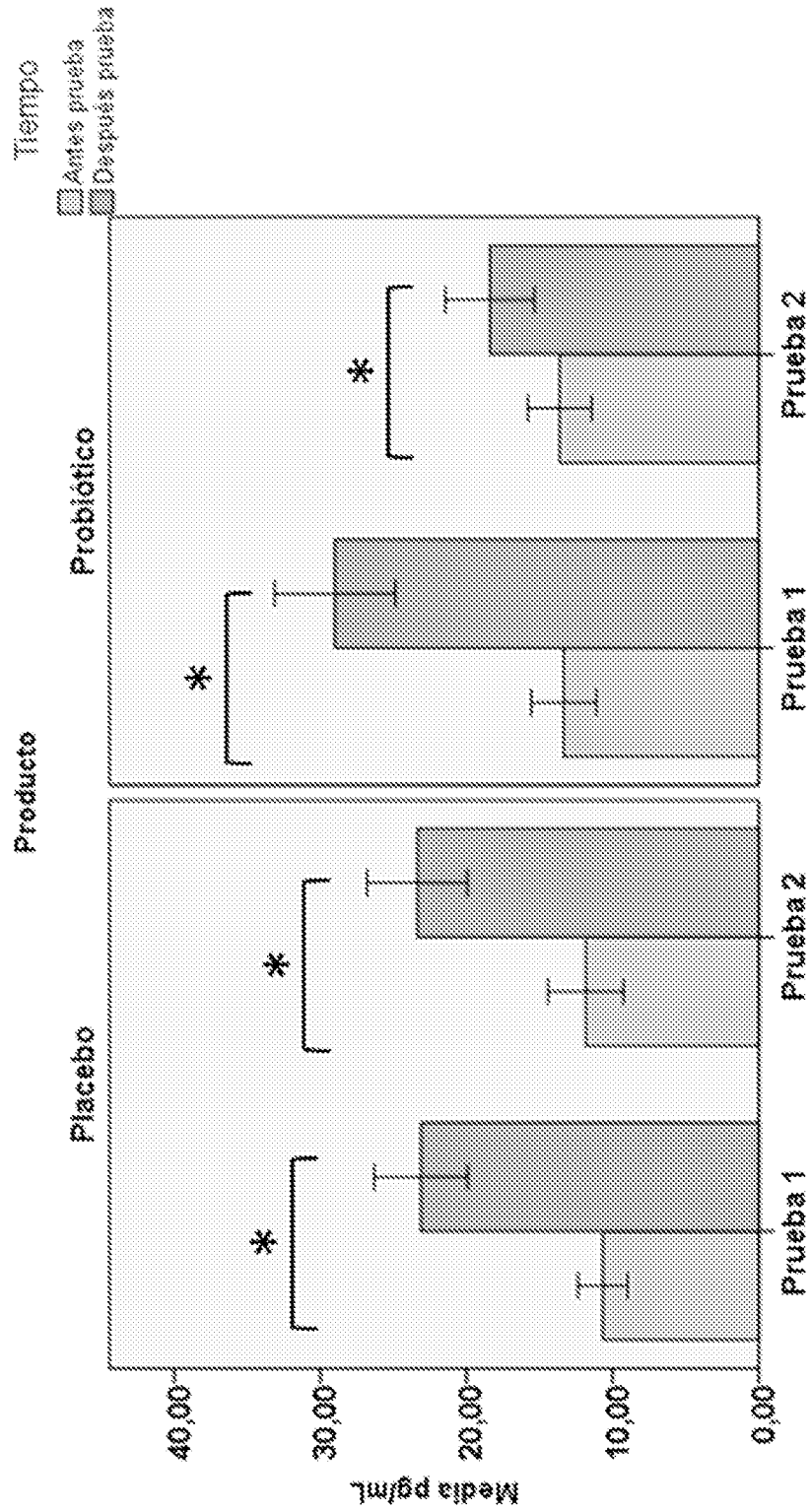


Fig. 3



Barra de error: ± 1 ET

Fig. 4



Barra de error: +/- 1 ET

Fig. 5

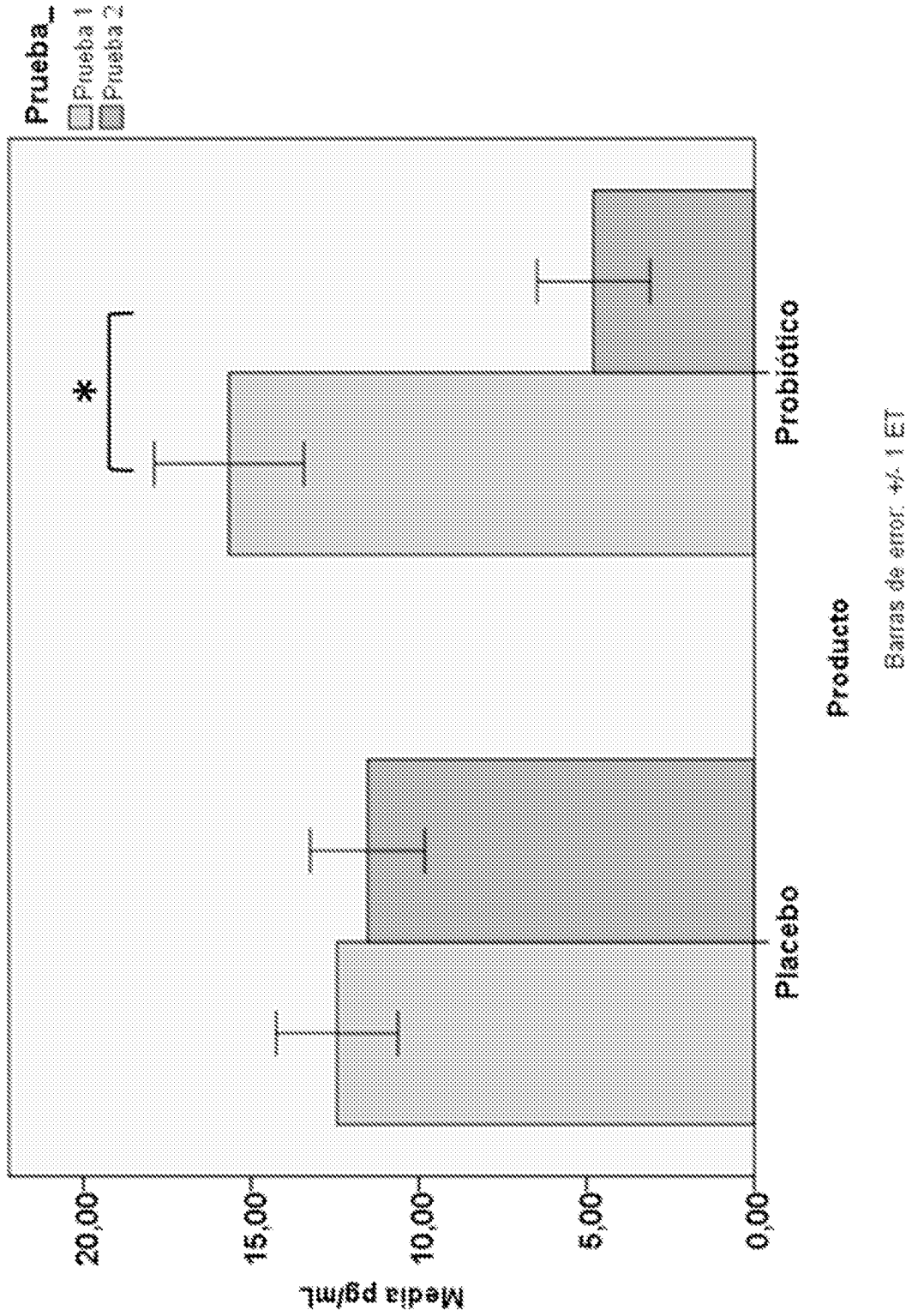


Fig. 6