

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 878 674**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/742** (2015.01)  
**A23L 33/135** (2006.01)  
**A61P 29/02** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)  
**A61K 39/07** (2006.01)  
**A61P 19/02** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2014** **PCT/FR2014/051561**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014** **WO14207360**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2014** **E 14738881 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.05.2021** **EP 3021858**

54 Título: **Cepa para el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias crónicas**

30 Prioridad:

**28.06.2013 FR 1356274**

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

**19.11.2021**

73 Titular/es:

**LESAFFRE ET COMPAGNIE (50.0%)**  
**41, rue Etienne Marcel**  
**75001 Paris, FR y**  
**ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE DES**  
**SCIENCES AGRONOMIQUES DE BORDEAUX-**  
**AQUITAINE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TAILLADE, PATRICK y**  
**URDACI, MARIE**

74 Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

ES 2 878 674 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

Cepa para el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias crónicas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de las enfermedades inflamatorias. Se refiere particularmente al uso de una cepa probiótica para el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias crónicas, en particular reumatismos inflamatorios crónicos.

10 Antecedentes técnicos

La inflamación es un mecanismo de defensa del cuerpo en respuesta a un ataque endógeno o exógeno al cuerpo humano. Las causas físicas, químicas o infecciosas pueden ser la fuente de los agentes inflamatorios exógenos. Las causas metabólicas, los problemas de vascularización o una respuesta inmunitaria anormal pueden ser la fuente de los agentes inflamatorios endógenos.

15 En presencia de uno de estos agentes, el mecanismo de inflamación responde con una serie de etapas sucesivas:

- 20 - una reacción vascular-exudativa, que da lugar a una hiperemia activa, un edema inflamatorio y una diapédesis leucocitaria,
- una reacción celular, que consiste en la formación de un granuloma inflamatorio,
- una limpieza y
- 25 - una reparación y cicatrización del área lesionada.

No obstante, la inflamación a veces puede ser perjudicial debido a la persistencia de un agente patógeno o endógeno, como la autoinmunidad en la artritis reumatoide. El daño causado al cuerpo continuará desarrollándose, lo que conducirá a una respuesta inmunitaria incontrolada y una inflamación crónica, acompañada de una destrucción de los tejidos, como los tejidos de las articulaciones.

30 La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria reumatoide autoinmunitaria crónica progresiva que afecta las articulaciones de forma simétrica y se refleja por dolores, hinchazón y rigidez en las articulaciones al despertar. Se dice que es progresivo ya que, en la mayoría de los casos, progresa por brotes inflamatorios intercalados con períodos más largos o más cortos de remisión.

35 También puede manifestarse en otros tejidos y estas manifestaciones extraarticulares pueden poner en peligro la vida del paciente.

40 La artritis reumatoide afecta aproximadamente al 1 % de la población, predominantemente en mujeres; 3 casos por cada 1 en hombres, teniendo en cuenta que la incidencia aumenta con la edad.

45 Los primeros síntomas aparecen en las pequeñas articulaciones de los dedos o de los pies. Con el tiempo, la inflamación crónica conduce a la destrucción del hueso y del cartílago y a una discapacidad gradual. Si la inflamación persiste, puede destruir el cartílago, el tejido óseo cercano, los tendones y los ligamentos periarticulares. Por lo tanto, la consecuencia de la enfermedad suele ser la deformación de las articulaciones y la discapacidad.

La artritis reumatoide se caracteriza más particularmente por la inflamación de la membrana sinovial de las articulaciones, que conduce a una infiltración anormal de las células inflamatorias en el líquido sinovial.

50 En primer lugar, existe una proliferación anormal de los vasos sanguíneos, lo que permite la entrada de células proinflamatorias (linfocitos, incluidos los CD4, monocitos, granulocitos, neutrófilos) en la sinovia y el espacio intraarticular.

55 La hiperplasia de los fibroblastos sinoviales y la infiltración de linfocitos (T, CD4 y B) y de macrófagos conducen a la formación de un pannus sinovial, que se refleja en la inflamación de la membrana sinovial, también conocida como sinovitis. Estas diferentes células proliferan de forma anormal, invaden el hueso y el cartílago, producen una gran cantidad de citocinas y de metaloproteinasas proinflamatorias, y desencadenan la formación y activación de osteoclastos. Las citocinas proinflamatorias particularmente abundantes son: TNF- $\alpha$  (*factor de necrosis tumoral  $\alpha$* ), IL-1, IL-6, IL-12 e IL-17, IL indica interleucina.

60 La destrucción de la articulación es secundaria a la erosión del hueso y la degeneración del cartílago. La citocina RANKL promueve la erosión, mientras que la enzima metaloproteinasa promueve la condrólisis. Estas dos moléculas se producen en las células que componen la sinovia, bajo el efecto del TNF- $\alpha$  y de la IL-1.

65

Subsecuentemente, las células intentarán contrarrestar esta degradación, pero los osteoclastos, cuya función es formar el hueso, lo forman de forma caótica, lo que da lugar por lo tanto a una deformación y una osificación de las articulaciones.

5 El tratamiento de la artritis reumatoide debe iniciarse lo antes posible después del descubrimiento de la enfermedad para detener el proceso inflamatorio, así como prevenir las lesiones y las deformaciones articulares.

10 Los tratamientos convencionales consisten en administrar antiinflamatorios para suprimir la inflamación de las articulaciones y la producción de citocinas. También se usan fármacos para la inmunomodulación del sistema inmunológico.

Las nuevas terapias actuales se relacionan particularmente con agentes que bloquean al TNF- $\alpha$  o a la IL-1, como el etanercept, el infliximab, el adalimumab, el certolizumab pegol.

15 Las respuestas a los tratamientos varían en dependencia del individuo y el estado de progresión de la enfermedad.

Por lo tanto, la búsqueda de tratamientos alternativos es importante para ofrecer soluciones novedosas a los pacientes resistentes a los tratamientos existentes.

20 Además, el tratamiento de la artritis reumatoide tiene un alto costo para la sociedad, debido a los tratamientos antiinflamatorios muy caros y a la discapacidad del paciente que puede resultar de los mismos. De hecho, los tratamientos para las enfermedades inflamatorias deben tomarse a largo plazo para obtener resultados, es decir, para detener la progresión de la enfermedad, los brotes inflamatorios, para estabilizar y mantener la enfermedad en remisión.

25 De manera similar, el uso prolongado de antiinflamatorios por parte del paciente puede tener efectos secundarios no deseados, tales como un aumento de peso, trastornos gastrointestinales y/o mayores riesgos de osteoporosis e hipertensión.

30 Para ello, los probióticos podrían constituir una alternativa atractiva.

El término "probiótico" se usa para definir a microorganismos vivos que, cuando se integran en cantidades suficientes, ejercen un efecto positivo sobre la salud, la comodidad y el bienestar, más allá de los efectos nutricionales convencionales.

35 El documento WO2007/133188 describe el uso de una composición bacteriana antifúngica que comprende al menos una bacteria seleccionada de *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* y *Enterococcus faecalis*, para estimular una respuesta antifúngica y para el tratamiento de numerosos y muy variados trastornos que van desde el autismo hasta las infecciones vaginales y la endometriosis, entre los que se destaca la artritis reumatoide. Este documento no describe las cepas particulares de bacterias que pueden usarse en la composición antifúngica.

40 El documento WO 2007/064741 describe el uso de una cepa de *Bacillus subtilis*, PB6, para su uso en el tratamiento y/o prevención de diarreas por antibióticos, infecciones gastrointestinales por *Clostridium difficile*, enfermedades gastrointestinales y síndrome del intestino irritable.

45 El documento WO 2005/019417 describe un cocultivo bacteriano que comprende una primera cepa de *Bacillus licheniformis*, PA, y una segunda cepa de *Bacillus subtilis*, HE, que puede usarse como probiótico en el tratamiento de las enfermedades gastrointestinales y otras enfermedades como la artritis reumatoide.

50 El documento WO2009/026306 describe, por ejemplo, una composición que comprende tres cepas de bacterias, específicamente *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* y *Enterococcus faecium* o *faecalis*, para la prevención y/o el tratamiento de numerosos y muy variados trastornos que van desde el autismo hasta las infecciones vaginales y la endometriosis, y entre los que se destaca la artritis reumatoide. Este documento no describe las cepas particulares de bacterias que pueden usarse en la composición.

55 Se conoce que el efecto probiótico de una cepa dada, ya sea una cepa de levadura o una cepa bacteriana, es específico de esta cepa y no del género o incluso de la especie en cuestión.

60 Por lo tanto, todavía existe la necesidad de encontrar nuevos tratamientos para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades inflamatorias crónicas que sean alternativas a los disponibles, sean menos costosos y tengan menos efectos secundarios no deseados.

Descripción detallada

65 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es una cepa bacteriana probiótica para su uso en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico. De hecho, los inventores han descubierto, sorprendentemente, que

la cepa CU1 de *Bacillus subtilis* tiene un efecto beneficioso en el tratamiento y/o prevención de determinadas enfermedades inflamatorias crónicas.

La cepa CU1 de *Bacillus subtilis* se depositó con el número 1-2745 el 25 de octubre de 2001, en la CNCM, Collection Nationale de Cultures de Microorganismes [Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos] del Instituto Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75725 Paris Cedex 15, Francia.

La cepa CU1 de *Bacillus subtilis* se describió por primera vez en el documento FR 2 837 835. Este documento describe la cepa CU1 de *Bacillus subtilis* como un agente para la inmunomodulación del sistema inmunológico y su uso para producir una vacuna recombinante viva contra *H. pylori*.

Una "cepa" indica una población de células relativamente homogénea.

En particular, una cepa se obtiene mediante el aislamiento de un clon, donde un clon es una población de células obtenidas de una sola célula.

Las expresiones "cepa CU1 de *Bacillus subtilis*", "cepa probiótica CU1", "cepa de *Bacillus subtilis* depositada en la CNCM con el número 1-2745" y "cepa CU1" son sinónimos.

Por tanto, un objeto de la presente invención es la cepa CU1 de *Bacillus subtilis*, depositada en la CNCM con el número 1-2745, el 25 de octubre de 2001, para su uso en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico.

Otro objeto de la presente invención son las células obtenidas mediante el cultivo de la cepa CU1 de *Bacillus subtilis* depositada en la CNCM con el número 1-2745, el 25 de octubre de 2001, para su uso en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico.

Otro objeto de la presente invención es una composición que comprende células obtenidas mediante el cultivo de la cepa CU1 de *Bacillus subtilis*, depositada en la CNCM con el número 1-2745, 25 de octubre de 2001, para su uso en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico.

Los términos "células obtenidas mediante el cultivo de la cepa CU1 de *Bacillus subtilis*, depositada en la CNCM con el número 1-2745, 25 de octubre de 2001", "biomasa de CU1", "células obtenidas mediante el cultivo de la cepa CU1" o "células CU1" son sinónimos aquí.

La cepa CU1 y las células CU1 obtenidas mediante el cultivo de dicha cepa constituyen un tratamiento alternativo para la prevención y/o el tratamiento del reumatismo inflamatorio crónico, que es menos costoso y no tiene los efectos secundarios no deseados de los tratamientos convencionales.

Los reumatismos inflamatorios crónicos son enfermedades inflamatorias crónicas, al igual que la psoriasis, la pancreatitis crónica, la enfermedad celíaca, la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad de Crohn, el lupus eritematoso, la esclerodermia, la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante, la hepatitis autoinmunitaria y la vasculitis.

Por "tratamiento de una enfermedad" se entiende tratar una enfermedad para obtener la recuperación de la misma, para aliviar los síntomas de la misma o dolencias, como disminuir la intensidad de la inflamación o estabilizar una enfermedad para mantenerla en remisión.

La remisión se usa para indicar el intervalo entre dos brotes inflamatorios.

"Prevención de una enfermedad" se refiere a prevenir la aparición de una enfermedad, por ejemplo en un sujeto con riesgo de desarrollar la enfermedad, o retrasar un brote inflamatorio de la enfermedad cuando dicha enfermedad ya está presente.

El "reumatismo inflamatorio crónico" se usa para indicar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en la artritis reumatoide, el reumatismo psoriásico, las espondiloartropatías, el lupus eritematoso sistémico, el síndrome de Sjögren, la enfermedad de Behcet, la artritis idiopática juvenil y la policondritis atrófica crónica.

En una modalidad preferida, un objeto de la presente invención es la cepa CU1 de *Bacillus subtilis* o las células obtenidas mediante el cultivo de dicha cepa o una composición que comprende células obtenidas mediante el cultivo de dicha cepa, para su uso en el tratamiento y/o prevención de la artritis reumatoide.

De hecho, los inventores descubrieron, sorprendentemente, que el uso de la cepa probiótica CU1 de *Bacillus subtilis*, y en particular de las células obtenidas mediante el cultivo de dicha cepa, permite:

- reducir la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, IL-17, como se demuestra en los ejemplos 1 y 2;

- estimular la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10, como se demuestra en el ejemplo 2;
- retrasar y/o reducir los síntomas macroscópicos como la gravedad de la inflamación o el número de articulaciones afectadas durante la artritis reumatoide, como se demuestra en el ejemplo 1;
- reducir la infiltración de células inmunitarias en el líquido sinovial, como se demuestra en el ejemplo 1;
- reducir las lesiones articulares que provocan la destrucción del cartílago y el hueso y la deformación de las articulaciones, como se demuestra en el ejemplo 1.

De hecho, el TNF- $\alpha$ , las IL-1, IL-12 e IL-17 son citocinas proinflamatorias que tienen un papel esencial en las enfermedades inflamatorias. Su secreción excesiva provocará una inflamación crónica que, en el caso de la artritis reumatoide, provocará lesiones irreversibles en las articulaciones y deformación de las mismas.

Se entiende por "síntomas macroscópicos" los síntomas visibles a simple vista, como la gravedad de la inflamación, el número de articulaciones afectadas por la inflamación y la deformación de las articulaciones, de acuerdo con los criterios revisados del Colegio Americano de Reumatología (ACR), 1987 (véase Amett FC y otros, *Arthritis Rheum.*, 1988; 31:315-24).

"Células inmunitarias" se refiere a los macrófagos, los linfocitos, los granulocitos circulantes y los leucocitos mononucleares.

La infiltración de las células inmunitarias en la articulación y más particularmente en la membrana sinovial producirá un pannus sinovial, implicado en la destrucción del cartílago y del tejido óseo cercano.

Por lo tanto, los inventores han descubierto que el efecto de administrar células CU1 fue reducir y prevenir la formación de un pannus sinovial como se describe en el ejemplo 1.

Se entiende por "lesiones articulares" la destrucción progresiva del cartílago por la pérdida de proteoglicanos de la matriz del cartílago, y de los huesos, de las articulaciones, y también la deformación progresiva de dichas articulaciones. La deformación de las articulaciones se debe a la osificación caótica de la articulación por los osteoclastos. Esta deformación puede tener consecuencias importantes al provocar una pérdida de autonomía y la discapacidad del paciente.

El uso de la cepa CU1 de *Bacillus subtilis* o de células obtenidas por cultivo de dicha cepa o de una composición que comprende células obtenidas por cultivo de dicha cepa en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico puede caracterizarse porque induce una reducción en la producción de al menos una citocina proinflamatoria y/o un aumento en la producción de al menos una citocina antiinflamatoria.

Una citocina proinflamatoria, cuya producción se reduce debido a la cepa CU1 de *Bacillus subtilis* o por las células obtenidas mediante el cultivo de dicha cepa o por una composición que comprende células obtenidas mediante el cultivo de dicha cepa, se selecciona del grupo que consiste en el TNF- $\alpha$ , la interleucina IL-1, la interleucina IL-12 o la interleucina IL-17.

Una citocina antiinflamatoria, cuya producción aumenta debido a la cepa CU1 de *Bacillus subtilis* o por las células obtenidas mediante el cultivo de dicha cepa o por una composición que comprende células obtenidas mediante el cultivo de dicha cepa, es por ejemplo la interleucina IL-10.

El uso de la cepa CU1 de *Bacillus subtilis* o de células obtenidas mediante el cultivo de dicha cepa o de una composición que comprende células obtenidas mediante el cultivo de dicha cepa en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico puede caracterizarse porque induce una reducción en la producción de al menos dos citocinas proinflamatorias, preferentemente al menos tres citocinas proinflamatorias y/o un aumento en la producción de al menos una citocina antiinflamatoria, como interleucina IL-10.

Preferentemente, el uso de la cepa CU1 de *Bacillus subtilis* o de células obtenidas mediante el cultivo de dicha cepa o de una composición que comprende células obtenidas mediante el cultivo de dicha cepa en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico puede caracterizarse porque induce una reducción en la producción de TNF- $\alpha$ , interleucina IL-1, interleucina IL-12 e interleucina IL-17 y un aumento de la producción de interleucina IL-10.

El uso de la cepa CU1 de *Bacillus subtilis* o de células obtenidas mediante el cultivo de dicha cepa o de una composición que comprende células obtenidas mediante el cultivo de dicha cepa en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico puede caracterizarse porque se destina al uso humano y/o veterinario.

El uso veterinario se refiere tanto al ganado de granja como cerdos, vacas, ovejas o cabras, como a animales domésticos como gatos, perros, caballos o conejos.

En particular, el uso de la cepa CU1 de *Bacillus subtilis* o de células obtenidas mediante el cultivo de dicha cepa o de una composición que comprende células obtenidas mediante el cultivo de dicha cepa en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico puede caracterizarse porque se destina al uso humano.

5 Por tanto, las células CU1 se obtienen mediante el cultivo de la cepa CU1 de *Bacillus subtilis* en un medio de cultivo, de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en el libro Biotechnologie, 5ª edición, R. Scriban, Tec. y Doc., 1999, ISBN: 2-7430-0309-X.

Típicamente, un proceso para producir células CU1 mediante el cultivo de la cepa CU1 comprende las etapas de:

- 10
- sembrar un medio de cultivo con un inóculo de la cepa CU1,
  - cultivar en condiciones aeróbicas, para obtener la multiplicación de las células,
  - separar la biomasa de su medio de cultivo, para obtener las células CU1.

15 Las células CU1 así obtenidas están predominantemente en forma vegetativa.

La "forma vegetativa" de una bacteria indica la forma de una bacteria colocada en condiciones favorables.

20 El término "predominantemente en forma vegetativa" significa que al menos el 70 % de las células están en forma vegetativa, preferentemente al menos el 80 % y con mayor preferencia al menos el 90 %.

Un ejemplo de condiciones favorables es un medio de cultivo no limitante a una temperatura y un pH favorables a la multiplicación bacteriana.

25 Un medio de cultivo no limitante contiene todos los elementos nutricionales necesarios para la multiplicación de las células.

30 El proceso para producir las células CU1 también puede comprender una etapa intermedia entre la etapa de cultivo en condiciones aeróbicas y la etapa de separar la biomasa de su medio de cultivo, de colocar las células en condiciones desfavorables. Las células CU1 obtenidas al final del proceso están entonces predominantemente en forma esporulada.

La "forma esporulada" de una bacteria indica la forma de una bacteria colocada en condiciones desfavorables.

35 El término "predominantemente en forma esporulada" significa que al menos el 70 % de las células están en forma esporulada, preferentemente al menos el 80 % y con mayor preferencia al menos el 90 %.

40 La forma esporulada es, por lo tanto, una forma de resistencia que permite a las células resistir un medio difícil como la falta de nutrientes, es decir, un medio nutritivo limitante, un estrés hídrico, una variación significativa en el pH o la temperatura, o bien transitar por el tracto gastrointestinal.

45 La colocación de las células CU1 en condiciones desfavorables se obtiene por ejemplo por: no renovar el medio de cultivo para las bacterias, interrumpir el suministro de medio de cultivo, usar un medio de cultivo limitante, cambiar la temperatura, cambiar el pH, controlar la aireación y/o la agitación para mantener una presión de O<sub>2</sub> superior al 20 % en el medio de cultivo y una presión de CO<sub>2</sub> de menos del 1,5 % en los gases que salen, o una de sus combinaciones.

50 También es posible obtener células CU1 predominantemente en forma esporulada mediante la adición de ácido glutámico al medio de cultivo en una cantidad de aproximadamente 0,75 g/l.

Otro objeto de la presente invención son las células obtenidas mediante el cultivo de la cepa CU1 o una composición que comprende dichas células, para su uso en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico, caracterizado porque las células se encuentran en forma esporulada y/o en forma vegetativa.

55 En una modalidad preferida, las células CU1 están predominantemente en forma esporulada.

El proceso para producir células CU1 también puede comprender una etapa posterior de secado de las células CU1 para obtener las células CU1 en forma seca.

60 El secado es, por ejemplo, secado por liofilización, secado en lecho fluidizado o secado por atomización.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención son las células obtenidas mediante el cultivo de la cepa CU1 o una composición que comprende dichas células, para su uso en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico, caracterizadas porque dichas células se encuentran en forma seca.

65

Las "células en forma seca" significa que la biomasa obtenida al final del proceso de producción de células CU1 comprende más del 90 % de materia seca, preferentemente más del 95 % de materia seca.

5 La dosis diaria depende del tipo de animal, su peso, el método de administración y el tipo de tratamiento: curativo o preventivo.

10 Las células o la composición como se definió anteriormente pueden estar sujetas al uso diario de las células CU1 en una cantidad de  $1 \times 10^8$  UFC hasta  $1 \times 10^{11}$  UFC cuando se destina al uso humano, preferentemente de  $5 \times 10^8$  UFC hasta  $1 \times 10^{10}$  UFC.

15 Las células o la composición como se definió anteriormente pueden estar sujetas al uso diario de las células CU1 en una cantidad de  $1 \times 10^5$  UFC hasta  $1 \times 10^{11}$  UFC cuando se destina al uso veterinario, preferentemente  $1 \times 10^7$  UFC hasta  $1 \times 10^{10}$  UFC.

20 El término UFC indica unidades formadoras de colonias.

Otro objeto de la presente invención es una composición como se definió anteriormente, para su uso en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico, caracterizada porque la composición es una composición alimenticia, un complemento alimenticio o una composición farmacéutica.

25 La composición alimenticia indica cualquier alimento, bebida o confitura.

La composición alimenticia puede ser, por ejemplo, una bebida, una barra de cereal, una goma de mascar, un producto lácteo, como un producto lácteo fermentado.

30 Se entiende por "complemento alimenticio" un producto alimenticio cuyo objetivo es complementar la dieta habitual y que constituye una fuente concentrada de nutrientes u otras sustancias que tienen un efecto nutricional o fisiológico, solo o en combinación.

35 Un complemento alimenticio se vende en forma de dosis, por ejemplo, formas de presentación como cápsulas de gel, pastillas, píldoras y otras formas similares, sobres de polvo, viales de líquido, frascos con gotero y otras formas de preparación líquidas o en polvo análogas previstas para la ingestión en unidades de medida de pequeña cantidad.

40 Una composición farmacéutica comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

Otro objeto de la presente invención es la composición tal como se definió anteriormente, para su uso en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico, caracterizada porque la composición se destina a la administración oral o tópica, preferentemente la administración oral.

45 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es la composición como se definió anteriormente, para su uso en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico, caracterizada porque la composición está en forma de cápsula de gel, pastilla, píldora, comprimido, cápsula, polvo, suspensión, solución líquida, gránulo, gel o crema.

Otro objeto de la presente invención es una composición como se definió anteriormente, para su uso en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico, caracterizada porque comprende además otro ingrediente activo.

50 El otro ingrediente activo se selecciona preferentemente del grupo de ingredientes activos que tienen una acción antiinflamatoria, una acción para la inmunomodulación del sistema inmunológico y/o una acción analgésica.

Ventajosamente, el otro ingrediente activo no es una cepa de *Bacillus subtilis*, preferentemente no es una cepa de bacterias, con mayor preferencia no es una cepa probiótica.

55 Preferentemente, la composición de acuerdo con la invención contiene células obtenidas mediante el cultivo de la cepa CU1, con exclusión de cualquier otra cepa bacteriana.

60 Preferentemente, la composición de acuerdo con la invención contiene células obtenidas mediante el cultivo de la cepa CU1, con exclusión de cualquier otra cepa de levadura o bacteriana.

También preferentemente, la composición de acuerdo con la invención contiene células obtenidas mediante el cultivo de la cepa CU1 como único ingrediente activo.

65 También se describe aquí un método para tratar y/o prevenir una enfermedad inflamatoria crónica en un paciente, que comprende administrar una cantidad efectiva de células obtenidas mediante el cultivo de la cepa CU1 o una composición que comprende dichas células a dicho paciente.

El método para tratar y/o prevenir una enfermedad inflamatoria crónica en un paciente, que comprende administrar una cantidad efectiva de células obtenidas mediante el cultivo de la cepa CU1 o una composición que comprende dichas células a dicho paciente, se caracteriza porque dicha enfermedad inflamatoria crónica es un reumatismo inflamatorio crónico.

Preferentemente, un objeto de la presente invención es un método para tratar y/o prevenir la artritis reumatoide en un paciente, que comprende administrar una cantidad efectiva de células obtenidas mediante el cultivo de la cepa CU1 o una composición que comprende dichas células a dicho paciente. La presente invención se ilustrará ahora mediante el uso de los siguientes ejemplos y figuras, que se dan a modo de ilustración totalmente no limitante.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1: Puntuaciones clínicas acumuladas para todas las ratas por grupo durante los 50 días del estudio de acuerdo con la prueba núm. 1.

Figura 2: Cambio en las puntuaciones clínicas medias para las ratas de los grupos G2 y G4 durante la prueba núm. 2 y a partir de la 1ª inmunización en D+7.

Figura 3: Puntuaciones clínicas acumuladas para todas las ratas por grupo durante los 43 días del estudio de acuerdo con la prueba núm. 2.

Figura 4: Puntuaciones clínicas acumuladas para todas las ratas por grupo durante los 50 días del estudio de acuerdo con la prueba núm. 3.

Figura 5: Ensayo del TNF-alfa (en pg/ml) en el suero de las ratas de cada grupo de acuerdo con la prueba núm. 2.

Figura 6: Ensayo del TNF-alfa (en pg/ml) en el suero de las ratas de cada grupo de acuerdo con la prueba núm. 3.

Figura 7: Ensayo de la interleucina IL-17 (en pg/ml) en el suero de las ratas de cada grupo de acuerdo con la prueba núm. 2.

Figura 8: Ensayo de la interleucina IL-17 (en pg/ml) en el suero de las ratas de cada grupo de acuerdo con la prueba núm. 3.

Figura 9: Ensayo del TNF- $\alpha$  (pg/ml) en los sobrenadantes de cada grupo, recuperados tras la estimulación de PBMC humana por *Mycobacterium butyricum*.

Figura 10: Ensayo de la interleucina 1 (pg/ml) en los sobrenadantes de cada grupo, recuperados tras la estimulación de PBMC humana por *Mycobacterium butyricum*.

Figura 11: Ensayo de la interleucina 12 (pg/ml) en los sobrenadantes de cada grupo, recuperados tras la estimulación de PBMC humana por *Mycobacterium butyricum*.

Figura 12: Ensayo de la interleucina 10 (pg/ml) en los sobrenadantes de cada grupo, recuperados tras la estimulación de PBMC humana por *Mycobacterium butyricum*.

#### Ejemplos

Ejemplo 1: Efectos de *Bacillus subtilis* CU1 en un modelo experimental de artritis inducida en ratas.

#### *Materiales y métodos*

##### 1- Modelos animales

Se usan ratas Lewis hembras de 6 semanas de edad. La artritis se induce mediante la administración de una emulsión de *Mycobacterium butyricum* (Mb) en solución aceitosa, que sirve como adyuvante.

El modelo así obtenido es relativamente fiel a la poliartritis humana en cuanto a los signos clínicos: simetría en las articulaciones afectadas, las articulaciones periféricas se ven afectadas con preferencia, hiperplasia sinovial, infiltración de células inflamatorias, erosión articular marginal y mayor susceptibilidad a la enfermedad en las hembras. La cascada inmunoinflamatoria también está presente, que ocurre in situ en los sitios de inflamación.

La *Mycobacterium butyricum* (Difco, Estados Unidos) se compra en forma liofilizada y se inactiva por calor. Luego se emulsionan en una cantidad de 180 ng de Mb muertos por mililitro de solución aceitosa de vaselina, Tween 80 y tampón PBS.

##### 2- Muestra usada

Las células de *Bacillus subtilis* CU1 (en adelante CU1) a ensayar se usan en forma esporulada y liofilizada. Las células se suspenden en agua fisiológica para las pruebas y dosis diarias de  $5 \times 10^9$  bacterias/día se administran a las ratas mediante alimentación forzada.

##### 3- Tratamiento/protocolo

Las pruebas se distribuyeron en una duración de 50 días y se realizaron por triplicado: las dos primeras pruebas con lotes de 5 ratas y la tercera con un lote de 12 ratas tratadas con CU1; las tres pruebas se espaciaron en el tiempo.

Programa:

- D0: las ratas se separan en varios lotes:
  - Grupo 1 (G1): controles negativos, ratas sanas;
  - Grupo 2 (G2): ratas con artritis experimental sin tratamiento por CU1;
  - Grupo 3 (G3): ratas sanas que recibieron la dosis diaria de CU1 mediante alimentación forzada a partir del D0 y en toda la duración del estudio;
  - Grupo 4 (G4): ratas con artritis experimental que recibieron la dosis diaria de CU1 mediante alimentación forzada a partir de D0 y en la duración del estudio;
- D+7: las ratas del grupo G2 y G4 se inmunizan mediante una primera inyección intradérmica de 300 µl de la emulsión de Mb inactivado en la base de la cola, es decir, una dosis de 54 ng de una emulsión de Mb inactivado.
- D+14: las ratas del grupo G2 y G4 se inmunizan por segunda vez, en las mismas condiciones.

Puntuaciones de inflamación clínica:

Los primeros signos clínicos aparecen

en D+23 en aquellas ratas en las que se había inducido artritis.

Las ratas desarrollan rápidamente signos de artritis en las articulaciones periféricas (esencialmente las patas traseras) con una fuerte respuesta inflamatoria de la cavidad sinovial, reflejada en una parálisis virtual de la articulación en cuestión y erosión destructiva del tejido óseo. Como en muchos modelos de enfermedades, el animal sufre una pérdida de peso severa.

Los síntomas inflamatorios se "puntúan" de acuerdo con una puntuación clínica preestablecida y se resumen en la tabla 1.

Tabla 1

| Puntuación clínica | Síntomas                              |
|--------------------|---------------------------------------|
| Puntuación 0       | Ninguna pata inflamada                |
| Puntuación 1       | Inflamación/parálisis de una pata     |
| Puntuación 2       | Inflamación/parálisis de dos patas    |
| Puntuación 3       | Inflamación/parálisis de tres patas   |
| Puntuación 4       | Inflamación/parálisis de cuatro patas |

Las ratas se pesan y puntúan diariamente.

Protocolo histológico

Las patas se fijan en formaldehído al 4 % y luego se descalcifican por electroforesis en tampón de descalcificación (Bayer Diagnostic, Puteau, Francia) durante 3 h. Subsecuentemente las patas se impregnan con parafina y se obtienen los cortes histológicos con un micrótopo.

Los cortes de 5 mm se tiñen mediante el uso de los protocolos habituales.

Los cortes histológicos obtenidos para cada uno de los grupos se tiñen con dos tinciones diferentes:

- Tinción de hematoxilina-eosina (HE), que tiñe el colágeno de rosa pálido, los músculos de rosa oscuro, el citoplasma acidófilo de rojo, el citoplasma basófilo de violeta, el núcleo de azul y los eritrocitos en rojo cereza;
- Tinción de azul de anilina de Mallory, o tinción triple (MA) de Mallory, que resalta el tejido conectivo: las fibrillas de colágeno en azul, las fibras musculares en rojo, las fibras de elastina en rosa o amarillo.

Los cortes se observan bajo un microscopio óptico con un aumento de 100x y 400x.

Protocolos para analizar citocinas inflamatorias

Las citocinas se analizan mediante el método ELISA mediante el uso de anticuerpos y kits estándar proporcionados por eBioscience (San Diego, CA, Estados Unidos) y los protocolos proporcionados por el fabricante (Rat IL-17A ELISA Ready-SET-Go; Rat TNF alpha ELISA Ready-SET-Go).

*Resultados*

1- Síntomas inflamatorios: puntuación clínica de la inflamación

Las ratas sanas que recibieron o no recibieron la cepa probiótica (G1 y G3) no desarrollan síntomas inflamatorios; por tanto, sus puntuaciones clínicas son cero y no se muestran en los gráficos.

Prueba núm. 1:

Las ratas del grupo 2 desarrollan la artritis experimental a partir del día 19 después de la 1ª inmunización (D+26) con Mb. Luego, su puntuación clínica evoluciona hasta situarse en promedio entre 3 y 4, solo 10 días después de la aparición de los primeros signos clínicos (D+33). Esta puntuación se mantiene estable y elevada en la duración del estudio.

Por otro lado, las ratas del grupo 4 que reciben las células CU1 no desarrollan síntomas inflamatorios, ni los desarrollan más tarde que el grupo 2. Además, las puntuaciones clínicas del grupo 4 son notablemente menores y la gravedad y el número de patas afectadas siguen siendo menores a los del grupo 2.

De acuerdo con la Figura 1, se observa que las ratas del grupo 2 alcanzan una puntuación acumulada total de 426, frente a 231 para las ratas del grupo 4 tratadas con CU1. Por lo tanto, CU1 permite reducir la magnitud de los signos de enfermedad en un 46 %.

Prueba núm. 2:

Las ratas del grupo 2 desarrollan la artritis experimental a partir del día 25 después de la 1ª inmunización (D+32) con Mb. Su puntuación clínica evoluciona rápidamente hasta situarse en un promedio de 3, solo 15 días después de la aparición de los primeros signos clínicos (D+38). Esta puntuación se mantiene estable y elevada en la duración del estudio.

Las ratas del grupo 4 que recibieron CU1 también desarrollan síntomas inflamatorios pero más tarde, el día 28 (D+35) y en mucha menor medida. En el día 33 después de la 1ª inmunización (D+40), los síntomas disminuyen y permanecen estables hasta el final del estudio.

Aunque inflamadas, la gravedad y el número de patas afectadas siguen siendo menores que en el grupo 2.

Por tanto, se puede observar una diferencia significativa en términos de aparición y gravedad de los síntomas de la inflamación (Figura 2).

De acuerdo con la Figura 3, se observa que las ratas del grupo 2 alcanzan una puntuación acumulada total de 176, frente a 31 para las ratas del grupo 4 tratadas con CU1. Por lo tanto, CU1 permite reducir la magnitud de los signos de enfermedad en un 82 %.

Prueba núm. 3:

Se usan dos lotes de 6 ratas en el grupo 4, denominados a y b.

De acuerdo con la Figura 4, se observa una diferencia significativa entre las puntuaciones acumuladas en los grupos 2 y 4a/b. Las 6 ratas del grupo 2 alcanzan una puntuación acumulada total de 251 frente a 98 para las 6 ratas tratadas con CU1 (G4a) y 80 para las 6 ratas tratadas con CU1 (G4b).

Por lo tanto, CU1 permite reducir la magnitud de los signos de enfermedad en un 61 % (G4a) y en un 68 % (G4b).

2- Análisis visual de las patas traseras de las ratas

El análisis visual se realiza por observación visual de la presencia de inflamación en las patas traseras de las ratas de los diferentes grupos.

Las patas de las ratas del grupo 1, al no haberse sometido a ningún tratamiento, no presentan inflamación. Las patas de las ratas del grupo 2 tienen una inflamación visible considerable. Las patas de las ratas del grupo 4 no tienen signos de inflamación o tienen signos de inflamación mucho menores que los del grupo 2.

### 3- Análisis histológico de las patas traseras de las ratas

Los cortes del grupo 2 con tinción HE exhiben desestructuración del tejido de la articulación y también una gran infiltración de células inmunitarias en la articulación en comparación con los grupos 1 y 3. La observación de los cortes del grupo 4 con tinción HE permite notar una menor infiltración de células inmunitarias en la articulación y que, en general, el tejido de las articulaciones se ve menos afectado negativamente.

Los cortes del grupo 2 con tinción MA muestran invasión del tejido conectivo en el espacio articular, así como también una gran infiltración de leucocitos, visible con un aumento de 400x, una pérdida de la arquitectura articular y una erosión del hueso. La observación de los cortes del grupo 4 con tinción MA permite ver que algunos animales no tienen, o prácticamente no tienen, lesiones en las articulaciones y, si las hay, son menos intensas en comparación con las lesiones observadas en los animales afectados del grupo 2. Por lo tanto, se evitó la formación del pannus, la inflamación de la sinovia, la destrucción del cartílago y la deformación de las articulaciones.

### 4- Ensayo de citocinas inflamatorias en suero de las ratas

#### Ensayo del TNF- $\alpha$ :

Las Figuras 5 y 6 muestran los resultados del ensayo del TNF- $\alpha$  en el suero de las ratas de cada grupo para las pruebas 2 y 3, respectivamente. El suero de cada animal se analiza por duplicado y luego se muestra un promedio general para todos los animales del grupo correspondiente.

El ensayo del TNF-alfa se expresa en picogramos por mililitro.

**Prueba núm. 2:** De acuerdo con la Figura 5, los grupos 1 y 3 tienen un nivel bajo de TNF- $\alpha$ , cercano a 200 pg/ml. El suero de las ratas del grupo 2 tiene un contenido de TNF- $\alpha$  de aproximadamente 2000 pg/ml. El suero de las ratas del grupo 4 tiene un contenido de TNF- $\alpha$  de aproximadamente 500 pg/ml, es decir, 4 veces menos que el del grupo 2.

**Prueba núm. 3:** De acuerdo con la Figura 6, el grupo 1 tiene un nivel de TNF- $\alpha$  de aproximadamente 600 pg/ml y de aproximadamente 1000 pg/ml para el grupo 3. También se observa que el grupo 4 tiene un nivel relativamente bajo de TNF- $\alpha$  en comparación con los grupos 1 y 3, aproximadamente 1400 pg/ml, mientras que el grupo 2 tiene un nivel alto de TNF- $\alpha$  de aproximadamente 4400 pg/ml, es decir, tres veces más que para el grupo 4.

#### Ensayo de interleucina IL-17:

Las Figuras 7 y 8 muestran los resultados del ensayo de IL-17 en suero de las ratas de cada grupo para las pruebas 2 y 3.

El ensayo de IL-17 se expresa en picogramos por mililitro.

**Prueba núm. 2:** De acuerdo con la Figura 7, las ratas de los grupos 1 y 3 tienen un nivel medio bajo de IL-17, cercano al umbral de detección del kit (50 pg/ml). Se puede observar que el nivel medio de IL-17 del grupo 2 es alto, aproximadamente 625 pg/ml, mientras que el nivel medio de IL-17 del grupo 4 es bajo, aproximadamente 100 pg/ml.

**Prueba núm. 3:** De acuerdo con la Figura 8, las ratas de los grupos 1 y 3 tienen un nivel medio bajo de IL-17, cercano al umbral de detección del kit (50 pg/ml). Se puede observar que el nivel medio de IL-17 del grupo 2 es alto, superior a 2000 pg/ml, mientras que el nivel medio de IL-17 en el grupo 4 es bajo en ambos lotes, cercano al umbral de detección del kit.

#### *Conclusión*

El modelo de inducción de artritis usado permitió demostrar que CU1 es capaz de prevenir la inducción de la enfermedad o de reducir muy significativamente sus efectos.

En primer lugar, es posible observar visualmente que las patas de las ratas no exhiben inflamación o tienen una puntuación inflamatoria baja. La administración de CU1 permite, por tanto, disminuir la magnitud de dichos signos de enfermedad.

En segundo lugar, el análisis histológico de las patas de las ratas revela que las ratas artríticas que se trataron con CU1 (G4) tienen lesiones articulares mucho menos pronunciadas, muy poca erosión ósea y una disminución o desaparición de las infiltraciones de células inmunitarias en las articulaciones en comparación con ratas que no recibieron tratamiento con CU1 (G2).

Además, la administración de CU1 a ratas artríticas (G4) permite una reducción significativa de la presencia de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-17).

Ejemplo 2: Efectos de *Bacillus subtilis* CU1 en células inmunitarias humanas extraídas de la sangre de donantes sanos (PBMC) estimuladas por *Mycobacterium butyricum*

## Materiales y métodos

### 1- Modelo celular usado

Las PBMC (célula mononuclear de sangre periférica) se usan como modelos en este ejemplo.

La sangre se obtuvo de 4 donantes voluntarios sanos, sometidos a pruebas previas para la ausencia de infecciones por VIH o hepatitis (EFS Aquitaine, Bordeaux Blood Bank). Las PBMC se aíslan mediante centrifugación en un gradiente de Ficoll™. Después del lavado, las células se resuspenden a una concentración de  $1 \times 10^6$  PBMC/ml en medio RPMI completo.

Se ponen en contacto con *Mycobacterium butyricum* (Mb) (Difco, Estados Unidos) para inducir una respuesta inflamatoria.

La solución madre de Mb se prepara por dilución del liofilizado del ejemplo 1 en tampón PBS a una concentración de 1 mg/ml de PBS. Luego, el número de células de Mb en la solución madre se cuenta al microscopio mediante el uso de un hemocitómetro para que, durante la estimulación de las PBMC, se use una relación de 10 Mb por célula inmunitaria (MOI 10:1). El término MOI significa multiplicidad de infección.

### 2- Muestra usada

Las células de *Bacillus subtilis* CU1 (en adelante CU1) a ensayar se usan en forma esporulada (CUsp) y en forma vegetativa (CUv). Se usa una solución de trabajo que contiene  $2 \times 10^8$  UFC/ml en agua fisiológica estéril.

### 3- Estimulación de las PBMC

Los experimentos de estimulación se llevan a cabo mediante el cultivo conjunto de las PBMC y la cepa CU1 en una relación de 10 bacterias por célula inmunitaria. Se usó lipopolisacárido (LPS) como control positivo de la estimulación de las PBMC para la producción de citocinas.

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Los sobrenadantes de los cultivos recogidos después de 18 h de contacto se centrifugaron y se mantuvieron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta que se analizaron las citocinas (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10).

### 4- Preparación de los diferentes grupos de prueba:

- Grupo 1 (G1): presencia solamente de PBMC;
- Grupo 2 (G2): las PBMC se ponen en contacto con CU1 en forma esporulada;
- Grupo 3 (G3): las PBMC se ponen en contacto con CU1 en forma vegetativa;
- Grupo 4 (G4): las PBMC se ponen en contacto con Mb;
- Grupo 5 (G5): las PBMC se ponen en contacto con CU1 en forma esporulada y con Mb;
- Grupo 6 (G6): las PBMC se ponen en contacto con CU1 en forma vegetativa y con Mb;
- Grupo 7 (G7): las PBMC se preincuban durante 1 hora con CU1 en forma esporulada antes de añadir Mb;
- Grupo 8 (G8): las PBMC se preincuban durante 1 hora con CU1 en forma vegetativa antes de añadir Mb.

Las citocinas se analizaron por el método de ELISA mediante el uso de anticuerpos y kits estándar proporcionados por eBioscience (San Diego, CA, Estados Unidos) y los protocolos proporcionados por el fabricante.

## Resultados

### 1- Ensayo del TNF- $\alpha$

La Figura 9 muestra el ensayo del TNF- $\alpha$  en pg/ml en el sobrenadante recuperado de las PBMC para cada uno de los grupos mencionados anteriormente.

Se observó un nivel de TNF- $\alpha$  de aproximadamente 2000 pg/ml en el grupo 4, mientras que en los grupos puestos en contacto con CU1 (G5 y G6), la cantidad de TNF- $\alpha$  se reduce a la mitad.

Además, se observa que preincubar con CU1 (G7 y G8) 1 hora antes de añadir Mb es más efectivo cuando CU1 está en forma esporulada (G7), lo que permite reducir el nivel de TNF- $\alpha$  a aproximadamente 500 pg/ml (4 veces menos).

### 2- Ensayo de la interleucina IL-1

La Figura 10 muestra el ensayo de la IL-1 en pg/ml en el sobrenadante recuperado de las PBMC para cada uno de los grupos mencionados anteriormente.

En el grupo 4 se observa un nivel de IL-1 de aproximadamente 1250 pg/ml, mientras que en el grupo 5 el nivel es de aproximadamente 400 pg/ml (3 veces menos), como es el caso del grupo 6. No se observó ninguna mejora en el caso de preincubación con CU1 (G7 y G8) antes de añadir Mb.

### 3- Ensayo de la interleucina IL-12

La Figura 11 muestra el ensayo de la IL-12 en pg/ml en el sobrenadante recuperado de las PBMC para cada uno de los grupos mencionados anteriormente.

Se observa un nivel de IL-12 de aproximadamente 32 pg/ml en el grupo 4, mientras que en los grupos 5 y 6 puestos en contacto con CU1, hay una reducción significativa de IL-12, menor de 12 pg/ml. Además, se observa que la preincubación con CU1 (G7 y G8) antes de añadir Mb disminuye aún más el nivel de IL-12 en comparación con los grupos 5 y 6.

### 4- Ensayo de la interleucina IL-10

La Figura 12 muestra el ensayo de la citocina antiinflamatoria IL-10 en pg/ml en el sobrenadante recuperado de las PBMC para cada uno de los grupos mencionados anteriormente.

Se observa un nivel de IL-10 de aproximadamente 55 pg/ml en el grupo con Mb, mientras que en los grupos 5 y 6 puestos en contacto con CU1, se observa un aumento en la producción de esta citocina antiinflamatoria de aproximadamente 120 pg/ml (2 veces más). Además, se observa que la preincubación con CU1 (G7 y G8) antes de añadir Mb no parece ser efectiva, ya que los niveles de IL-10 son menores (75 y 95 pg/ml) que los de los grupos 5 y 6.

### *Conclusión*

Los resultados obtenidos permiten mostrar, de manera general, que la administración de células de *Bacillus subtilis* CU1 permiten reducir la producción de citocinas proinflamatorias y aumentar la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10.

# REIVINDICACIONES

1. Una cepa CU1 de *Bacillus subtilis*, depositada en la CNM con el número 1-2745, 25 de octubre de 2001, para su uso en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico.
2. Células obtenidas mediante el cultivo de la cepa CU1 de *Bacillus subtilis* depositada en la CNM con el número 1-2745, el 25 de octubre de 2001, para su uso en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico.
3. Una composición, para su uso en el tratamiento y/o prevención del reumatismo inflamatorio crónico, la composición comprende células obtenidas mediante el cultivo de la cepa CU1 de *Bacillus subtilis*, depositada en la CNM con el número 1-2745, el 25 de octubre de 2001, con exclusión de cualquier otra cepa bacteriana.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizada porque la composición es una composición alimenticia, un complemento alimenticio o una composición farmacéutica.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, caracterizada porque la composición se destina a la administración oral o tópica.
6. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizada porque la composición está en forma de cápsula de gel, píldora, pastilla, comprimido, cápsula, polvo, suspensión, solución líquida, gránulo, gel o crema.
7. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, caracterizada porque comprende además otro ingrediente activo.
8. Las células para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, o la composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, caracterizadas porque dichas células están en forma esporulada y/o vegetativa.
9. Las células para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 8, o la composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, caracterizadas porque dichas células están en forma seca.
10. La cepa para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, o las células para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 8 y 9, o la composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, caracterizada porque dicho reumatismo inflamatorio crónico es la artritis reumatoide.

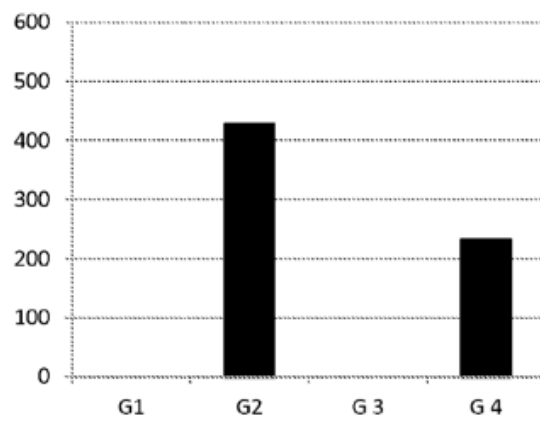


Figura 1

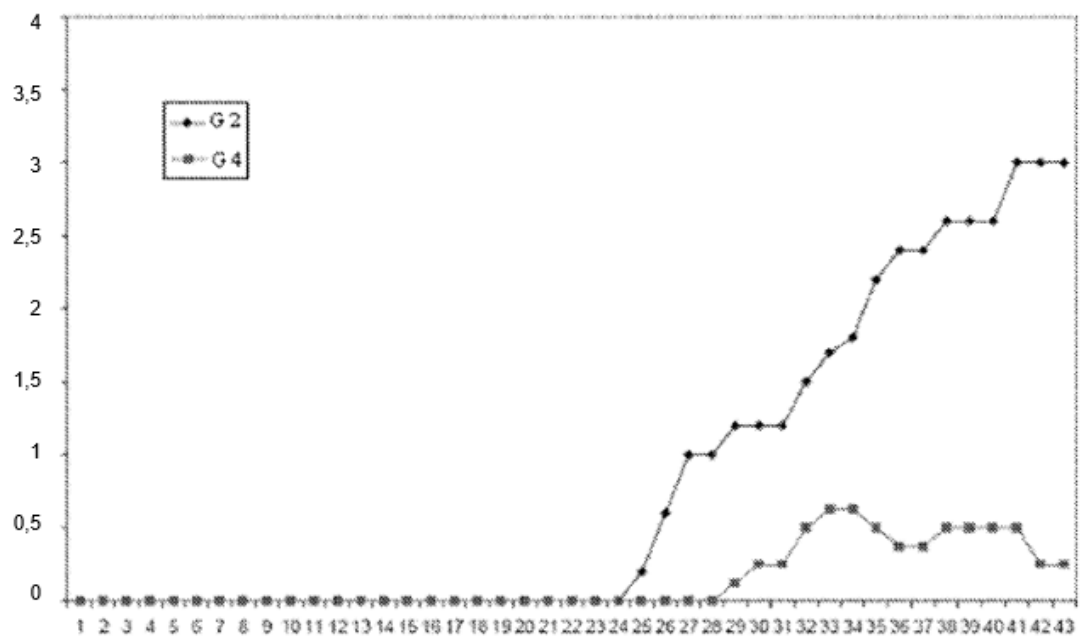


Figura 2

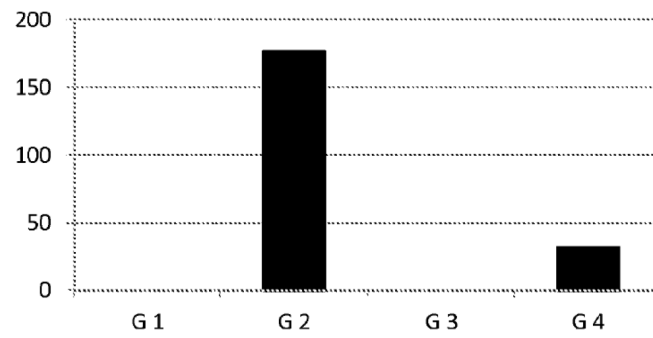


Figura 3

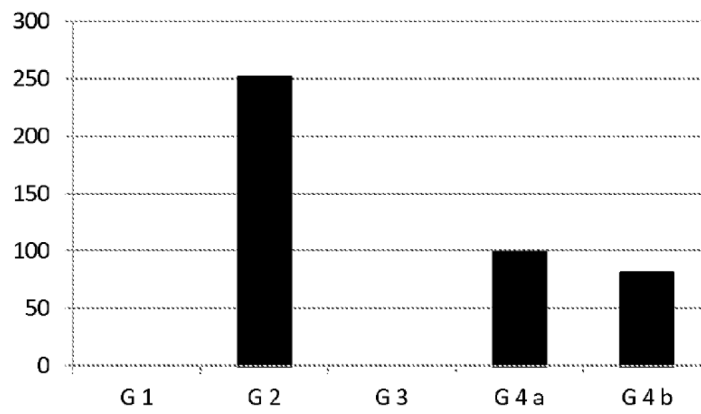


Figura 4

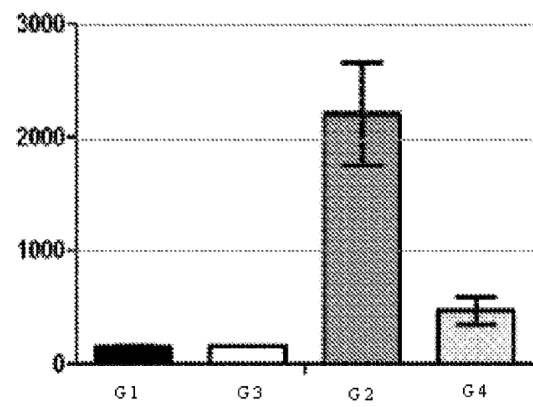


Figura 5

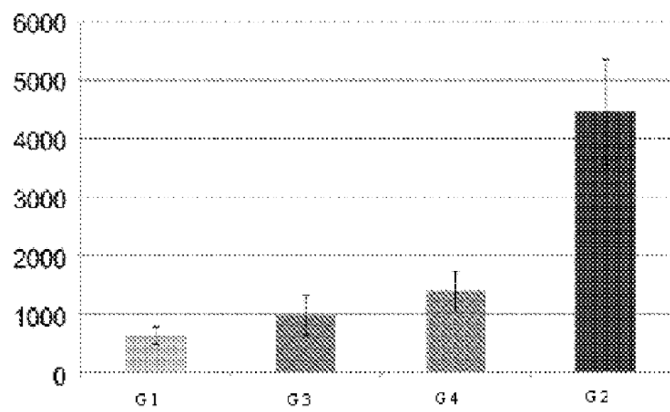


Figura 6

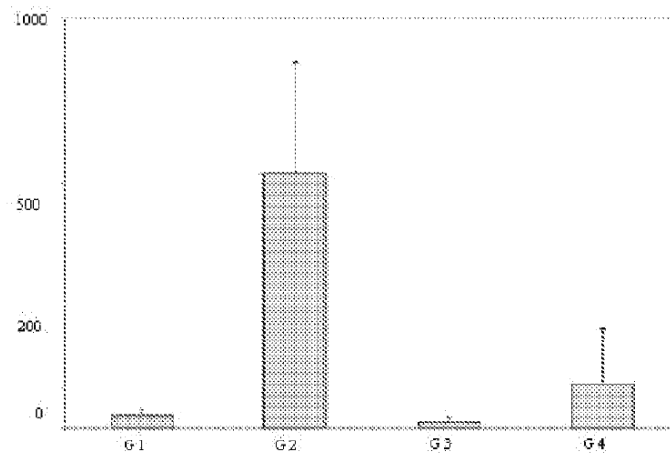


Figura 7

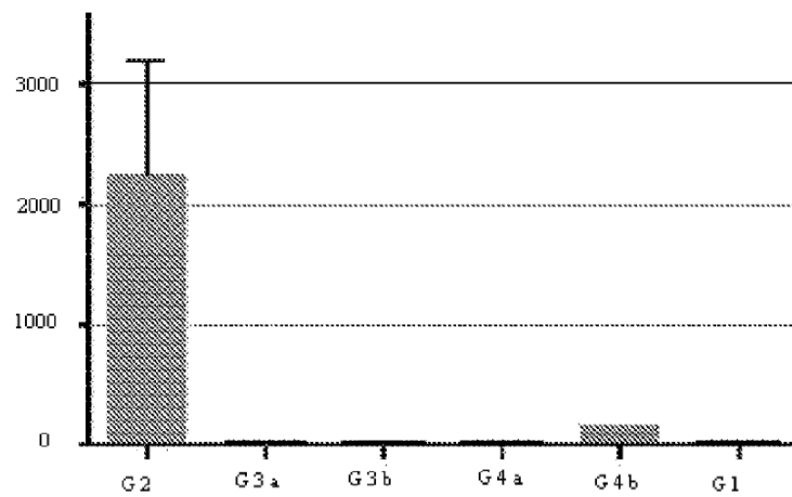


Figura 8

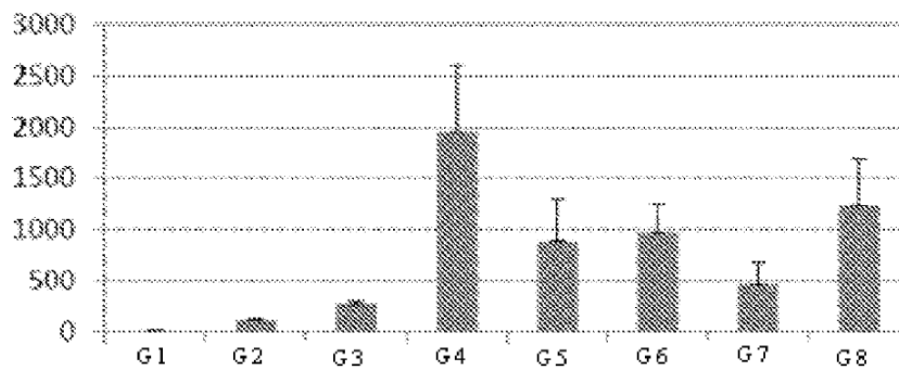


Figura 9

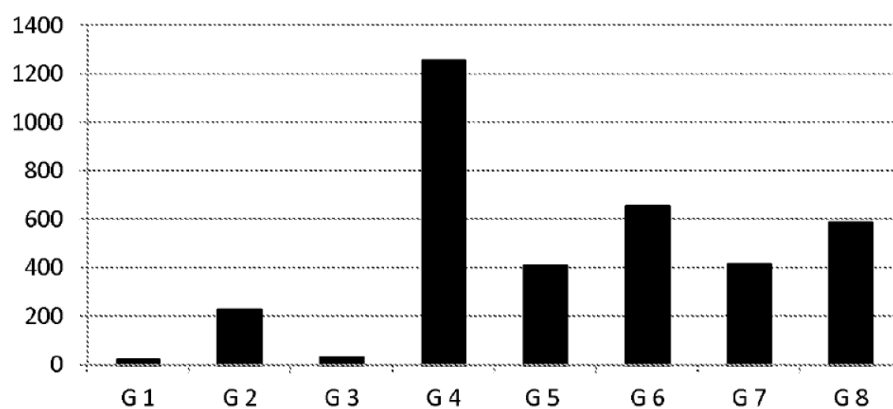


Figura 10

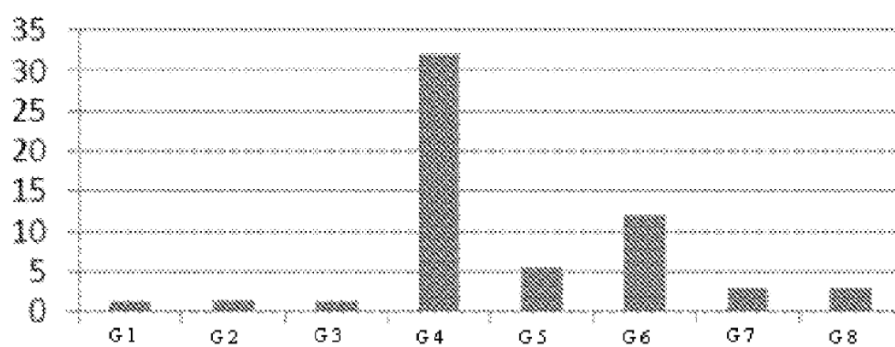


Figura 11

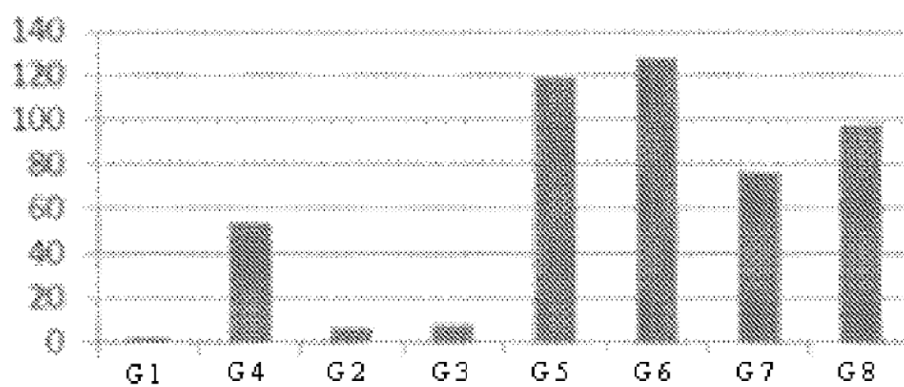


Figura 12