

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 018 261**

51 Int. Cl.:

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2017 PCT/EP2017/069681**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.02.2018 WO18024833**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2017 E 17752060 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024 EP 3493823**

54 Título: **Composición a base de post-bióticos para el tratamiento de la inflamación ocular**

30 Prioridad:

03.08.2016 IT 201600081929

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

14.05.2025

73 Titular/es:

ISTITUTO EUROPEO DI ONCOLOGIA S.R.L.
(100.00%)
Via Filodrammatici 10
20121 Milano, IT

72 Inventor/es:

RESCIGNO, MARIA y
PENNA, GIUSEPPE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 018 261 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 a base de post-bióticos para el tratamiento de la inflamación ocular

Campo de la invención

5 La invención se refiere a una composición que comprende un producto fermentado de especies de *Lactobacillus casei* o *paracasei*, preferiblemente para su uso en el tratamiento de síndromes de inflamación ocular y a un método para su obtención.

La invención se refiere al uso del sobrenadante de *Lactobacillus Paracasei* en el tratamiento de la conjuntivitis, en particular de la queratoconjuntivitis vernal (QCV).

Antecedentes de la invención

10 Conjuntivitis

La conjuntivitis es una inflamación o infección de la conjuntiva ocular. Se caracteriza por la dilatación de los vasos conjuntivales, lo que provoca hiperemia y edema conjuntival, que se suele manifestar con secreción asociada (Leibowitz HM, The red eye, N. Engl. J. Med., 2000; 343(5): 345-351).

15 La conjuntivitis puede variar según su etiología. Puede estar relacionada con infecciones virales o bacterianas, o ser alérgica. La conjuntivitis alérgica es, con diferencia, la más común en la población y se presenta entre la primavera y el verano. La conjuntivitis viral es la conjuntivitis infecciosa más común y se presenta principalmente en verano, mientras que la conjuntivitis bacteriana es más frecuente en niños y se observa de diciembre a abril.

20 La conjuntivitis puede ser primaria o secundaria a una enfermedad sistémica. En el primer caso, se prefiere el tratamiento tópico, mientras que en el segundo se debe buscar tratamiento sistémico. El tratamiento depende de la causa de la enfermedad y se lleva a cabo con colirios a base de antibióticos, prescritos para la conjuntivitis bacteriana; antihistamínicos, colirios con antiinflamatorio o esteroides para el tratamiento de la conjuntivitis alérgica; no existe cura para la conjuntivitis viral no herpética (JAMA, 2013; 310(16): 1721-1729, doi:10.1001 /jama.2013.280318).

Queratoconjuntivitis vernal (QCV)

25 La queratoconjuntivitis vernal (QCV) es una inflamación bilateral crónica de la conjuntiva. La QKV afecta sobre todo a niños pequeños (especialmente varones) de 4 a 20 años. La incidencia de la enfermedad es de 1 a 10 casos por cada 10.000 personas, pero ha ido en aumento en las últimas décadas. Se desconoce la etiología exacta de la enfermedad, aunque la QCV se presenta principalmente en personas alérgicas (con asma, dermatitis atópica, rinitis alérgica, etc.) e incluye hiperactividad de eosinófilos y mastocitos. La característica fisiopatológica es un infiltrado celular mixto denso con, en ocasiones, un epitelio extremadamente engrosado. Presenta una marcada proliferación capilar, fibrosis y una matriz extracelular engrosada.

30 El cuadro clínico se caracteriza por síntomas subjetivos pronunciados y la aparición de papilas gigantes, principalmente en la conjuntiva tarsal superior. Se puede distinguir entre la forma limbar y la forma palpebral. Los cambios corneales son las complicaciones más graves, con el desarrollo de erosiones corneales y úlceras en escudo. Es una enfermedad debilitante que se caracteriza por ardor y picor, así como fotofobia. Las opciones terapéuticas actuales se dirigen a prevenir el daño tisular a largo plazo causado por la inflamación crónica y dependen de la gravedad de la enfermedad. Los casos leves se tratan con antihistamínicos y estabilizadores de mastocitos. Los casos graves se tratan con esteroides locales o sistémicos y con ciclosporina bajo estricto control médico. Debido al limitado beneficio clínico y a los efectos secundarios adversos de estos fármacos inmunosupresores, especialmente en el ojo, donde pueden causar aumento de la presión intraocular, formación de cataratas y glaucoma, estos fármacos distan mucho de ser ideales, y se necesita un esfuerzo considerable para identificar alternativas.

35 Por lo tanto, existe una necesidad de nuevos fármacos o compuestos capaces de prevenir o tratar la conjuntivitis sin causar efectos secundarios.

Alergia, microbiota y disbiosis

45 La microbiota es la comunidad de bacterias comensales que habitan nuestro cuerpo (Yatsunenکو et al., 2012). Se está descubriendo que estamos compuestos por diez veces más células microbianas que de células de mamífero, las cuales contribuyen con cien veces más genes. Por lo tanto, la microbiota proporciona un conjunto de nuevas funciones que con el paso de los años nuestro organismo ha aprendido a explotar (Qin et al., 2010). Esto mejora enormemente la variación genética entre individuos que proporciona el genoma humano (Li et al., 2008; Mueller et al., 2006; Qin et al., 2010). Una función importante de la microbiota es la maduración del sistema inmune y la protección contra algunos agentes infecciosos (Hooper et al., 2012; Khoruts et al., 2010; Reid et al., 2011; Swiatczak et al., 2011). Cada vez es más evidente que, especialmente en las primeras etapas de la vida, la microbiota "educa" a nuestro sistema inmune para que combata tanto a las bacterias inocuas como a las dañinas y establezca el equilibrio entre ambas, característico de un intestino sano. De hecho, la microbiota está compuesta por bacterias inocuas simbióticas y patógenos potenciales, también llamados patobiontes (Chow et al., 2011).

Recientemente, se ha demostrado que varios trastornos, como la rinitis alérgica y la dermatitis atópica, se asocian con una microbiota alterada, también denominada disbiosis (Robles Alonso y Guarner, 2013). Una comunidad microbiana alterada puede desencadenar reacciones alérgicas caracterizadas por un aumento de las respuestas de tipo Th2, IgEs, eosinofilia o basofilia y activación de mastocitos (Cahenzli et al., 2013) (Hill et al., 2012). Además, la mucosa ocular está colonizada por la microbiota y es probable que la disbiosis sea responsable de algunas manifestaciones alérgicas o de la susceptibilidad a infecciones víricas o bacterianas que provocan conjuntivitis.

Probióticos

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que ejercen efectos beneficiosos para el huésped cuando se administran en cantidades adecuadas. Sin embargo, la administración de probióticos no debe ser arbitraria, ya que cada cepa puede producir metabolitos específicos en el producto fermentado con propiedades inmunomoduladoras distintas (Klaenhammer et al., 2012). Por ejemplo, al comparar la actividad de varios lactobacilos sobre el sistema inmune, se observó que cada cepa presenta características muy específicas (Mileti et al., 2009; Tsilingiri et al., 2012; Tsilingiri y Rescigno, 2013). Así, se encontró que *Lactobacillus Plantarum* NCIMB8826 tiene efectos perjudiciales debido a sus propiedades inmunoestimuladoras en ratones y en tejido intestinal humano sano (Mileti et al., 2009; Tsilingiri et al., 2012), mientras que *Lactobacillus rhamnosus* GG y *L. Paracasei* B21060 pueden ser perjudiciales solo en tejidos inflamados como los de pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino (Tsilingiri et al., 2012).

En cambio, los inventores descubrieron que los productos metabólicos de los probióticos, denominados post-bióticos (Tsilingiri y Rescigno, 2013), son muy seguros también en tejidos inflamados, presumiblemente porque los post-bióticos carecen de los patrones moleculares asociados a los microbios que podrían activar aún más los tejidos inflamados (Tsilingiri et al., 2012). El uso de probióticos (*L. acidophilus*) en colirios ya había sido propuesto por Bonini et al. y ha demostrado cierta eficacia en el control de los síntomas de la QCV en 6 de 7 pacientes (Iovieno et al., 2008). En este ensayo clínico, los pacientes fueron tratados con colirios probióticos durante 4 semanas, mientras se registraban los signos y síntomas de la QCV.

Si bien los síntomas mejoraron tanto después de 2 como de 4 semanas, la mejoría de los signos clínicos fue evidente después de 4 semanas. El uso prolongado de colirios a base de probióticos no se ha probado, pero no se puede descartar que pueda provocar un cambio permanente en la composición de la microbiota ocular o en la comunidad de bacterias comensales que habitan el cuerpo humano (Yatsunenko et al., 2012), con efectos impredecibles a largo plazo en la homeostasis inmune ocular.

El sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*

En el documento WO 2011/009848 A2 se describe el supuesto uso terapéutico de cepas de *Lactobacillus paracasei*, cepa CNCM I-1390 (depósito en el Tratado de Budapest), depositada de nuevo el 26 de julio de 2017 de acuerdo con el Tratado de Budapest con el CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, Instituto Pasteur, París, Francia) n.º I-5220 (en adelante también denominada B21060), en particular de su sobrenadante de fermentación como antiinflamatorio en enfermedades intestinales.

Descripción de la invención

La invención se define en las reivindicaciones 1 a 9. Se describe el uso de un producto fermentado de la especie *Lactobacillus* (post-biótico) para la generación de una formulación de colirio que protege la mucosa ocular de infecciones, reacciones alérgicas y conjuntivitis posterior.

Las ventajas del post-biótico son múltiples. En primer lugar, no se introducen bacterias vivas que normalmente colonizan otras mucosas oculares. En segundo lugar, no se producen patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs) normalmente asociados a la pared celular bacteriana, como endotoxinas (LPS) o ácido lipoteicoico (LTA), que podrían ser potencialmente perjudiciales. En tercer lugar, un post-biótico posee propiedades antiinflamatorias, de sesgo celular Th1/Treguladoras y protectoras de la barrera en las células epiteliales, incluidas las células epiteliales corneales. Por lo tanto, el uso, de acuerdo con la invención, de un colirio post-biótico es más seguro y probablemente más eficaz que un colirio probiótico, con la ventaja de no afectar a la composición de la microbiota ocular mediante la introducción de especies que no están presentes normalmente en el ojo.

La invención se refiere al uso de un producto fermentado que puede restablecer la homeostasis de la mucosa ocular y protegerla de ambos tipos de reacción. El producto fermentado se obtiene a una temperatura de fermentación no canónica. El producto fermentado puede, por un lado, sesgar la respuesta de las células T hacia una respuesta de tipo Th1, que puede ser protectora contra patógenos y contrarrestar la respuesta pro-alérgica de tipo Th2 iniciada durante la alergia. Por otro lado, el producto fermentado no favorece la inducción de una respuesta inflamatoria aguda. El producto fermentado de la invención posee actividad inmunomoduladora tanto en las células del sistema inmune como en las células epiteliales y promueve la formación de la barrera epitelial, protegiendo así la mucosa de agentes externos, siendo por lo tanto particularmente adecuado para el tratamiento de la conjuntivitis, en particular de la QCV. El producto fermentado se puede obtener mediante la fermentación de diferentes sustratos, como por ejemplo el lactato de sodio.

En la presente memoria se describe una composición que comprende un producto fermentado de las especies *Lactobacillus casei* o *paracasei*, caracterizada por contener en su genoma de ADN secuencias de ADN esencialmente idénticas a las secuencias SEC ID N.º 1 a 5, diluyentes y/o excipientes adecuados. El producto fermentado se produce mediante el método que se describe a continuación.

- 5 En una realización preferida, la especie de *Lactobacillus* es *Lactobacillus paracasei*, preferiblemente una cepa caracterizada por comprender en su genoma de ADN secuencias de ADN esencialmente idénticas a las secuencias SEC ID N.º 6 a 18, más preferiblemente la cepa depositada de acuerdo con el Tratado de Budapest con el N.º CNCM I-5220.

- 10 Los usos preferidos de la composición de la invención incluyen el uso en el tratamiento de síndromes de inflamación ocular, preferiblemente de conjuntivitis, en particular de queratoconjuntivitis vernal (QCV), en medicina humana y veterinaria.

Está dentro del objeto de la invención una composición que comprende además adyuvantes, y/u otros agentes terapéuticos conocidos por el experto en la materia para los síndromes de inflamación ocular.

Preferiblemente la composición de la invención está en forma de una formulación de colirio.

- 15 Preferiblemente, la composición de la invención comprende el producto fermentado, como se definió anteriormente, en una concentración del 2-40 % vol., preferiblemente del 10-25 % vol., más preferiblemente del 25 % vol. Está dentro del objeto de la invención un método para obtener el producto fermentado, como se definió anteriormente, caracterizado por:

- 20 a) crecer un inóculo de la cepa de *Lactobacillus* como se definió anteriormente en un medio de cultivo adecuado, a una temperatura de 4 a 40 °C, preferiblemente a aproximadamente 37 °C, para tener una biomasa y permitir que la fermentación de dicha biomasa a una temperatura de 4 a 40 °C se desarrolle durante 12 a 36 horas, preferiblemente durante aproximadamente 24 horas, para obtener una biomasa fermentada, y

b) centrifugar dicha biomasa fermentada para obtener un pellet de biomasa fermentada y un primer producto fermentado;

- 25 c) incubar dicho pellet de biomasa fermentada en una solución mínima (solución salina, tampón fosfato, H₂O, etc.), que comprende preferiblemente una sal de lactato, y que permite una fermentación adicional a una temperatura de 4 a 40°C, durante 12 a 36 horas, preferiblemente durante aproximadamente 24 horas, para obtener una biomasa fermentada adicional;

d) separar dicha biomasa fermentada adicional de un segundo producto fermentado mediante centrifugación.

- 30 El primer y/o segundo producto fermentado, obtenidos en las etapas b) o d), respectivamente, son objeto de la invención y, en conjunto, se definirán como "producto fermentado". Se pueden usar como ingredientes activos para la composición y la formulación del colirio, ya sea individualmente o en combinación.

- 35 Se describe en la presente memoria un método para el tratamiento de síndromes de inflamación ocular, preferiblemente de conjuntivitis, en particular de queratoconjuntivitis vernal (QCV), en medicina humana y veterinaria que comprende la administración de la composición de la invención a un sujeto que la necesita.

La invención se ilustrará por medio de ejemplos no limitantes con referencia a las siguientes figuras.

Figura 1: Perfil de espectrometría de masas del producto fermentado de la cepa CNCM I-5220 de *Lactobacillus Paracasei* obtenido mediante la técnica SACI.

- 40 **Figura 2:** Las CDMos se estimularon con LPS (100 ng/ml) y se trataron con o sin producto fermentado de la cepa CNCM I-5220 de *Lactobacillus Paracasei* durante 24 h. Las concentraciones de IL-10 e IL-12p70 se determinaron mediante ELISA. Cada símbolo se refiere a donantes individuales.

Figura 3: Las CDMos se estimularon con LPS (100 ng/ml) y se trataron con o sin producto fermentado de la cepa CNCM I-5220 de *Lactobacillus Paracasei* durante 24 h. Se determinaron las concentraciones de IL-12p70, IL-10, IL-1β, TNF-α, IL-6 y MCP1 mediante ELISA.

- 45 **Figura 4:** Las CDMos se estimularon con LPS (100 ng/ml) y se trataron con Flac o el control que contenía manitol y lactato de sodio durante 24 h. Las concentraciones de IL-10 e IL-12p70 se determinaron mediante ELISA. $p^{**} > 0,01$ (ANOVA de dos vías-Bonferroni).

- 50 **Figura 4:** Las CDMos se estimularon con LPS (100 ng/ml) y se trataron con Flac o el control que contenía manitol y lactato de sodio durante 24 h. Las concentraciones de IL-10 e IL-12p70 se determinaron mediante ELISA. $p^{**} > 0,01$ (ANOVA de dos vías-Bonferroni).

Figura 5: Las CDMos se infectaron con *Salmonella* SL1344 (MOI 1:1) y se trataron con Flac o el control que contenía manitol y lactato de sodio durante una hora. Después de esto, se inactivó la *Salmonella* con gentamicina (100 mg/ml) y, tras 24 h de incubación, se evaluó la abundancia de citoquinas (IL-10 e IL-12p70) en el medio de cultivo. Las concentraciones de citoquinas se determinaron mediante ELISA.

5 **Figura 6:** Las PBMCs se estimularon con LPS (100 ng/ml) y se trataron con el producto fermentado de la cepa CNCM I-5220 de *Lactobacillus Paracasei* durante 24 h. Las concentraciones de IL-10, IL-12p40 y TNF- α se determinaron mediante ELISA. El panel A indica la concentración absoluta de citoquinas, mientras que el panel B muestra el porcentaje de citoquinas referidas únicamente a células tratadas con LPS.

10 **Figura 7:** Las PBMCs se estimularon con LPS (100 ng/ml) y se trataron con Flac o el control que contenía manitol y lactato de sodio durante 24 h. Las concentraciones de IL-10, IL-12p40 y TNF- α se determinaron mediante ELISA. $p^* > 0,05$ (ANOVA de dos vías-Bonferroni).

15 **Figura 8:** Los ratones se trataron previamente con diferentes dosis de Flac (3,5 y 0,35 mg/ml) o su control, que contenía manitol-lactato sódico, durante 4 días. Posteriormente, se les inyectó intraperitonealmente a los ratones 200 μ g de LPS. Transcurridas 5 h, se sacrificaron los ratones y se determinaron los niveles de diferentes citoquinas (IFN- γ , IL-10, IL-12p40, IL-6, TNF- α e IL-12p70) mediante CBA BD Array (BD Bioscience). $**p < 0,01$. Prueba U de Mann-Whitney.

20 **Figura 9:** Las células epiteliales corneales primarias humanas (HCEC, N.º C0185C Thermo Fisher Scientific) se estimularon durante 24 horas con 100 ng/ml de LPS o *Staphylococcus aureus* Cowan I con o sin producto fermentado de la cepa CNCM I-5220 de *Lactobacillus Paracasei*. La producción de citoquinas (IL-1 β , IL-8, TNF- α e IL-6) se midió mediante ELISA en el sobrenadante del cultivo celular.

Figura 10: Se evaluó la expresión de ZO-1 mediante inmunofluorescencia en células Caco-2. En la fila superior, se muestran imágenes de células tratadas con el control; en la fila inferior, imágenes de células tratadas con el producto fermentado de la cepa CNCM I-5220 de *Lactobacillus Paracasei*. Cada fila muestra imágenes por triplicado del mismo tratamiento.

25 Materiales y métodos

Análisis LC/MS

30 El perfil de espectrometría de masas del producto fermentado de la cepa CNCM I-5220 de *Lactobacillus paracasei* se obtuvo mediante la técnica de ionización química de superficie activada (SACI) (J Mass Spectrom. 2005 Dec; 40(12): 1550-7.). El producto fermentado de la cepa CNCM I-5220 de *Lactobacillus paracasei* se trató como se indica a continuación. El sobrenadante liofilizado se diluyó en tampón PBS y se cargaron 5 μ l en un HPLC Ultimate 3000 (Dionex) equipado con una columna Phenomenex Luna C18 (2,0 x 50 mm - tamaño de partícula 3 μ m) acoplada a un espectrofotómetro HCT Ultra (Bruker).

Cultivo de bacterias

35 La cepa CNCM I-5220 de *Lactobacillus paracasei* se cultivó anaeróticamente en 3 ml de medio MRS durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se reinició el cultivo (generalmente a una dilución de 1:10) y las bacterias se recogieron y se usaron para estimulación en la fase de crecimiento exponencial, es decir, cuando la DO era 0,6 medida con un biofotómetro Eppendorf. Los sobrenadantes de la cepa CNCM I-5220 de *Lactobacillus paracasei* se obtuvieron cultivando bacterias a una DO₆₀₀ = 0,6 en MRS y suspendiendo la biomasa en solución salina suplementada o no con lactato de sodio (Flac). El medio resultante se filtró después. El producto fermentado se mantuvo en forma líquida o se liofilizó añadiendo manitol.

40 La cepa FB62 de *Salmonella* serotipo *typhimurium* se cultivó en 3 ml de caldo Luria-Bertani y se cultivó aeróticamente (en agitación) y se usó para estimulación en la fase de crecimiento exponencial, es decir, cuando la DO era 0,6 medida con un biofotómetro Eppendorf.

Condiciones de diferenciación y estimulación de células dendríticas derivadas de monocitos (CDMs)

45 Las células dendríticas (CDs) se obtuvieron a partir de monocitos de sangre periférica humana seleccionados con anticuerpos anti-CD14 acoplados a microesferas magnéticas (Miltenyi, Bolonia, Italia). Las células CD14+ se incubaron durante 6 días en un medio completo que contenía factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, 5 ng/ml; BD Biosciences) e interleuquina-4 (2,5 ng/ml; BD Biosciences) con el fin de obtener CDMos inmaduras. Las CDMos se incubaron con lipopolisacáridos (LPS) de *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich) o de *Salmonella* FB62 (MOI 1:1 bacteria:DC) en presencia o ausencia de producto fermentado de la cepa CNCM I-5220 de *Lactobacillus paracasei* durante 24 h. Se analizó la abundancia de citoquinas en los sobrenadantes mediante ELISA (R&D Systems) y mediante el ensayo citométrico de microesferas Flex (BD Biosciences).

Células mononucleares de sangre periférica y condiciones de estimulación

Las capas leucocitarias se obtuvieron de donantes sanos que firmaron un consentimiento informado para su uso en investigación. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se separaron mediante centrifugación en gradiente con Ficoll (GE Healthcare) y, posteriormente, se resuspendieron y cultivaron en medio RPMI 1640 (Lonza) que contenía suero fetal bovino al 10 % (Gibco), glutamina al 1 %, piruvato al 1 %, AA no esenciales al 1 % y penicilina-estreptomicina al 1 %. Las PBMCs se incubaron con lipopolisacáridos (LPS) de *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich) en presencia o ausencia de producto fermentado de la cepa CNCM I-5220 de *Lactobacillus paracasei* durante 24 h. Se analizó la abundancia de citoquinas en los sobrenadantes mediante ELISA (R&D Systems) y mediante el ensayo citométrico de microesferas Flex (BD Biosciences).

10 Células epiteliales corneales primarias humanas y condiciones de estimulación

Las células epiteliales corneales primarias humanas (HCEC, N.^o C0185C Thermo Fisher Scientific) se sembraron en una placa de 96 pocillos a 10.000 células/pocillo en presencia o ausencia de producto fermentado de la cepa CNCM I-5220 de *Lactobacillus paracasei*. Después de 24 horas, las células se estimularon con 100 ng/ml de LPS de *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich) o con una dilución 1:1.000 de *Staphylococcus aureus* Cowan I durante 24 horas adicionales. La producción de citoquinas (IL-1 β , IL-8, TNF- α e IL-6) se midió mediante ELISA/CBA en el sobrenadante del cultivo celular.

Condiciones de cultivo y estimulación de células Caco2

Las células Caco2 se cultivaron en DMEM suplementado con FBS al 10 %, glutamina al 1 %, aminoácidos no esenciales al 1 % y penicilina-estreptomicina al 1 %. Las células se sembraron en un Sistema de cámara portaobjetos Permanox Plastic Nunc™ Lab-Tek™ (ThermoFisher) y se estimularon con 100 ng/ml de LPS de *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich) en presencia o ausencia de producto fermentado de la cepa CNCM I-5220 de *Lactobacillus paracasei*. Se evaluó la expresión de ZO-1 mediante inmunofluorescencia con el siguiente anticuerpo monoclonal: anti-ZO-1 clon ZO1-1A12, Invitrogen, a una concentración de 5 μ g/ml durante 1 hora a temperatura ambiente. Los portaobjetos se incubaron posteriormente con el anticuerpo secundario conjugado con fluoróforo apropiado.

25 Antes de tomar las imágenes, los núcleos se contra-tiñeron con 4',6-diamidin-2-fenilindol (DAPI).

Choque endotóxico inducido por LPS

Los ratones C57/BL6 se adquirieron en los laboratorios Charles River. Todos los ratones se mantuvieron en jaulas de micro-aislamiento en un centro específico para animales libre de patógenos. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices establecidas en los Principios para el Cuidado de Animales de Laboratorio (Directiva 86/609/CEE) y aprobadas por el Ministerio de Sanidad italiano.

Los ratones se trataron por vía oral con Flac (lactato de sodio fermentado por la cepa CNCM I-5220 de *Lactobacillus paracasei*) a las 96, 72, 24 y 2 horas, antes de la administración de LPS (n = 5 por grupo). Los ratones control recibieron manitol-lactato de sodio. Se inyectó LPS de *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich) intraperitonealmente (i.p.) a 200 μ g por ratón en 200 μ l de agua inyectable. Tras 5 horas, los ratones fueron sacrificados mediante desangrado bajo anestesia y se extrajo la sangre. Se detectaron los niveles séricos de IFN- γ , IL-10, IL-12p40, IL-6, TNF- α e IL-12p70 mediante CBA BD Array (BD Bioscience), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

Se usó la prueba t de Student para datos pareados (prueba U de Mann-Whitney) o ANOVA para determinar la significancia estadística de los datos. La significancia se definió como *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. Los cálculos estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism.

Preparación del sobrenadante de *L. paracasei* B21060 (CNCM I-1390, depositado de nuevo como CNCM I-5220)

Se crece un inóculo de *L. paracasei* B21060 a una temperatura aproximada de 37 °C y se agita suavemente para evitar la oxigenación del medio de cultivo, como medio MRS. Se deja crecer la biomasa durante aproximadamente 12 a 36 horas, preferiblemente durante aproximadamente 24 horas, hasta alcanzar la concentración deseada de lactobacilos (la concentración preferida corresponde a un crecimiento del microorganismo equivalente a una absorbancia de 0,6 a una longitud de onda de DO₆₀₀). A continuación, el cultivo se centrifuga para separar las bacterias del primer producto fermentado, el primero se procesa como se indica a continuación para preparar la composición para el colirio de la invención. El primer producto fermentado se puede usar para obtener la composición de la invención.

50 Preparación del colirio, Formulación A

Las bacterias centrifugadas se transfieren a una solución mínima (solución salina, tampón fosfato, H₂O, etc.) con o sin lactato de sodio (aprox. 5 g/l) y se deja fermentar de 12 a 36 horas, preferiblemente durante aproximadamente 24 horas sin agitación. A continuación, las bacterias se centrifugan para separarlas del segundo producto fermentado, y este último se usa en la preparación de la composición de la invención. Por ejemplo, la composición se usa para el

colirio de formulación A y consiste en el segundo producto fermentado, diluido del 2 al 40 % vol., preferiblemente del 10 al 25 % vol., más preferiblemente al 25 % vol., en una solución salina u otro diluyente adecuado para el propósito, y filtrado adecuadamente. El % de dilución también depende de las concentraciones de bacterias obtenidas de acuerdo con el párrafo anterior. La Figura 1 muestra un perfil de espectrometría de masas obtenido mediante la técnica de ionización química de superficie activada (SACI). [Cristoni S, Rubini S, Bernardi LR. Mass Spectrom Rev. 2007 sept; 26 (5): 645-56.]

Estimulación de células dendríticas derivadas de monocitos en presencia o ausencia de producto fermentado de *L. paracasei* B21060 (CNCM I-5220).

Las células dendríticas (CDs) son células presentadoras de antígeno profesionales involucradas en la inducción de una respuesta inmune. Según el tipo de citoquinas que producen, las CDs pueden sesgar la respuesta de las células T hacia diferentes polarizaciones, incluyendo células T auxiliares (Th)1 productoras de interferón-(IFN)- γ , células T Th2 productoras de interleuquina (IL)-4, células T reguladoras productoras de IL-10, o células T Th17 productoras de IL-17. Cada uno de estos tipos de células es responsable de distintas respuestas inmunes. En particular, las células T Th2 están involucradas en el control del crecimiento de parásitos, las Th1 en infecciones bacterianas y virales, mientras que las células T reguladoras protegen de la inflamación y el daño tisular. En seres humanos, las CDs más estudiadas son las que se generan a partir de monocitos: CDs derivadas de monocitos CDMos. La activación de CDMos con lipopolisacárido derivado de bacterias impulsa a las CDs a producir citoquinas inflamatorias (IL-12) y antiinflamatorias. En la presente memoria se demuestra que la incubación conjunta de CDMos con un producto de fermentación de *L. paracasei* obtenido bajo una temperatura no canónica amplifica la producción de citoquinas por las CDMos, incluyendo IL-12p70 e IL-10 (Figura 2). También promueve el aumento de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , pero no de MCP-1 (Figura 3). Se han obtenido también resultados similares usando como sustrato lactato de sodio (Lactato Fermentado, Flac) en respuesta a LPS (Fig.4). Cuando se usó *Salmonella Thyphimurium* como estímulo, se observó un ligero aumento en la IL-12p70 y ningún cambio en la producción de IL-10 (Fig.5). Estos resultados indican que el producto fermentado de *L. paracasei* tiene una fuerte actividad inmunomoduladora sobre las CDMos que sin embargo no está sesgada a la respuesta inflamatoria o antiinflamatoria.

Estimulación de células mononucleares de sangre periférica en presencia o ausencia de producto fermentado de *L. paracasei* B21060 (CNCM I-5220).

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) son una población celular heterogénea que incluye células inmunes mieloides y linfoides. La amplificación de la respuesta inmune observada en las CDMos sugiere que el producto fermentado de *L. paracasei* podría promover la activación de la respuesta inmune. De hecho, al analizarlo en PBMCs, el producto fermentado de *L. paracasei* provocó un aumento de las citoquinas IL12p40 sin afectar a los ya elevados niveles de IL-10 (Figura 6). Se han obtenido resultados similares usando lactato de sodio como sustrato en respuesta a LPS (Fig. 7). En conjunto, estos datos sugieren que el producto fermentado podría activar las CDs por un lado para una activación adecuada de la respuesta inmune y mantener un nivel elevado de IL-10, lo que protege al huésped de la inmunopatología.

La administración in vivo del producto fermentado de *L. paracasei* B21060 (CNCM I-5220) modula la producción de citoquinas inducida por LPS.

La administración de LPS in vivo en ratones induce lo que se denomina una tormenta de citoquinas que puede provocar un shock endotóxico. Al administrar a los ratones primero el producto fermentado de *L. paracasei* B21060 (Flac) y luego LPS, se observó un aumento de IL-12p40 e IL-10 y, como era de esperar, ningún cambio en las citoquinas IL-6, TNF- α e IFN- γ (Figura 8). Esto sugiere que el producto fermentado de *L. paracasei* no influye en la inducción de respuestas Th1 protectoras y que, al aumentar la producción de IL-10, estas no inducen inflamación manifiesta.

Estimulación de las células epiteliales corneales en presencia o ausencia de producto fermentado de *L. paracasei* B21060 (CNCM I-5220).

Las células epiteliales corneales protegen la cámara interna del ojo de la infección por microorganismos. Estas células producen una serie de citoquinas inflamatorias que pueden mediar la inflamación. El producto fermentado de *L. paracasei* B21060 puede inhibir la respuesta inflamatoria en las células epiteliales corneales en respuesta a LPS. Las células epiteliales se estimularon con LPS en presencia o ausencia de producto fermentado de *L. paracasei* B21060 y se analizó la producción de citoquinas. Como se muestra en la Figura 9, el producto fermentado de *L. paracasei* B21060 podría reducir drásticamente la producción de IL-8, IL-1 β , TNF- α e IL-6. Esto indica que el producto fermentado de *L. paracasei* B21060 interfiere con la producción de citoquinas inflamatorias y contrarresta la inflamación.

Análisis de proteínas de unión estrecha después de la estimulación de células epiteliales en presencia o ausencia de producto fermentado de *L. paracasei* B21060 (CNCM I-5220).

La Figura 10 muestra en la línea superior las imágenes de células epiteliales de tres experimentos diferentes, tratadas únicamente con una solución de control, mientras que las imágenes correspondientes de la línea inferior muestran las mismas células, esta vez tratadas con el sobrenadante de la invención. Al examinar estas imágenes, se observa que las uniones estrechas se modulan positivamente (sobrexpresan) como resultado del sobrenadante de la invención, mostrando notablemente mayores propiedades de barrera.

Los sitios de mucosa contienen células epiteliales altamente especializadas, que están selladas por la presencia de complejos de unión, que incluyen la unión estrecha (TJ) y la unión adherente (AJ). Estas forman una barrera física estrecha que mantiene la homeostasis tisular y protege de agresiones externas. Las alteraciones de los complejos de unión son la base de varios procesos patológicos. El producto fermentado de *L. paracasei* B21060 favorece la formación de TJ. Se crecieron células epiteliales (Caco2) para formar TJ en presencia o ausencia de producto fermentado de *L. paracasei* B21060 y se analizó la expresión de ZO-1. Como se muestra en la Figura 10, el producto fermentado de *L. paracasei* B21060 favorece la formación de TJ al aumentar la expresión de ZO-1. Esto sugiere que el producto fermentado de *L. paracasei* B21060 puede potenciar la formación de una barrera epitelial que protege el tejido de agresiones externas.

5

10 Secuencias

A continuación, se describen cinco secuencias de genes que representan genes centrales específicos de las especies *L. paracasei* y *L. casei*.

SEC ID 1

ATGAATCAAAAAGCTTTGAATCAATTTCTGAACTTACCTACACAGAACAAGTGTCCGGTTGTTGGC
GGCGATTTGTGTCAGTCGAAGTCATCATGAAAGGTATCTTCACCGGTATCTTTGATGCTGGGTACCA
AGTGGGTGTCAGTCAATCGCAAAATGGGTTAAGTAA

15 SEC ID 2

ATGAATCAAAAAGCTTTGAATCAATTTCTGAACTTACCTACACAGAACAAGTGTCCGGTTGTTGGC
GGCGATTTGTGTCAGTCGAAGTCATCATGAAAGGTATCTTCACCGGTATCTTTGATGCTGGGTACCA
AGTGGGTGTCAGTCAATCGCAAAATGGGTTAAGTAA

SEC ID 3

ATGCCCAAAAGGGTCGATCAACATATACGTTACGCCTTAAAGGCTTTACTTTAATTGAAGTGGT
GGTCAGCCTGATTTTACTTGCGGCGGTCATGCTGTTATGGCGACCGGTTTTATTGCATGTCACGC
GGTTCACGCTTCAAGACCATGTGCTAATCACGTCATTGCAAGCAGAGCATGACTTGCAAATGTTT
GTACGAGATAAAAAGTTGCGGTCTGTGGCCTTAATGTCCGGTAAGGGTGAGAAGTCCCGAGAAAG
CTTACACGATCAATTTTATCAGACCAAACATTTTCGCGGTATGGTTCGTGTGATGGGATCTGAAA
ATGGGCATATGCCATTATTTACGCATCTAACCGGTGTCAATTTTAGCAAGGTAGCTCAAGGCTTT
CGCTATCGTCTGATTTGACGACTTCGCAGAAGATTGACGGTGGGGTGCAAATCGATGAAGATA
CGCGGTAG

SEC ID 4

ATGGCCGCTGATTTACCCAATTACAACAAGCCATTCGCTTGCTCAATGCCATACTCGAGCTGC
TGATGAGCAAGCGTGGCAAGTGCTTTTTGATCGTTGGCTGGCAACTTTATCCTCTGAAACTCGCC
GGCAAATGCAAACAGTTCCGGTTAATCATGCCCAATTGACGTTACTCACAACGCTGGATCAAAGC
AGTCGCAAACAACTGCGCAATCAGGATTTAACCGCTGCTGTTCCGTTCTCACAAGGCCTAGTCTC
ACGCTATGTTGCTCGCCTTGTTCAATTAACCTTGCTGACAAAATTATCCTTGCCCGACAATCGCAA
GGCCTACATTGTTGCACTAACTCCGCTTGGTCAACAAGTCGCTGCCTTACATCAGCAAATGCATC
ATCACACAAATGCTCAACTCGCCTCTGTACTTCATACCCTTGATCCACAAGATGTTCAAACCTACCA
20 TTCAGGTA CT CACAAA ACTGACGGCTCAGCCTTACATCCCAAGTCTTAG

SEC ID 5

ATGGGCGGTGTCATTTGTTACGCGGTGCCGGTCTTTTGAAAAGAATACTTCGCAGACACCTGAT
TCACGAGATTAAGACCCTGAATCAAGGATTGCAGTTATCAAGCAAAGCCATGAGCCAATTAATTG
ATCCGGAAAATCCTTATATGGTATTTGCTGATGAAAATGGTGAAGTGGATTTTTATTGTTGGC
TAGGCAACTTGCGTCAATTGAGGCGTGAAGTGCCTAATTAAGAACAGAAAGCTAGGGTTTGA

ES 3 018 261 T3

A continuación se describen secuencias únicas de *L. paracasei* B21060 con respecto a la especie *L. paracasei*, disponibles públicamente en las bases de datos del NCBI. Las SEC ID 6 a 8 corresponden a secuencias génicas, mientras que las SEC ID 9 a 18 corresponden a secuencias de ADN genómico.

SEC ID 6:

ATGAGTAAATATAAAGTTATTATTTGGGGATTAGGAAACGTTGGTCGTTCCGCAGTGAGAATGAT
CGCGGAAAGACAAAATATTTTTGAATTGGTTGCAGCCGTTGACGTTGATCCAAAGAAGTTAGTA
AGGATGCCGGAGAAGTCTTTGATTTTGACAAAGTCGGCGTCAAAGTTTCAGATGATATTGATGCA
GCCTTGAAACTTCCAGCTGACATTGTGCTCGACTTTTGCCCAACGGAAATGGACAAACAAGGAAC
ATTCATGCCTTCTGCTATTGACTCGCCAAATCGCTCGATGCCGGTAAAAACGTTATTACCACGA
TTCCGGTATATCATGTTCAAGACAGTCAGCCAGAAGTATATGAATATCTAAATGAACATGCTAAAG
CACATAATGTTGCTTTTGTACCATTTGGACTTTTGCCAGGCGATTATGCCTCATATATCCCCTAG
TTTTGGCCGGGGCCATGGGCCACGTGGATAAAATTGTTGTTCAATCCGGTGAAGATGACTGGCA
CAACACATCAGGCTGGGTGATGTCTTCTCATATGGCGGCGATATCAATAAATATCCAAAACCAG
ACTCAGACGAAGATCTCTTGGCTAAGTTCATTTATGCTTATTATTCATCCGGCGTATACGAGATGG
5 CCGATAGGATCGGTCTGAAATATGATACCTTCAAACCAGAGCATGAAGTCTTCACTGCACCCAAA
GATTTGGAAACGATCAAGGGTACAGTCAAAAAGGGCAGCATTTATGCCACAGATTTACCATGGC
ACTTTACAACGGCAACGAACAAGTAGCCGCCTTAAGATATGTTTCATAAAGTTGATAATAAAGAGA
CACCAGAATTACCGATCAATAATACGATTATATTGAAGGCTTGCCGTCAGTCGATGCGCAGATC
GATGGATTGATCCCAGAAAGAGAAGGCTACGTTTCATCAGCCGCTCCAGCAGTCAACTTGATCC
CTAGCATTCTCGAGACCGACAAGACAGGTTATGTTGAAGTCTGCGACCTTCCAGTAGTGATTGCC
AGGCCATTGGATATTGGCGCAAAAAAATTAGTCTAG

SEC ID 7:

ATGGCAACCTATTCGCAGATAGAAGTACATAATCAAATCATTTAAAGGGCTGATGAAAGACCA
TGAATTCAGTGAATCTCAATTAATAATGATCGCTGAAAAAGCCGATATCACTCGACGCGGCTTTTA
CAATCACTTCTTAGATAAATATGATCTTGTGAGTACCATCTTTGAGCATGATCTTTTTCCAACAGTC
ATCAGTTTGACGAATATCAATGACTGGGATCAAGGGTCGCTGTTTATCGTGAATTATCTCCAAGA
CAATCGCGACTACTATAAAAAATTGTTGTCGCTTGAAGGACAAAACGTTTACAGACAGACTTTTA
TAAATTGACTGAGATGCAGATTGGGATCTTGATCCCAGAAATATTGGTCGGTAGGAAAATTTCTG
ACGAAGATCAGGCATTTTTAAGCGATTATTATTTTACGCTTATATGGGACTGACTACCGAATGGG
TCAAAGGTAAATATGGTTTTTCAACTCAGGAGTTCGTTAAACGGTGGAAAGCCTTACTCAATAATT
CAATGCATAATTATCTGGACAACACTACGCTCGATGA

ES 3 018 261 T3

SEC ID 8:

ATGAGTAAATATAAAGTTATTATTTGGGGATTAGGAAACGTTGGTCGTTCCGCAGTGAGAATGAT
CGCGGAAAGACAAAATATTTTTGAATTGGTTGCAGCCGTTGACGTTGATCCAAAGAAGTTAGGTA
AGGATGCCGGAGAAGTCTTTGATTTTTGACAAAGTCGGCGTCAAAGTTTCAGATGATATTGATGCA
GCCTTGAAACTTCCAGCTGACATTGTGCTCGACTTTTGCCCAACGGAAATGGACAAACAAGGAAC
ATTCATGCCTTCTGCTATTCGACTCGCCAAATCGCTCGATGCCGGTAAAAACGTTATTACCACGA
TTCCGGTATATCATGTTCAAGACAGTCAGCCAGAAGTATATGAATATCTAAATGAACATGCTAAAG
CACATAATGTTGCTTTTGTACCATTTGGACTTTTGCCAGGCGATTATGCCTCATATATCCCACTAG
TTTTGGCCGGGGCCATGGGCCACGTGGATAAAATTGTTGTTCAATCCGGTGAAAGATGACTGGCA
CAACACATCAGGCTGGGTGATGTCTTCTCATATGGCGGCGATATCAATAAATATCCAAAACCAG
ACTCAGACGAAGATCTCTTGGCTAAGTTCATTTATGCTTATTATTCATCCGGCGTATACGAGATGG
CCGATAGGATCGGTCTGAAATATGATACCTTCAAACCAGAGCATGAAGTCTTCACTGCACCCAAA
GATTTGGAAACGATCAAGGGTACAGTCAAAAAGGGCAGCATTATGCCACAGATTTACCATGGC
ACTTTACAACGGCAACGAACAAGTAGCCGCCTTAAGATATGTTCATAAAGTTGATAATAAAGAGA
CACCAGAATTACCGATCAATAATACGATTCATATTGAAGGCTTGCCGTCAGTCGATGCGCAGATC
GATGGATTGATCCCAGAAAAGAGAAGGCTACGTTTCATCAGCCGCTCCAGCAGTCAACTTGATCC
CTAGCATTCTCGAGACCGACAAGACAGGTTATGTTGAAGTCTGCGACCTTCCAGTAGTGATTGCC
AGGCCATTGGATATTGGCGCAAAAAAATTAGTCTAG

SEC ID 9 Posición 102558..102986

AAAAACGGCTTAGAACGCTCATATTTGCGTTCTAAGCCGTTTTTATCAGCATAGGTTCTTGACACC
AATAAACATCTTTAGTAATTGATCAAATTTAGGCAATGTGCTTTTGTGGTGAATGGCGATAGCCC
TACCGAAGCTTCAGCTGAGGTTCTTCTGAGCCACGCAAGCGAAGCGCGCTAGGGCAAGCCAAC
GGCGCGCAGGCGAAGCCGGAGTTAAATGTGGCGCAGCCACACCTTTTTAGGGAGCAACGCGAC
CAGAATTTTGTATGGGGTTTGGGAAGAGTTCTCCCCAAGGTCTTTTGTGGTTATTAACAAGCAA
AACACAAACACAAGCCTCGCGCGGTTATATACTTCTAAATACTTTTAAATACTTTAAGTACTTA
GGGAGACGAGAATGGCTCAACCACGCGTTTAAATCGACT

5 SEC ID 10 Posición 103624..103864

ACGACCTCTCGACCACCCACTGCCTCACCAATCCCCAGGTGAACCGGGCCAAGGGCACTACCG
AGCAACCCGACCCCTATATCCCGTGGGCGTGGTGAAGCAGACCGATGGGGGCATCGTGGTGC
GGGGCGCGCGGATGCTCTCCAGCTGCCACGCGGATGAGCTTTTAGTCTTCCCCAGCACTT
TGCTCAAAGAAGGGCCGGGAGCCGACAAGTACGCCGTGGCTTCGCCATCCC

SEC ID 11 Posición 254291..261674

ATTGATCGCCTCCGGGTCACCTTATATGTAACATAAATACTCCCTTCTCTCTTTAGTTACAATAGG
GTACAGCCTATCGAATCACTTACGCTTCCACTTTGAGATAACTTTTCGTTATTATTTATCAACGGC
ATTAACGATATCATTAACTGTTTGAATGCATCGCTCAGTACACTAATTTGGTGCTTGTTCATATA
CTGCATGTGTCGTTGTACAAAATCAAAGGTGTGAAATTTGTAACGGATTACAGTACCCTTCTATTTT
TTCAGTCTGAATCGGTACCATCAAGCCTGTTTCAGCTAAGCGATTATGTTTGGCATGCGTGATCG
GACAAACCAACGCTAATCCAGTCATTTTGGCATATTGTTGATTGCTAATAACGAGCGCTGGTCTG
CTTTTTGAATTTTCATGACCCCGACTTGGCATGAAATCAATACTCACAACATCACCTTTGCGTGGT
TGATAATGCCTAGTCCCACCTCCTTGGTAATACCTCGTTTTCTAACGTAATATCTTGTGGTGATC
TTGTTGCTTGTACCAATCACCTTCAAATGGATTGCGGTGCTTCGGCAGATAAAGAATGCCACCAT
CATCAGTTGCTCAACTGAAATTCAGTTCATCGGCGATTTTAACTCTTTGGAATGGTTAATG
TAATGGAATTTGCCAACCTTCTTGTCTTAACTGTCATTGAAATCATCCTTTTGTATACACCGAGTA
TACACCAGCGGAATGAATCTGCAACTCTTGTGCCCTCTTGTGTACAAAACCACTGTCAATTTA
CTTTTGCCTATTGTGCTTTATCTCTTCTGTTCTGTCATTAGTATGCCACCAACACGGCCGACTTC
ATCCGGCTCACCTTTGATGACGCTTGAATACCATCGATTTGCTTCCAAGTCTTTACTTCCAAGTT
CTTCAAAGACTTTGATATCGTTTTTTCGATGCGGCAACACTTCTTCTTCTGATGCCTTTCAAAG
AATTCCTCTAGATCATTTCATCAGAGATTCTCCTCACTTAAACCTAGTTGGCGTCAAATTCATCTC
AGCAATCGAATCTTCTAGGCTGTCCATTACTTCGTATGTTTCAATGAAGTTAACCCAGCTGTCATA
TGGATGATGTTTGTCTTTTAAATGCTAGTTCTAAGCTTTTCGTACACGTTGTCAATAAACTGCTCA
ACCATCCTATTAAACCGCAATTAATAACCGCTTCCGTTCCACTGCTTAGATGCTGCACGCTTTCGA
TTTTGACTATGCTGATGGGACAGCGCCCGGCTTCTGAACAACGCTACTGCCCTGCTGTTAGCATT
CAGATAGGTTTCAAATTTCTCACGATCCATTACGTTTCTCCTCAAATAAGCCTCATTTTCATAGC
ACAGCTTACAGCAAAAGGCATGTCATCCTACATGCCTTTTTCTGTTGCTCTTCAATATCAGTATAA
AAGGCTTCCGCGCTTAGGCAAAAGCTATGTTGCTATTAAGAACATACGTTTGTATAAACTATA
AAAGATTTAAAGGAGGTCAATCGTATGGAAAACAATGTCGCGGTGAAAAATGGCTTTACCCTGA
CCGCTGCATGAAGAAATGGCTGGGCTGGATTCTAAGCGACCATTCCGCCTATATGGAAGAAGCG
GCTATCTCAGAACAACCGGTGCTCCCAAAGCCTGAACAGACACAAGAAACCATTAATGGCGTACT
CGAAGATGCTTGGCAAAACTCAAATAATTGTCGCGATTCAAATCGGTACGCCATACGATGATCTTC
TGTTACCGGATATTGAAGGCGCGGTGATTGGTCATTGGGACGCTCAGGTTTATCTACAGCTTAAA
ACTGGTGAGATGCAATCCATTAATGCAGCGGACATTGCAATGTGCAACTGCTCAATCCAGATCG
GTGGTGGGCGTTAGTATGACGACACCATTAGATGATCCAACAAGGTTACCGGTACACGACATTAT
GTGCATTGACTGTAAGTCTTTTTACGCCTCAGTTGAAGCTATCAGACGCGGGATTATCCGTTAG
CCGCCGACATTGCTGTTCTCAGCAAAAGGTAATTCTCCTGGCGGTTTTGGTGTGGCTGCTAGTCC
CAACTGCAAAAAGCGTTACCACGTAGGACTGAGTACACGCGGTTTTTCAGCTAAGGGACGATATG
TAGGTAGAATTGCTGAACCGCGGATGGCTAATTACATTGCAAGAATTACGGTATCAATCGTAT
TTACCGTCAGTTTACTGACGATGCTCACTGGTCTCCCTATTCCGTTGACGAGTCTTTTATTGACGT
TACCCACCCCAACAATCTCTTCCGTTCTAATGAAGAAATTGCTACCCAAATACAGAAGAAGGTGT
TTGATCAGTTTGGCATTGTCACAACAGTTGGCATTGGGCAAAATCCCCTATTGGCAAAATTAGCC
CTAGATAACGAGGCTAAGAAGTCAACGCCTTGGCAAGCCACTTGGACTTACGATCGTGTGCCAG
AAACAATATGGAAACTTGATGACTTGGTTGATTTTTGGTTCGATTGGTAATCGAACTGCCAAGA
CTTAACGCGATTGGCTTTCATAATCTTTACGACTTGGCTCATGCAGACCGCGCCATTCTGCACCA
AAGATTCGGTGTCTCGGTGATGCCATGTACTTTCACGCATGGGGTATTGATTACTCAGACTTAA
CCCGCCGCTACTTACCACGGGCCGAAAATAAAGGCTACGGCAATAGTCAGGTAATCATGCGTGA
TTACACTCAGGCAAGGGAGATTGAAGTCATGCTTAGCGAGATTGCTGATCAAGTGGCTGGCCGA
ATTCGCCATCACCAAGTCCAAGGTGAGGTCAATTAGCGTTGGCATTGGTTATGCTGATGCAGAAGA
AGCTGGCACCTCCGTTTTCCGGTGCAGCAAAATGAAGATTGATCCCAAAAATCGCACAGACGATTTA
ATTCGCGCTACTCGATTTCTTCCATAGTAAGTGGAAACGGACACGCTGTTAGAAATGTCTCAGT
TCGCGTTAATCGCATCAGCCAAGCAAGTACAATGCAACTTAGTCTATTTGAATCAGCAGAGAAGG
AGGAAGCAAACGCGGCTCCTATGCTGTAATTACGGATAAAGAATCACCATCATTAGGTTTTTCG
TCTAACAATTTAGGAACTTCACTTTCTAGGTCGTAACCTTATTTTGAATCTAGGTTTTTTTAA
ATATATACATTTAGCTCGTTTTGTGTTAATATTATAATCACAACATACCAATGATAAATGTCTAAC
ATAAATATACAAACATGTTGACAGAAGCTCTTGAATACGTTTACAATTATTTTCGTTACGGCGAGCT
TTGTTTTTGAAGGATTAATAACAAGATAACTAGGTTAGTGGCTGTTGAATTAGGCCCCCGATT
CGGGACCACGACAGTCACTTGATACTCGATTTTTATCGTTTGTGGCTTGTGATCGTACATTGAACG

AAATTGGTACAGAAAAAGAGCTAAGAGCCGCTCCAAATTAGCCAAAACGATTGCGGCGTCAATG
 CTTACGGCGATCGTTTCTGCAGTTTTAGCTGTTACCAGATCAAGTCCTAGTTTCCCTTTGATGAAG
 GCAAACCTACGCTCGATCTCACCTCGTCGATTTTCGGCTTGTGCGGTCTGCCCTACGTTTGCCCG
 GATCGACCTGCTTCGGCCGACGGCCCAATCTAGGACCGCTAAGTTTGATCCCAAGATCTGCGCA
 CAGCCCGATATTCGCCCGAGTCCGATAAAGCGTATCAGCCAAGATCTCATCCGGGTATGTACCA
 TACGTGTCAAAAATAATGGTCGATCGTTGCTGGTAAGTCAGCACTTTCGTTAAACGCATTGAACGC
 AAACCGTTCAACGGCCACGACGCCATGACTGATCGATACGTGATCTTTGGGCCGAATTGGACC
 GGATCCTTTGCTTTGCCGCGAATGATCGGTGCGATCGCTGTTGATCAAGGCTTACGATCCGAT
 CCGCGACTCGGTGAGTGTGCTGTGATACATTTAGTTTGTGCTCATACAATTTTCGAATGATC
 GTTAATCGTTGTCTGCCGTTGATTCAATTGCCCGCCTTGTGCTTGCAGTCTTTGACGTAACG
 CAAGTCACGTCGGATGTAATGAGCCTTGATCTGCTTATGGGTCGTTTTACCCCAACGGC
 GGGTTTACGTGAAAAGGCGGTCCACGTTTGGTGGGCCTTGGCCTTATAGGTACGCGCGGTTT
 GACCGCTAATTGCTTTGGCCATGGCTGCGATGAATCGCTCTAAATTGAGCCGCGCCTGATTGAGT
 AGCTGCGTATCCTGCGGATACTTGATCTTACTGGGACCGCAGTCGCATCAGTGATCAAGATCTT
 CTGATGGCCAAGTTAGCTTGGAGGCGATCGCGGACAAAAATCGTAATGATGTTGCTGATCAACT
 CGGAAAGCGGCGGATCCGGCGCCTGAAATAGGACAGCACCGAAAATGAAAACGGTCTTGGC
 GCTGATACTCTGGCAGGCCAATAAAAATACTGATAAGCCGGTGTATCGCGGATCGCTGCGACTAA
 CTCACGGTCCGATAGCTGAGTGCCTGCTTGTGATCAGTTGGGCGCCATAAAGCAGCCGAAAGGG
 TTTACCTGCCCATCCTAAGTTAGACGGGAAAGCCAATTGGTACGCCCTTCTAGTTGCGGCCACG
 GAACTTGGTCGGCCAGTTGGACCCACTCGTTACTGGAATTAATGGGGTCTTAAGCCGCTACC
 AAAGCTTTGATCGATAATTGAACGGCTTTTCGAGGATAAACCATGATCCATGCCTCCGATAGGG
 TCGTGTCAAATGCAAACGAAATGAGCACGATCCGTAATTCATATGCATTCAATATACGACGATAA
 CGGGTTCAACTCGCATCAAATGTGGTTATATCAAATTAATCAACAGCCACTAGGTTAAGATCTTCA
 TTTAAGTGATATTCATTTGCAAGCAATTGAAAATTAATCAACAGCCACTAGGTTAAGATCTTCA
 TTGGATAGCACGCAATCACTTGCTTTAAGAAAATCAGTTTCTTTAATGAGTCTCTTAAAGGACGG
 GGCTCTCACTTGTACTCACAATCAATGTTAACTGGAGATCAACAATATGGTCATAGATCCCATAA
 TAACATTTGACTTGACTATCTAAAAGAGGCTTCTAACTTTGATATTGTTGGGGTTATTGTTGCTTG
 GCTGTAAGCAGATAATCTTAACTTGGGTTATTTTCAATGTTGTTGTAAGACATTTGTTATAAAGCC
 CGAAGTTATCGCTTTGACTTGTAAATAAATTTTTGATTGAGATATCAGAAAATAAACGGGGGAT
 AATAATGAAAAGATTATTAGGATTGTTCTTTGTGTTGTTAGTTGCGTTAGTATCATGGTCGGATC
 GCTTGGGTTCTATTCAACTCCAAAGATCGTTAAAGCCGACAGTACATCTGTTACGGATGTGACAA
 TTAATACCTATATTTCTAGCATGACACTTGATCAAAAAATTTGACAAAATGTTTGTAGCACGAACCT
 CACAAGATACTGATAAAGCTCGTGCTGATATAGCAAAAATAAATCTTGGCGGGCTGATTGTTTATG
 GTGTTGATTTCACTAGTGTTAAAGGGACAACAGCTACAGAAGCTCAGAATAACTTCAAGATGAAG
 ATGCAAGGCTTTCAAACCTCGGCAAGTCTGCCACTATTGATTGGTGTGATCAAGAAGGAGGGG
 CAGTCTCAGCCTTATCAAAAATCCTTAATGGCAACGGCAGAAGTTTTCTTACCACAAATG
 GCTTATGCTAATGTTGGAATGACCAATGTAACAAAAAGGCTAGTGAAGTGGAACTATTCTAAA
 AAATCTGGGCATTAAGTGAACATGACACCAGTTGCCGACAGTACGCCTGACACCTCTAGTTTTA
 TTTATGGTAGAACCTTTGGTCAAGATTACTTGGCTACTGCAAACTATATTACGAATGTGATCCCTG
 CGTGGCAAAATGCTGGCATTGCCGCAACTCTCAAGCATTTCCCTGGTTATGGATCCGCGATTGAT
 ACGCATACGGATTTTGCAGTCGTTACAAAGTCTAAGGAGGATTTTAAAAAGAGGACTTGTCTCC
 CTTTAAAGTCGGTATTACAGCAGGGGACAGATTCTGTAATGATTGCACATATAGTAATGCAAGCTG
 TTGACCCAGTGTATCCAGCATCATTATCAGGAAAGGTCGTTACCGATTTGTTGCGTAATGAACCT
 GGGTATAATGGCTTAATAATTACCGATGCATTGGAAATGGGGCCATCAAGCAATTTGCTCAAGA
 ACATGATCAAGTTCCCTGTTGATGTTCTTGTGTTGAAGCAGGGAATGATTGCATCATGAATAACG
 ATTATGAAACCGCTATTCACAGATTATGCAGCAGTAACCTAATGGAATTAAGGAATCAGAAA
 TCAATGAACACGTTTTCCGTATTCTTGATCTCAAACGCAATTAGGGTTGTTAACTAAAGGACAAC
 TTCAGCAAAAAAAGTTACGGTTGACAATGTTTCTACAGCAGTGACAAACAAAAAGGCAACTGTG
 AGTGGAACAGTTGTTGATAGTGATTGGCAAGTTGGAGAACCATTATCGGTTAAAGACTCGACTGG
 GAAGGTCATTATTACCGCAGACGTTGGTGGCGGTGTAAGTTTACTTTTCGATGTTCTACTAAGT
 CCCAAGAACAAGTATTAAGTCTGACTACTAATTTACCCAACATCGCTGATTCTCAAATAACTATTAA
 GGCTGTGAGTTTATCGAATACTAACAAGCTTTGCTAGAAAACTTGATCAACGCTGCTGAACAGT
 TGGATAGTAATCAATATACTGTCAAGTCGTGGGAAGAATTACAACTAACTAACTGAATCAAAAT
 CGATTCTGAACAATGATAGTGCTACACAAGATCAAGTAGACGCTTCCGTTAATGCTCTACAAATTG
 CCCTTAAGCAATTAGTTCCCTGTATCAAATAGCGGAAATAATGGTCAAAGCTCTAATGATAGCAGTA
 ACCAAAGTTTATCTAGCAGTAGTGGCAAGAATCATCCAGCAATAGCAATGCCAATATTACTAGT
 AAGGATCAGTCAGCTAAGGATTCAAATACGAGGCCTAAAGACCATAGTCTTTTGGCAAGTACAGG
 TGAACGGGTGATGACGGGAATTTCTGTTCTAGGGTAATTTAATAGCTTGTGTGACTATATTATA
 TATTCGGAAAAAAGGACGCAGCTTTTAATTAGTCTCTGCGTCAACTGGCGTTAAAAACTAGATTGA

AGTAATAAAGTTACCACCTGAAAGAGGCATGCTCATTGCTTGAAGGGTGTGCGACGTGTAATAG
 AAAAGTTGGG

ES 3 018 261 T3

SEC ID 12 Posición 325750..327159

TGGCGTGGGCAACGTGCACGTTTTCTAGTCGCTAAACTGTGAACAATGCTCGTGCTAAATGCAAA
ACTGAGCAAGGAGATGAACTATAAGCGGGGGACCCTTTGCTATTGAGGAGGAAGGCCAAGTAGA
GAAAGAGCGGTGATTTGAACTCGAAACAGCGCGCCGCGAGGCTAGCAGCACTGTTAGATTAATC
GCCAGCAGCAGATACTAGACAGCTTCTTAAAGGCTTGATAATAGCGTTGCGCCATTTCAATGGAA
CTAGTGGTCAAAATCGCATTGTAGTTGCCATGACCCAAACTCGTTTTACGCGGGCCTTTTTGTAA
AATATATTGAACAACCTTGGTTAATATGTTTCATCGGTCTCAAAGTCAGCCGGAGTTAAATACGTTTC
TTCCAAGTCCCTTCACTGACATCGCTTGAATCTTGGCTTGAATTTTCGCTTCATCAGCCGTACTCAG
CAGCGGCGCTTGTATCAGCAGGAGCTTTAACCGCGTGAGTTTCTTTTTCAAGGGCCCCGGGT
ATTAAGCGCTCTTACC AATCGTTGTCACGTGTTCCACATTAATGGTAACACTGCTTGGTCCCTCT
AAGGCGTCTCGCAAGTTATAAATGACAGACTTTACCAAATAGCTCCTCCGTGTAAGTACTGCTAG
ATCACCTTTGAGCTGTTTCTATTTTCATTAATAAATGGGGGTGCCAGTGTAAACCATACCACTTACT
ATTGATAAACGCTGCTCGAATTTCTTTTGCATCTTACCAAATGCGACCGGTGGACTTCTTCAAC
AAAGAAGATCACCGGTTGCTTAAAGTCTTACTAAAGCGGGATTGCTTACCGGTTGCCAGCTGGA
CTTGCCTTTTTTTGACCGCCCGATGGAGCTTTTGAATCGAGGTGACCAAGACCTTACCGTCATTT
TGTTGCAATTTACGCATTAATCACCGGTGTTTTGGGCTTGGTTAATGGCAATATCATCATTGGCA
GCATAGGCACTAAAGTTGCTGGTTGCTGTTGCTGCTAAATCCCGCCGGTCAACTAAGAAGATGAC
CTTATCGACACCAGGATCTTGCAGCAGCTAATTTAGCGGTTTTATATGAGGTGAGTGTTTTACCAG
AACCCGTGGTATGCCAAACGAAACCATCTGATGGTGCATGAATCCGGTGCATCACGGCTTCAAT
CGCATAAATCTGGTAAGGCCGTAAGAGAATTAAGCTTTGCCGCTCTTGGTCGATGACTGATTAAT
CACTGACCATTTTGTGGGCCATGGGAATATTAAGGACTTGGCGCGTGAACGCTAACCCGTTTTTCC
ACGGGGTGATTATCCCGCTCCGCCAATTGAACAAAAGGCTTTATTGAAATGATCCGGTTCGG
CATTGCAAAAATACGCCGTACTATCCGGCGTCATAATCACAAAC

SEC ID 13 Posición 328723..329314

CGATCTAAAAGCTAAGTATTTTTCCAAGATATCAAACAACCTTCTTAACCCAAGAATCTTCCACACAT
AGGACAATAATGAATCCAAATAGATTACGCTTTTTCTGCAAACCGGGATCAGTATAAACGTCCA
GTACCCGGATAATCACGCATTAAGTTACAGCTGCCAATGGGTATCATCTAAATTAAGAAAGATCCGATT
TAGTGTCTCCCTTACTACATTATGGCAATACACACAACCTGTTGTTATACATGCTTCCCTTGTCTTTT
GATTTTAAACTCCTCCATTTTGCATATTATAAGAAGATTACTTCTACTTGATATATAGATGCTTTCC
TTGCGAGGGTAAGTCAGACAAGGAAGCATTCTAAGTTGAGATACCTAAGCTTGTCTCAATAGAT
GTAGATAGCGGCTCCCAATCGGATATTAACAGCTCAACTAGTCAAACCAGATATATAAATGTGA
CACAAGCTGGAATATATCATTATCTAGATAATTCAAATTGAGCTAATAAAATCAATAAAGAAAAT
TTTTAAATAACATTATTTATAAACCCCTTAGGATTTTCCCGATTGATATTCTACGTATGTT

5 SEC ID 14 Posición 2002858..2005090

GAGTATCCAAAAATACGACGGGTATTTGAATAGGATACTTATTAAGCGAGAATGGTATTGGAAAT
CTGTGGCAGCCACTCAGCGGAACCATACCTTTATCCCAACCCACGCAAAAAAACATCAAGTAA
TCCGTCAGATATGATGACTTAATTGTGGGACAGTTCTAATATGAAGAAAACAGGTTAGATAATTGG
GGTGAAGAGATGGCACCCTATTGCGAGATAGAAGTAGACATAATCAAATCATTTAAAGGGCTGAT
GAAAGACCATGAATTCAGTACTGAGATCTCAATTAATAATGATCGCTGAAAAAGCCGATATCACTCGAC
GCGCTTTTACAATCACTTCTTAGATAAATATGATCTTGTGTCAGTACCATCTTTGAGCATGATCTTTT
TCCAACAGTCATCAGTTTACGAATATCAATGACTGGGATCAAGGGTTCGCTGTTTTATCGTGAATT
ATCTCCAAGACAATCGCGACTACTATAAAAAATTTGTTGTCGCTTGAAGGACAAAACCTGTTTACAGA
CAGACTTTTATAAATTTGACTGAGATGACAGATTGGGATCTTGATCCAGAAATATTGGTCCGTAGG
AAAATTTCTGACGAAGATCAGGCATTTTTAAGCGATTATTTTTACGCTTATATGGGACTGACT
ACCGAATGGGTCAAAGGTAATATGGTTTTTCAACTCAGGAGTTCGTTAAACGGTGGAAAGCCTT
ACTCAATAATTCATGCATAATTATCTGGACAACCTACGCTCGATGAATTACACAGATTGGATTAAA
TGAGAAAGATGTTACATTTGTGCCAATATGTGAATTGATAAATATTTCAAGGAACCTATTCTTTCC
CTGTAAACGAAAGTTGACTTGAAAGGAGTTAGTTCTGATGAGTAAATATAAAGTTATTATTTGGGG
ATTAGGAAACGTTGGTTCGTTCCGCGAGTGAGAATGATCGCGGAAAGACAAAATATTTTTGAATTGG
TTGCAGCCGTTGACGTTGATCCAAAGAAGTTAGGTAAGGATGCCGGAGAAAGTCTTTGATTTTGAC
AAAGTCGGCGTCAAAGTTTTAGATGATATTGATGCAGCCTTGAACCTTCCAGCTGACATTTGTGCT
CGACTTTTTGCCAACGGAAATGGACAAAACGAAGCAATTCATGCCTTCTGCTATTGACTCGCCA
AATCGCTCGATGCCGTAATAACGTTATTACCACGATTCCGGTATATCATGTTCAAGACAGTCAG
CCAGAAGTATATGAATATCTAAATGAACATGCTAAAGCACATAATGTTGCTTTTGTACCATTTGGA
CTTTTGGCAGGCGATTATGCCTCATATATCCCACTAGTTTTGGCCGGGGCCATGGGCCACGTGG

ATAAAATTGTTGTTCAATCCGGTGAAGATGACTGGCACAACACATCAGGCTGGGTGCGATGTCTTC
TCATATGGCGGCGATATCAATAAATATCCAAAACCAGACTCAGACGAAGATCTCTTGGCTAAGTT
CATTTATGCTTATTATTCATCCGGCGTATACGAGATGGCCGATAGGATCGGTCTGAAATATGATA
CCTTCAAACCAGAGCATGAAGTCTTCACTGCACCCAAAGATTTGAAACGATCAAGGGTACAGTC
AAAAAGGGCAGCATTATGCCCACAGATTTACCATGGCACTTTACAACGGCAACGAACAAGTAGC
CGCCTTAAGATATGTTCAAAAAGTTGATAATAAAGAGACACCAGAATTACCGATCAATAATACGAT
TCATATTGAAGGCTTCCCGTCAAGTCGATGCGCAGATCGATGGATTGATCCCAGAAAGAGAAGGC
TACGTTTCATCAGCCGCTCCAGCAGTCAACTTGATCCCTAGCATTCTCGAGACCCACAAGACAG
GTTATGTTGAAGTCTGCGACCTTCCAGTAGTGATTGCCAGGCCATTGGATATTGGCGCAAAAAA
TTAGTCTAGACTAGGCTTTCGAAGCTGCTTTGACCATTAAGGTTGGAGTAGCTTTTTTCAATTTGCAA
GTAAATCATTACGGCTTGTGTATACGGTATACAAAATGGAGAAAACGCTGACTAGTTTATAAATCA
TTGAGACTTAACGGCCGGATAAATGCTGATCTGATTATAGAAATAACAACAAAAAGGCCACGCTA
AAAATCATATTAATTATAATCGGGAAATTTATTAATAATATTCAAGAAAAATAAAAACCGTGGGTAC
ATTATTTAAAA

SEC ID 15 Posición 2262750..2268615

TTTGAAACTAAGACGAAAGCTGCCATGTCAAACAAAGCCGCCATAAATGCCACTGTCACA
GATCCATCAGCCGCAATGCCAGCATCTTGCTGAAGTTCTTTAACAGCATTAAAGGGTGTTA
TTCGTGAACCTCATTAAAGTCTACTGGACTAATCCCTTTGCACCAGAAAAGCCCCCTTGA
ATGAGTTGAGCAATGTTCCCCTTATATCCTGGCTTCAGACTACCTACAACAGGTGCTAAG
GCGTTTTTGGTGGTCTCGCCAAAGCCTTACCAATAGCACTAATACCGATTTCTGTGCTGT
AATCCCATTCTTAGGCTATAAATTTGTGGCCATCCCGTTTGCCTGTTTTCTGGAGCTGCG
ACAAAGCCAGGAACGCTACCATACGTTTTGTTGAGCCATTTTTGAACGGCTCGTACTGCT
TCATCTGCCATTTAAAGTCTCCTTTTTGTTTTAGACAGCAGTCTGCCGTCACAAAA
GCAAACATATGTTGCGATTCAATTCATCTCTTCAAAGCTTCGAAAAGGCAACCCTGATCCA
CAAATAATCCTTTTTATTTGAACTTAGCAAAAAAATGAGGCCCTCACATAGTGTGAAGT
TGCCTCATTCTTAATGTCTATATTTAAAGTATTGCCACAACGATGGATCATCGAACGCTC
ATGGACTTGGTTAGACATGTATCGACGACTATGAAAATGTGGGCGCAAGCTCAATTTAC
CTTCCAAATGTTGTGCTATCTCATTAGCGCTGGTTTTTTAGGATAGACTAGACAAGG
ACTAATAATTTCTCAAGAATCCCGCAACTCCACTATTCATTGTCGAAATCCCCACTGAT
ACTCTTGTCTTGCACGTTTCGACCAAGCAAGAAATGTTTTATTCCGATAACCGAATTTGTC
CATCAAGTAATGGACCTCCCGACATGCCATGATACGAATTAATTTGTTGTGAAATATATA
TTCTAGTGGGTCTCTGAAAAGGGTGTGACAGTCCCCTTGATTGAACCATGACTCCTT
GAAGTTGCTACCCTGATTGCGGATCGCCAGGGAATCCAATGGATCTTGTGCCATCGTAT
CAGCAGGTTTCGATTTAAATTAAGACCCGCGAGGCATACTACCAGACTTCATAGAGACAA
TTGCAGCCCCGTAATCATTGAAAGTACTGTTGAATTATTAATCCATGCCTGTGGCACTA
TCAATCTATTCAACTCCGTAACCGACCCCTTGATGATTTGCTTACTATCACCAAAGT
TAATAATCCTCCAGAAATATAATGACCATCATATAACATGTGTGCTGCTGTCCCTATAC
GGTCTACTCCAATGCTAAATCCAGTACCGCCAGAAGTTCCACTGCTCAGCTCTGTGCCAT
TTGAGTTAGAGATGATTTTTTATACGAACTGTCAAGGTATGGTGAGTTAATGACCATGA
CACCATTTGCCATCGAAAACCACGTGCTCAAACCCCAACGGAACTGTACGGCGCCGAAT
TGGGGTTTGACACAGGTGATACCGTCTCACAGATAGATGATTAGACGATTTATTCAGTT
TCGCAAGATATTCGGACGTAATTCCTTGAACCTTCTTTCTTCTTTAAATCCTGATATT
GATCAGGTGTATAAGCTTTGACACTCCCTTTAAATCGGGATAAGAATACTGATATTGTC
GAATGATTTCAATCAAAAAGTGTGTTGTGCTGTTAGTCAAAAACAATATCATTCT
TTGGTAAACATGGCTATTCGCTGCCAAAGGATTTGCCATACTATCAGCACTTACACTTA
CCGTTTGAACCTTGAATTCGCTAAGGCTGCAGCTATCATAGTGATATATGCCATACTT
TTCCGCAATTTAATCCCCCTTTTTCTTAAATGAAACCGCATTACGGAGGCTTGTCAAT
GCTTTTAAAAACAACGTTACTTTTTGGCTCATCTTGGCTGTCAGCATAATTGGAGTAAT
TGTTCTTGGCGGTGTTATGGCGCATGAACCCCTGAAGGAACGGCCCTCAAATAAGTTTGAACG
TCCCACCATTACTATTAAAAAAGTCAAACCTATTAAGCACAGTAACAGTATTGCTGTCAC
ATTTGCTACCTCTCAAAAAGCAAATATACGATAAGTGATCTTAAAGAGAATCAACTTTC
TTCTGGCATTTCGAATAAAAAGAGAAAAATACCGTTTTCGGAATTAAGCCCTCCTCCTCTAA
GCTTGCAATACGGGTTAAGCATAACAATAATATACAAACCAAAGTGGTTTTCTGTTCCCAT
TGTTTATCATATTATGAAAAGTGCCATTTCAAGAAAGCCAATTCCTATGGGAGAAGAGTT
TAAGTACAATGGAAGTGCATGTTTTATTTAGCATGACCAATACCCCTAAAAAACAAAA
CAAGAACAGTATAAAAAACCAACTGCTTTTAAACATAACGGTTAAAAATGATCACTACCT
TGCCCTGTCGATTAGATACCAAAATACCTTACTGTTTCTGATTGAGAAGGTAACCTATT
AAAAGTAAAGCCATTCTCAAAAATTTCTATTTCCAGCAAAAAAGAAAAAGACCATTGCAAT
AACTATTGAGGGCGTTCCCGCAAGCTCTGCCAATGGTCTAGTTATAACGTATAACTGTT

CGATTTAGACTTACCAATCTCCTTTATAAATTCCTGAAATTACACTAACTGTCCCCCACC
TTGACAGTCAGTACACTCAAACCTGTCTCTTATGCTTACAAAACACGTAATTTAGGCGGTTT
TTAAGCAAAAAGTCGTTAGTTTTTCATAAATGTTATCTTATACTCTAATGAGATCTAGCTTG
TGATAATAAGGCTGTTTTCTTTGACAGCCTTATTAAGCACACTAATCAATGTCAATTCG
AAGTTTTGGTTTCCACTTGGCCAACTTTGTTATCAGAAAATCCAAAACCTATTGCCTC
CCGCCACCATATATTTATCGAGCCATTTTGAAAATGAAAATCGAAAATATCGGTCTGCTT
CTATTCGGGATGAGTTAGATATGATTTTCTTAACCGATACTTCTCTATATCAATATACA
TATCTCCGACATCCCTTATATGGAGAATGGGTACTTTATTTACAAAACCTTTAGGCAGTG
CCTCTTTTTCTTAATCATTTTTCTAATTGAATAGACTTCACACGTATATCCCATAGGAA
TCCCTTCGATTGTTGTGCAATAAAAAATAGTCCATTAGTAATCGAGAGAAAACCTCAATGT
AATCCTGTGGAAGTTCACCTTTTTATTTTTCTATATCATCAGCGTGTGCAGGAGGTT
CTATCTTAAAAGAAACATTTTGCACATCTCCATCTAATTGGAATGTTGAGAGCGCTTTTT
CCCCATTTTTCGTACCTTTATTAAGAATTAATTCTTCGCCGAATTAGAGATTCCAAAT
GAGTTCCCTCCTCAATAGTTGTTAAACCACGCGGTGATCAACCGATGATTTGGTGTAAACA
CCGGCATCAAATTTAAAGTCATTTGTTCCGCCATAAACTCTCGGGCGAATATGATGCA
CTTCTCGGAACTCCAAAATCTGCAGATTGATTGCCATATGTTTCACTGAACGTTTTAA
TATAAATATATCTATCTTTTGTGACCAACTAGGAGATTTTGATAACTTAGTCCAGGTAG
TATTAATAGGTGTTTCTGCATCTTTTTAGACACGGGATCAACATATTCAGGGAAATCT
GTCCTATTTTTATTTGTAATAGATGGCCGTTGGTGGGATTGTTTTACATTAGCCGCTC
CATTAACTCCTATAAATCCAACAGCGCCAGCAACGTTAAAAAATGTGGTTTTGGCTGGCA
ATTCTGTAAAACCAAGTAATCCTGTTTGCAAAACCGCCTATTTTGCTAATGGGTGCCAGCG
TATTGGCATTACCAGGACCTGCAAGGTAGGCTCAGTATTAATTCATTTGCACATCAA
CTGCGGCTGGCGGGACACCCTCAATAGAATCAATCCAGAAATGACTCTGAATTTCCGG
ATATGTATTCTCCGATAAGTGCCAGGTAATTTGTAACAGGAACTTCTGCACGAGAAC
TTATGCCATTGCCATGACTATTATTCAGTACCCTTGTTCAGAAAGCGATAATTGGTT
GTCCATTTCTGGATTACTTCTTGATAACTTGTGACGATTGGTCAGTTGAGTATTGTTAT
CGCTAATACGGCTTTCAGTTGAAACAATTTGATTTAAAGATTGTGTTGTCTGCGGATA
CAATTGTTGAATACCCAAGCAAATGACTAGAAAAGAGCCCGAATATTAGCCCAATAACTT
TCCACTTTTTACGCTATTATCTTTTCCAAAGTCTTCAGTGCCTGGCAATAACTGT
ATACATTGAGCAGTATAGTCGCTATTTTATAGCTGAACAACCTATAAAGCTCAATTATTA
TTAGCCTATAAACCCTGCCTAAGTGAATTGATCTAGAACGAAGCACGCCGAAGAAGTC
GCTAAATGTGCTAAGAAAATGTGCTTGAATAGCTCAAAGTAATTAGCGTCTCCATTGA
AAACCGTTTTACTACACGTTGTAATTTTCACTATGAATCCAAAATAAAAAGCAAAAT
CGTAAATGCCAAATTTCTTTTTGACGTTTTTCTACTGTGCGGAGATTTGCAAGTGTAC
GTACACTTACGATGAATTGACAGAATCTCAGCTGCGCTGATCGTCAATTTGTTGGGG
CACGCCCCCAATCCCCCTGTTATTTGAAGGGAGGTGAGTCCCCCTTCAAATCAAAT
TAAACAGCATCTGCCGCCATCTTTTCGCTGACCTTCTCAGATGTTACAGTGGTGTGA
CACCAACTGCATTTAGAGTTTCATTCAAGTTGAACATTGTGTAATATAGATTGCATT
TGATAAACATCAGTTGCTATTTGCAACTTTAAAGCTTCGGCTAATTCACGTTCTG
TTAATTTACAAGCATCTCGACAGTTTCTGTTAAAGCAACATCTACGCTTCAATTCGAGCA
ACTCACTATACGTATGCCGAGTTGCAGACAAGCTACTATATAGCTGTACGCGCTGAAACA
CCAAAATCGTTCTGTTTATGCCAATAAGCGAATAATCTTGCTCAGGTGTAGTAAAAAAC
TGTTTACGTGTAGTGAATGGCGCTAGCCCTTGTGTAACCTGGCATCATCCAGTGTAGTA
AAACGCGTTTTACTACACGTTGTAATTTTCACTGGAGTAAATGGCGTTTTACTACA
CTTTTTGACCCCAACGTGCTATCACGACAAAACCAACCGCACTGCGGTTTACCCCAATTT
TGGGGTCAGTTTTGCCTTATGCTCTTTCATGATTTTAGGCGCGTTCCAAGCAGTCTCAA
AAGTGGTCCATCCAGGCGAGCCGATTTTGAAGGATTGGATAGCAACTCAATTTATTT
TGATCTTTTGCTTGGAGAAAACGTTACGTTTTGACCAGGGCCGTCGCAACTGTTGACC
AAAACCTCGTCCGTAACGTGACGCTATTTAAACGCCGCGTTGGTTTGTAGACGACCATT
CATCATCACCATTACGAGGTTTTTGAATGACAAAAGCAAGACGAAACACACCGGGTCAT
GTTCACTTTGACCGATCAGGCGATTGCAAAATGAATCAGCTGGTTCGCAAAAAAGCAACA
GGAAGTGAATCAAATCCGGAACCTGGCTAAGTACCATGTCAGCGTGACCAATCAAATAT
CATTGAGGACTGTTTATCAAAGCAGTGAGTTTAAAAAGCGCTAAAGGGCCTGTACTAGCG
TTTTCTACTCTGGTGGGTATAATTAATGCTCTCTACATCAAAAACG

SEC ID 16 Posición 2776965..2787971

GCCACGAACCTGTAGCCGTTTGGATGAAGCCATATAATACTGGACCAACCGCCGCAAATA
AGTAGCCGACACTTTGAGCAAAATCAGGAATACTAATCTACTTTGCCCTTAAAAAATCTT
GAGATGCCATATCTGTTTTGCCTTCACTGATTTGGTCATAAGAAGTGCCCTAC
ATTCATTAGATTACTTGTCTAATAATTGTAGGGCACTTGGGTTGAGAAAAATGATGTTAA

CTAAGAATGCAAACGAACTAAAATCTTTGCTTGTCTTTTTATCCTTTTCTAAGGATTCAAT
 TCCTTCTGAAACTAATTCATTTAATTCATCTTTTTGTAATGACCTGTTGAATAGTGA
 ACGATGGGTATCTATAATCTTAATFACTCGATCGAAGATATTGGCATATCCATAAGATGT
 TAATAAACTACCACCTTTTTAAGAAGAGCTCTAACATCTACAACCTGGTGGATGTTGAAA
 TAATGCAATCACGGTAACCTTGCCACCATTTTTAAGAGCCTGAATGGCACCAGTAAGTGT
 GGGTTGTACACCGGCGCAATCAAACGCAATATCCACTCCCTGATTTTCCGTGATAGTGT
 GATAGCGTGAGCTAATGACTTTTGACTATCAGCACGTATTGGGTATTGAATTCCTAATTC
 ATTTGCTAAATTCAAACGTTCCCTCTGACATGTCATTTATTATGACGTGATGTGCACCAGA
 AATTTGTGCTATTAAGGCCGTGAACAATCCAATTGGACCAGCACCTTGAATTA AACATC
 ATCTCCAGGAGACACTCGGCTTGCCATAACTGCCTGTGCAGCAACTGAAACTGGTCAAC
 TAAGCCCCCTAAATCAAGCGGAAAGCTAGCTGGTAAGAGATGTGCAAAGGTACTTTTTAC
 ATTGCACTTTTCAGCTAAGCCACCGTTAGCCGAAAATCCTAAGAACTCTGCTGATTGATC
 ACTACCTATAGCATGTTACACCAATTATAATGACCAGAAAGACATTCCGGACATTTTCC
 ACAAGCAATCATTGGTTCGACTGCAACTTTATCTCCAATTTAATTTAGATACTTGTTT
 TCCAATTTTAGAAATCGTCCCAGAAAATTCATGACCAGGAATTAGCGGGGCTTGCATATG
 GGTTAGCGGATGAGGTATTGTGCGCAAATCCATACCCTCTAAATATTCATGAATGTCACT
 ACCGCAAATACCATTAATGCAACCTCAATTTGAACTTCATCTGGTGCGGGATCAGGAAT
 ATTTCTTTTTCAAAGCGGATATCCTTAGGACCGTAATAACAGCTGCCTTCACCATAGT
 CATAGTGCTTCGCTTCCCTCATGTTCAATATAGCACAATCGTATATAAAATAGTGAATAG
 ATTTGAGTAATGAAGTTACCATCTTGACTTAACAAAACCTTGCTAACTGATTATATGAGA
 AACTTTACTTGAACATTTTTGGTATTACCATTAATCCCTCGGACATATTTTAAAA
 ACCTTTTGATGCTGCAACATTTGGAATTTATTTATGCGTATTTATTAAGGGTTTCTATGTTG
 AAGTATATAGCAAACCTGTTCAAGTAACTGACTTTCACGTGGGCTTTAGCCAAGAGATGC
 TGAGCAGCGAACCCAAAGGGGTGTTACTCGCCACGCAAAAAGAAATCCAATTGCATTCC
 AGTATGAGCGGAAGCAAGCCATTAAGACGCTGATTCATGAACTCGCGCACAGTGAATTA
 CATTGTGATCCGAAGTTAAAATTGGATCGTTCAACCATGGAATTGGAAGCTGAAAAGTACC
 GCGTTTATCGTTTCAACATTTGGAATTTGGAATTTGACACGAGTGATTATACGTTTCCCTACCTT
 GCTGTTTGGTTCGAAAAGATAAGGATCTTCCAGCTCTCCAAAAGCTTAACGCGTATCCAA
 TCCACCGTTCGAAAATTCATAAAAACCGTTCGATCAAAACCTTGAAAAGATTGTTGAGAAA
 CCGTTGACGCTTGATCAAAAATAGAACGCGCTAAAACCTTGCACAAACGGAACATC
 GCAAAAAGAGCAAGGGCTGGTGAAGCAACGCGAGGAGAAAACACGCTAACCCATTTGT
 TGAATACTCTCACTAAGAGGACACTCCAGCCCTTGATCACCCAAAGAAAGGAATTACCAA
 CATGAAAACCATTTGACGAAATGAACGAATTCGATCGTGACATTATCTTACTTCACCGCAA
 GTCTGTGAGCGAAGATACACCGCAGGCAATTCCTGTGAAAGTGAAACAGATTTCGTAACGC
 AATTGCCGACGAAAAGGCGGGTAAAGAAGATCCAATTGAGAAAGAAATTTACACTCGAATG
 TTACGACGAAGCAATCAGAAAACCTAAGGGACCTTTCGGTGCCTGATTATCAGTTGTGGTT
 GCGTCAAAAACAAAGACCTGGAAGGGTTTGAATTTTGAATTTGAAAGGGTGTGCTAGACCCC
 TTTCAAAAATAACGGGGATTGGGGCGTGCCCCAAAACAAAATTTGACTATCAGCGGAGCT
 GATATTGGATCAATTTATCGCAAGTGGACGTCCACTTGCAAATCTCGCGACAGTAGAAAA
 AGCCCCAGAAAAGCAAATCTGAAAAAATGTAACAGGCACCTTGATATCAAGTGCCTTATTG
 TTTCTAGGATCGCTAAAATAACAGGAGGTGGTTACATGAAGCAATCTGATGAACACCGC
 ACGCGTTCAGTGAGAAAGCACTGTGCGTATGACCCAGAGGAGCGTGCTTGGGTTGATATG
 AGAAGAGCCTCTGTGCGCAATCCAAAGTTCAATGCATTTGCCTGTGCGCCTACTCACGACG
 AGCAAGATCGTTTATGACATTTTACTGATACTAAAAGTTACTTAGACAGCTGTCAAGA
 ATTGGGAATAAGGCTCCTATGCTGTAATTACGGACAAAATAGTTTGTGCGATAATTACA
 GCATAAGGGCCTCTAGGTCCGAGCCAGGAGGCGGAGACCGCCGCACAGCCCAACCCAC
 GCCGAACCGGAGGCCAGCCCGCCGACCGCGGCGCAATCATCCACCCAACGCCCCCA
 AGTTTTGATAGCGGTAACAACGCCTGTGCGCTTGTGCTGGCCGGCCTTTTTTATAAGG
 TTGGAGGAGAAAAGGAAGGGTGGTTATGGGCGCTTGGTATGAACACGCAATTTTACC
 ATCTATCCAAAATCGTTTCAAGACAGCAACGGCGACGGCATCGGGGACCTGAACGGGATC
 CGGCAACGGATCCCGTACCTGCAAGCCCTCGGCATCAACACGGTGTGGCTGAACCCGATC
 TTCGCTCCCCACAGGTGGATAACGGCTACGATGTTGCCAATTACTTCGCCGTGGACGAA
 ACCATGGGTACGATGGCCGACCTGGAGGCGCTGATCGCGGCTCTGCACGCGGCGGCGATC
 CGTCTGATCATGGACTTTGTGCTAAACCACACCTCGGATCAGCACCCGTGGTTCCAGGAC
 GCCATTACGCAAAAATAGTCTGTACCGGACTACTACATTTTCTCTGGCCACGACGGG
 CAGCTGCCAAAACACTGGGGCAGCTTCTTCGGCGGATCGGTTTGGGCGCCGGATCCGGCG
 GGAACCGGGCAGTCGATTTTTCATCTGTTTCGACCGGCGGATGCCGGATCTGAACTGGGCC
 AATCCCAGGTTGCGGCGGGCGATGGGAGACGTGCCACGTTCTGGCTCGGCAAGGGCATC
 GACGGACTGCGGCTGGATGCCTTCATCCACATTGCCAAGGCCGATCTGGGGCAGGATTAC
 CCCCTGCTCCGGGGCAGCAGACGCCGGTGGTGGCGGAGCCGTTTTTCTCCAACCTCCCG

AAGGTGCAGGAATGGCTGCGGCCGTTCTGCGACCGGATCAAAAACCGACTACCCCGACGCG
TTTCTGCTCGGCCGAGGCGGCATCGGCCAACGTTAACCTGGCGGGCGGATTACACCGCGCCT
AGCCAGCACCTGATGGACAGCGTGATCACGTTCCGCTACTTCACCGAGGACGAAAGCGGC
CTGGATCCGCGGCTGCCGGCGCAGTACCAGCCGCGGACGCTGGATTTCCCGGCGTTCAAG
CAAACCCAGCGGTGTGGCAGCAGACCCTCGCCGGGTGTGATGCCGACGCTGTACTGG
GGCAACCACGACATGGCCCCGCTGGCGACGCGGGTGGCCAAAACACCACCCAGGCGCG
AGTCTGGCCATGCTGATGTACCTGCAGCGCGCCTGCCGGTGTACTACTATGGCGAGGAG
CTCGGGCTACACAACTGCAGTTTCGATCACGTTGATCAGTTTTGCGGACGTTTTCGGTGGCG
CCGTTTCGTGGCCGCGGTGAGGCCACCGGGCAGTCGCGGAGCGCGGCGCTGGCCATGGT
TCGGCGACGCACAACTGCCGGCACGGGGCCGATGCCTTGGACGACCGGGTTGCACCAG
GGCTTTTCCAATCACCTGCCGTGGCTGGTTGGCGCAGCGAGGACGTGACCAGCGTGGCC
GCGCAGCAGGCCGATGAGGCCAGCATGCTGCACTTCTACCAAGCGCTGATTGCCCTGAAG
AAGCAGCCGCTGTTTCAGGCCGGGCATTACCGGCTGCTGACGACGGCGCCGAACCTGTAC
GTCTACGAACGCACGCTGGCCAGCCGGCGGGCCCTGGTGGCGGTGGCCTTGGATGAGCAA
GGCGCCACCTTACCGTGCCTGAAGGCTGACGACCGTGGCGCTGGCCGCCGGGATTAC
CAACTCGAAGGTCAAACGCTCACGCTTGGCGGAACGCGCGTGGTGTAAACGAAAGG
GAACTCGATAACCATGCAACTTGCAGCATTACGGCACCGCCAGAAAGCGAAGATTGTT
TTTTGTACTCCAGATGAGCTGCGGCTGCGGCTCCACACAGCCAAGGCCGACGTGCAGG
CGGTCACTGACTGTACGGGGATCCGTATGTCACCGCGCCGAACCCGACCACCGGAGAAC
CGGAATTCGCTACCAAGAGCGCGCATGATCAAAACCGCACCGGCCAAACAGCGACT
ACTGGACCATCAGCTGACCGCCCTTATCACCGCTGCAGTACCAGTTCTCTGGTGAGC
GTCAGGACGGCAACACCGTCTGCTCGGGCAGCCGCGCTTGGCGGCCGACAGCGCCGCCA
ACCGCCGGGCCGATCTGTTCCGGGTGCCGTACTTCCACGCCATCGACACGGTACAGACGC
CGCCCTGGGTCAAGGAAACCGTGTGGTACCAGATATCCCGGAACGCTTCGCCAACGGGG
ACAAGACGAACGACCCCAAGGGCACCAAGCCTTGGCGTCCGGCGGATCACCCGGGCCGTG
AGGATTACTACGGTGGCGACTTGAAGGGGTGCTGGACCACCTGGACGACCTGCAGGCGC
TCGGCGTGAACGGGCTGACTTCTGCCGGTGTTCACGGCGATGTCAATCACAAGTACG
ACACCATCGACTACTTCAACATCGACCCTGCGTTTGGCGACAAGGCTTGTTCGCCGATC
TGGTCAACCAAGCGCACCGCCGCGGCATGCGGGTGTGCTGGACGCTGTGTTCAACCACA
TGGGCAGCCGACGATGCAGTGGCAAGACGTGCTGAAGTTCCGGTCCGCACTCGCGCTTCG
CCTCCTGGTTCCACATCAACCGTTTTCCGGCGGGCCCTTCGCCGCGCCGGAACAGGGCG
GCGTGCCGACCTTCCGCTTCCGCTTCCGACCCGACATGCCGAAGCTCGACACCGCA
ACCCGCGGTGACGACTACCTGCTTGAAGTGGCGACGTAAGTCAAAACAGTTTCGACA
TCGACGCTGGCGGCTGGATGTGGCCAACGAGGTGGACCATCACTTCTGAAACGGTTCA
ATCAGGCAACCAAGCGCTCAAGCCGATTTCTTCGTGCTGGCGAGGTCTGGCACTCCA
GCCAGCCGTGGCTTAAAGGGGATGAGTTCGATGGGGTCACTGAACTACGCGTTCACCGAGC
AGATCGAGGCCACTTCTGACCGCAAGCTGAGTGTCTGCTGACGCTGACGGCGGCGTGA
CGGATCAGCTGATGCTGACCGGACCAACCGACAGCGGATGCTGAACATGCTGGACT
CGCATGACACCGCGCGGCTGCTAACGGTGGCCGGCGGCGACGAGGACCTGGCCCTGCAGG
CGCTGGCCTTACCTTCTGCAAACCGGGATGCCGTGCCTGTACTATGGCACGAAATGG
GCATGGCCGGAGAAAACGATCCCGACTGCCGGCGGCCAATGGACTGGGCCAGCTGAAGG
GCCCGATTTGGCAGCGTGTGCAGGCCCTTGTGACCTTCCGCCGCGCCAGTCCGCAACGC
TAGGCACCGGCACCACGGCGCTGAGCGTGACCGCAGCCGGGCTGCTTAAGGTAACCCGCA
CAGGTGAGCACACCGTGACGGCGTATTTAACACCACCAAGCAGATGGCGACACTGACCG
TCAGTCCATTACTGGCGCAGGTTACGCCGGCCAGCGGCTGGCGCCAACCGGTTTGTG
TTATGGTTAGTAAGATTATGTTAGCGGTAACAGGCAATTTGACCTTTTAAAAGCGTTTT
CATATTATCATAATCAAAAGTGTAGAAAAGTTTACGGTGGCGCAATTCACCTCCCGAAAGT
GAAGGATGCAAGATGAAACGGATATTTGAAATCGACCCGTGGCTGGTGCAAAGCCACCAA
TTGAACCCCAACGAGAAAACGCTGACAGGAAAGCATGACCGCCATCGGCAACGGCTACATG
GGTCTGCGCGGTAACCTCGAAGAAGGTTACAGCGGTGATCACCTGCAAGGCACGTACCTC
GGCGGCGTCTGGTTCAGATAAAACCGTCTGCGTGGTGGAAAAACGGCTACCCGGAT
TACTTCCGCAAGGCGATCAACGCGCCGAGCTTTCATCGGCATGGCGCTCACCGTGAACGGC
GAGCGCGTCTGATGTCACAGCGTCTACCGGATTTACCCCTACGCTTGACCTGCAC
CAGGGCCTGCTGACCCGGAGCTTCTGTTTCGAGGGCAAAAAGGCCACGCTGCGCTTACC
TTCAAGCGTTTCTCAGCAACGTAATCAAGGAGGCGGCGTGGTGCAGCTCACCGCCGAA
AGCCTTGTGCGACCGGCCGAGCTGACGGTGGCCGCACAGCTCGACGGCAACGTCACGAAC
GAGGACAGCAACTACGACGAGCGCTTCTGGGCACCGCAGGGGGAAAACGCCGCGGCAGGC
ACCATCCAGCTGCAGACCAAGCCCAACCGTTCCGGGTCCCGCAGTTCACGGTGTGCTC
AAGCAAAGCCTGCGCAAGGGGCAACCCTTTTACCCGGCACCGTGACCACCAGCACCGGC
CAGCTGACCAGCACGGTACGCTGCCGCTGGCGCCAAAACGTGCCGGTCCAGCTGGAAAAAG

GACGTCATCGTGGTACGAGCCGCGACGTCGCCCTGAGGCCAGGCCGAAGCGGCCGCG
GAGCTGATGACACAGCTGCAGGGCCAAAGCTTTGCGGCCAGCTGGCGGCACACACCGCC
CTGTGGGCCAAAGCGCTGGGCCCAAAGCGACGTTGGTGATTGAAGGCGACGACGCGGCCAG
CAGGGGATCCGCTTCAACCTCGCCAGCTGTTATGACCTATTACGGCGACGATAAGCGG
CTCAACGTGGGGCCGAAGGTTTACCAGGCGAGAAGTACGGCGGGGCGACCTACTGGGAC
ACCGAGGCGTACGTGGTGGCGATGTACGTCGCCGCCACCCCTCCGCGCGTGACCCGGGCA
CTGCTGCAGTACCGGCACGACCAGCTGCCCGGGCCTACCACAACGCCAGCAGCAGGGG
CTCAAAGGGGCCCTTGTCCCGATGGTGACCTTCAACGGCATCGAGTGCCACAATGAATGG
GAAATCACCTTCGAGGAGCTGCACCGTAACGCAGCGGTGCGCTTCCGCGATTTACCAGTAC
ACGGCCTACACCGCGGATGAAAGCTACGTCAACCACGACGGCATGGAGGTGCTGGTGGGC
ATCAGCCGCTTCTGGGCGGACCGGGTCCACTTCTCCAAGCGCGCCGCAAGTACATGATC
CACGGCGTACACCGGGCCGAACGAGTACGAAAACAACGTCAACAACAACCTGGTACACCAAC
ACGATGGCCGCTGGTGCCTGGAGTACACGCTGGCCCGGCTGCCGAAGGCCGATGCCGCC
ATTCAGGCCAAGCTGGCCGTGAGCGCCGCCGAGCAGCGCCAGTGGCAGGACATTATCGAC
CACATGTAATCCGGAGGACAAGAAGCTGGGCATCTTCGTCACGACGACACCTTCTCTG
GATAAGGACCTGCGGCCGGCAAGCTCGATTCCGGCCGACCAGCGGCCAATCAACCAGCAC
TGGTCTGGGACCGAATCCTGCGGTGCGCGTTTCAAGCAGGCGGATGTGCTCCAGGGC
CTGTACTTCTGAACAATCGCTTACCCGCGAGCAGAAGGAACGCAATTTTACTTCTAC
GAGCCGCTGACGGTGCACGAAAGCTCGCTGAGTGCCTCGATTACGCGGTGCTGGCCGCC
GAGCTCGTAAGCAGGATAAAGGCCGTTGAACCTATCAGCGTACGGCTCGTCTGGACCTG
GACAACACAACAACGATACGGCAGACGCTGCACATCACCTCGATGACCGGGCGCTGG
CTGGCTATCGTGACGGGCTTCCGCCGGCATGCGCTACGACACGATCAGCTGCGGTTGAT
CCGTTCTGCGGAAGCAGTGGCAGGGTTACCAGTTCGCGATCAACTACCGCGGCCGGGTG
ATCCAGGTGCGCGTGGGGAAAACCGTTGCAAGTACCGCTGCTGGCCGGCCCGCGCTGACC
GTCATGGTTGCCGCGCAGCCGACGATTTGGAGGTGAGCGCGCATGCTTAAAGGATTGCT
GTTGACCTCGACGGCGTCTTGACCGACTCGGCCAAGTTCACCTGCAGGCCTGGAGCCA
GCTGGCCACCCAGCTGGGCATCACCTGACGCGCGCCGAGCGCGAAGGCCTGCGCGGCCG
CTCGCGGCTGGACTCGCTGAACCTGATTTTGGCGCGAGGCCGCCAGGAAGACCGGTTGAG
TGCCGCGAGAAAACGGCGCTAACCGACCAGAAGAACGGGTGTACCTGAAGCTGATTCA
GACGATGACGCGCGTGGACATCCTGCCGGGCAATTCGCAACTGCTGAAGGACGCGCAGGC
GGCCGGCCTGAAAATGGCAATCGCCTCGGCGTGGCGGAACGCCCGACAATTTTGAACA
CCTGGCCCTGGCCGAGTTTTCGACGCCATCGTGCATCCGCGACCTGCACCCGGCAA
GCCCGACCCGGAGATCTACCAGCAGGCGCAAGCGCTGCTGGGGCTCCAGGCCCGGAGGT
GATCGGCTTCGAGGATGCCTCGGCCGGGGTGGCCGCCATCAAAGCGGCCGGTCAATTGCG
GGTTGGCATCGGGGATGCCCGGCTTCTGGCCGACGGGATTACCTAGTGAAGACACGGC
GGCCCTGCAGCTGAGCCAGTTGCAAGCGCGTTCGCCAAAGAAAAGTGGGGAGACTAATGG
TTGAAATCGACTTGGACCCTCTACAAGAAGTACGACGACGGCGAGGATTACTCGGTGG
TGGACTTCGACCTTACATCAAGGATAAAGGAGTTTATCGTGTTCGTCGCGCCCTCGGGCT
GCGGGAAGTCCACCACGCTGCGTATGATTGCGGGGCTGGAGGACATTACCAAAGGCGAGC
TGAAAATCGACGATAAGGTGATGAACGACGTGGCCCCAAGGACCGCAACATCGCCATGG
TGTTTCAGAACTACGCCTTGTACCCGACATGTCAAGTGTACGACAACATGGCGTTCCGGC
TAAAGCTACGGCACTACAAGAAGGAGGACATCGACAAAACGCGTGCAAAAACGCGCGGAGA
TCCTCGGCCCTGAAGCCGTTTCTCGACCGGAAGCCGGCCGCTTGTCCGGGGGCCAGCGGC
AGCGGGTGGCCTTGGGCCGGGCCATCGTCCGCGACGCCCAATTTTCTGATGGATGAGC
CGTTGTGAAACCTGGACGCGAAGCTGCGGGTGTCCATGCGGGCGGAAATCGCCAAGCTCC
ACCAGCGCCTGAACACCACCAGATTACGTGACCCACGACCAACCGAGGCCATGACTA
TGGCCGACCGGTTGTGCTCATGTCCGTTGGCCACGTGCAGCAGATTGGCACCCCGGCCG
AGATTTACCAGAACCCGCGGAACCAAGTTGTTGGCCGGTTTATCGGGTCCCGGCGATGA
ACTTCTTCAACATGACCTACCAGGACGGCTTTCGTCAGCGACGGCCAAAGCATTTCGCTCA
AAGTGCCGGAAGGCCGGGCGAAGATTCTGGACGACCAAGGGTACAACGGCAAGGAAGTCG
TGTTCCGCATCCGCGCGGAGGACATCCATTCCGAGGAGGCCCTTCTGGAGACCTGGCCGG
ACGCGGTTATCAGCTCAACCGTGTGCGTGTGAGAGCTCCTGGGCGCCACCGAGCAGCTTT
ACCTGAAGGCGGATGACACCGAGTACGTTGCCAACGTCAACGCGCGCGACTTCCACAATC
CCGGGGATCATGTGAAAATGGGCTTCGACGTCAACAAGGCGCACTTCTTCAACAAGGACA
CGACCATGGCCATCGTGGCTAAGCCGATTCCGCTGGAAGGCTGAGGAGGTGAGTGCATGA
CCCCATGGTGGCAGCAAGCCGTCATTTACCAGATCTACCCGAAGAGTTTTTCAAGACAGCA
ACGGGGATGGCATCGGCGATTTGCCGGGATTACCAAGTGCCTTGATTACCTTAAGCGGC
TGGCGTTCGATGCCCTTGGCTGAGCCAGTGTATGTGTCGCCCGGCGAGGACAACGGCT
ACGACATCGCGGACTACGAGGCCATCGATCCCCAGTTCGGGACGATGGCCGACATGGACG
CCTTGATCGCCCGGCCAAGCAGCGCG

SEC ID 17 Posición 2793833..2794809

CCC GCGATTTTGGCGTGATTGGCTTCGACGGGGTATTCCTGGACCAGGTGTCCAACCCCA
 AGCTGACCACGGTGAAGCAGCCCGTGCAGCGCCTCGGCCAACTGCTGGCCCCGATGCTCC
 TGCAGAAGGTGGCACAGTCCGGCGCCCCAACAGGGGAGCTGCTGGTCGATCCTGAGCTGA
 TTGCTCGGGACACGACGCGAAAGTAGATCGGATTTCAACTGCTTACCGCTATGGTAGG
 GCCAGTTTTAGGCTCTATGTCAAATCTAATTCATAGCTAATAGTTGATTTGGCAACGCC
 TAAGGCGTCAGCCATATCTTGGTAAGTATGATGGCCTTCACTGACCAGTTGAGCTAGCGC
 ACCACGTTGAAAACGTGATAAAGTAGAAGTACCCAAAGTAATCACTCCTTATAGCTGGTT
 GGAATTAACACTCCATTGTAAGAGATTGCTTTGGCCTTTTTTATTTTTGTTGCGATT
 AATTATAGAATTTGTCTAATTGATTGAAAATTCCTAGGGTTGCCATATATCTTTTAGTC
 TGGTCATTAGTTTTATGTTTGATCTGCTTTTTCTGATCGCAAACACCCACAACCTGCCA
 GTGAGTCCTTTTGAAGTCGTTGACTGTCAACAATACATTTATTTCCACATTGACATTGA
 CAGAGCCAAAGCGCGTTGCCATTAGAAGTCTTCCAAAAAAGCTAATAACTGTGAGTCCG
 CCAAACGTTTGATTAGCTAAATCGATACGCTTTTGCATACTAATCCTCCCGCTTGATAAG
 AAGTACTTAAATAGTTGCTTTCAATTGATCTAATCGCCATTGGCACCATGAAATAAAGG
 CTAATTCGTCAATCTTTGGAATGCCATAGGTTCTAGCATACTTAACTTTTGTGAGTGGTGA
 GTAGTTGATCATAGGGTTTACTAATAATACCAACCACAAGGATATCGACTTTTTGTCAA
 TCCCGTTGACAGGCTTT

SEC ID 18 Posición 2967081..2968319

AAATACGCAAAAGAACCCGACGAGAGTTAAGTCTCATCGGGTTCTCAGTCGTGGATGAAT
 TAGAAGCATTGTTAGCTGCATAACCTTCAACATAGGATCAATAGCTGGTTAGATGGTCAT
 CTCTCAGACTGTTTGCACCAGATCCAGGCCAAACGTTTATATCCTTGGTCATACTCAGG
 ATAGATGGGCATTGTGAGTGCAACAGGACTTAGTTGCTTGTATGCTAGGCAATGTTGGCC
 TTGATACAGAGGATCACTCTGTTTCTGATCTGGATGATAACCTCGTTTTTCCATTTCCAGG
 ACGCTGTCCCAATAATTGTTGCCCTGGGAGTTTGTGCAATTAAGTCTTGGTGCCACAAAC
 ACACGCTACGGCTTCTTTTCTGCAAACCTGATCTTAGTATTTAGGGCAGTTGCATGATTA
 CGGAATTGAACCATTTTATAATGAATCGTCTTTTCTATAAGTCTATAGAAAGTGCAGGTA
 ATGGCATTCTCCAGATCGGATTGTCTAATCAATTTAATTGATTTTTTTGGTGTGTTTG
 ATTATATTGCTTTTGCAAAAGGTACAATATACCTTTTCTCTGCTGCCTTGGCAGCAGCGAT
 GGCATCCTCCATATGAACATATACACGATTTAGGACAAGATGGCCTTCAAAGTACAGCCT
 TGCGACCCACTTTTGGAGCAGTTTTATCCCAACTAACTCCGATAACGCCAGATTTGTATT
 GGACCGTTAAGTGTAGAAGCAACTAAATTTGTTGCGATTAATTAGTTGAAAATTTCTTGGG
 ATTGCCCATGTATTTTTAGTCTGGTTATTAGCTTTTATGTTGATCTGCTTATTTCTGA
 TCGCAAAACACCCACAACCTGCGAGTGAGTCCTTTTTGAAGTCGTTGACTGTCAACGATACA
 TTTATTTCCACATTGACATTGACAGAGCCAAAGCGCGTTTCCATTAGAAGTCTTCCAAA
 AAAACTAATGACTGTGAGTCGTCCAAACGTTTATTGGCCAAATCGATACGCTTTTGCAT
 ACTAATCTCCCGTTTGTAGAAGGTAAGGTAAGGTTGTTTTCAATTGATCTAGTCGC
 CATTGGCACCATGAAATAAAGGCTAATTCGTCAATCTTTGGAATGCCATAGGTTCTAGCA
 TACGTTAACTTTTGTGAGTGGTAAGTAGTTGATCATAGGTTTGTGCTAATAATACCAACCACA
 AGGATATCGACATTTTTGTCAATCCCGTTGACAGGTTTT

5 **Literatura citada**

Cahenzli, J., Koller, Y., Wyss, M., Geuking, M.B., y McCoy, K.D. (2013). Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels. *Cell host & microbe* 14, 559-570.

Chow, J., Tang, H. y Mazmanian, S.K. (2011). Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Curr Opin Immunol* 23, 473-480.

10 Hill, D.A., Siracusa, M.C., Abt, M.C., Kim, B.S., Kobuley, D., Kubo, M., Kambayashi, T., Larosa, D.F., Renner, E.D., Orange, J.S., et al. (2012). Commensal bacteria-derived signals regulate basophil hematopoiesis and allergic inflammation. *Nat. Med.* 18, 538-546.

Hooper, L.V., Littman, D.R., y Macpherson, A.J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 336, 1268-1273.

15 Iovieno, A., Lambiase, A., Sacchetti, M., Stampachiacchiere, B., Micera, A. y Bonini, S. (2008). Preliminary evidence of the efficacy of probiotic eye-drop treatment in patients with vernal keratoconjunctivitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246, 435-441.

Khoruts, A., Dicksved, J., Jansson, J.K., y Sadowsky, M.J. (2010). Changes in the composition of the human fecal microbiome after bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Gastroenterol* 44, 354-360.

20 Klaenhammer, T.R., Kleerebezem, M., Kopp, M.V., y Rescigno, M. (2012). The impact of probiotics and prebiotics on the immune system. *Nature Reviews. Inmunología* 12, 728-734.

- Li, M., Wang, B., Zhang, M., Rantalainen, M., Wang, S., Zhou, H., Zhang, Y., Shen, J., Pang, X., Wei, H., et al. (2008). Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2117-2122.
- 5 Mileti, E., Matteoli, G., Iliev, I.D., y Rescigno, M. (2009). Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of Lactobacilli using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy. *PLoS One* 4, e7056.
- Mueller, S., Saunier, K., Hanisch, C., Norin, E., Alm, L., Midtvedt, T., Cresci, A., Silvi, S., Orpianesi, C., Verdenelli, M.C., et al. (2006). Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Applied and environmental microbiology* 72, 1027-1033.
- 10 Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59-65.
- Reid, G., Younes, J.A., Van der Mei, H.C., Gloor, G.B., Knight, R. y Busscher, H.J. (2011). Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol* 9, 27-38.
- Robles Alonso, V., y Guarner, F. (2013). Linking the gut microbiota to human health. *The British Journal of Nutrition* 109 Suppl 2, S21-26.
- 15 Swiatczak, B., Rescigno, M. y Cohen, I.R. (2011). Systemic features of immune recognition in the gut. *Microbes Infect* 13, 983-991.
- Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G. y Rescigno, M. (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut* 61, 1007-1015.
- Tsilingiri, K., y Rescigno, M. (2013). Postbiotics: what else? *Beneficial microbes* 4, 101-107.
- 20 Yatsunenkov, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, MG, Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, RN, Anokhin, AP, et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222-227.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener un producto fermentado de especies de *Lactobacillus casei* o *paracasei*, dichas especies se caracterizan por comprender en su genoma de ADN secuencias de ADN idénticas a las SEC ID N.º 2 a 5, caracterizado por:
 - 5 a) crecer un inóculo de la cepa de *Lactobacillus* como se definió anteriormente en un medio de cultivo adecuado, a una temperatura de 4 a 40 °C, para tener una biomasa y permitir que la fermentación de dicha biomasa se desarrolle durante 12 a 36 horas, preferiblemente durante aproximadamente 24 horas, para obtener una biomasa fermentada, y
 - b) centrifugar dicha biomasa fermentada para obtener un pellet de biomasa fermentada y un primer producto fermentado;
 - 10 c) incubar dicho pellet de biomasa fermentada en una solución mínima, que comprende preferiblemente una sal de lactato, y permitir una fermentación adicional durante 12 a 36 horas, preferiblemente durante aproximadamente 24 horas, para obtener una biomasa fermentada adicional;
 - d) separar dicha biomasa fermentada adicionalmente de un segundo producto fermentado mediante centrifugación.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la especie de *Lactobacillus* es *Lactobacillus paracasei*.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el *Lactobacillus paracasei* es una cepa caracterizada porque comprende en su genoma de ADN secuencias de ADN esencialmente idénticas a las SEC ID N.º 6 a 18.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el *Lactobacillus paracasei* es la cepa depositada de acuerdo con el Tratado de Budapest con el número CNCM I-5220.
- 20 5. Una composición que comprende un producto fermentado de especies de *Lactobacillus casei* o *paracasei*, dichas especies se caracterizan por comprender en su genoma de ADN secuencias de ADN idénticas a las SEC ID N.º 2 a 5, diluyentes y/o excipientes adecuados, obtenibles mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. La composición de la reivindicación 5 que comprende además adyuvantes y/u otros agentes terapéuticos.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 en forma de una formulación de colirio.
- 25 8. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde el producto fermentado está presente en un 2-40 % del volumen, preferiblemente en un 10-25 % del volumen, más preferiblemente en un 25 % del volumen.
9. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 para su uso en el tratamiento de síndromes de inflamación ocular, preferiblemente de conjuntivitis, en particular de queratoconjuntivitis vernal (QCV), en medicina humana y veterinaria.

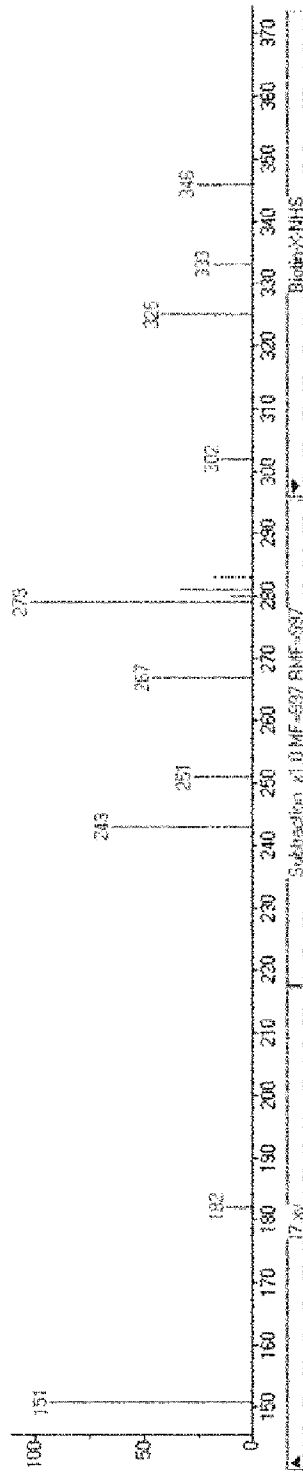


Fig.1

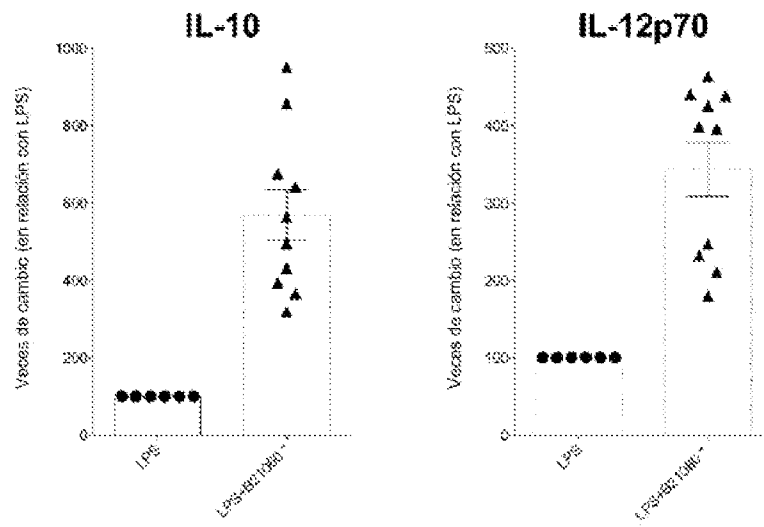


Fig.2

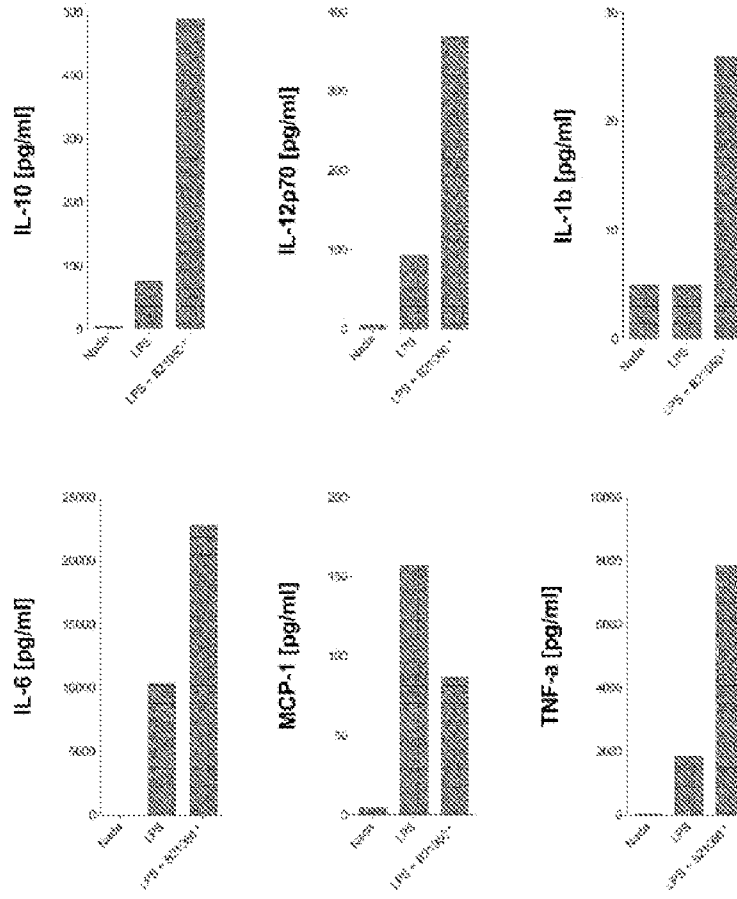


Fig.3

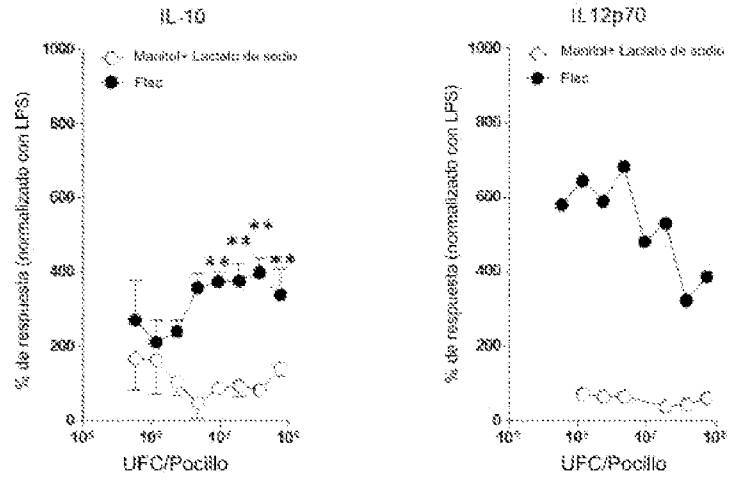


Fig.4

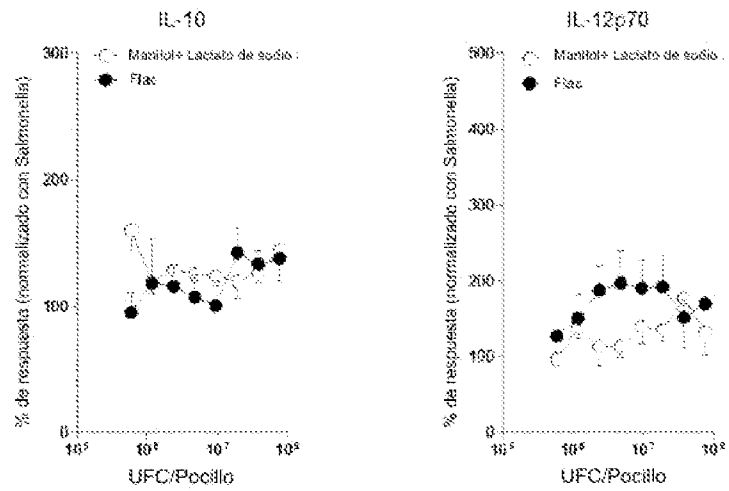


Fig.5

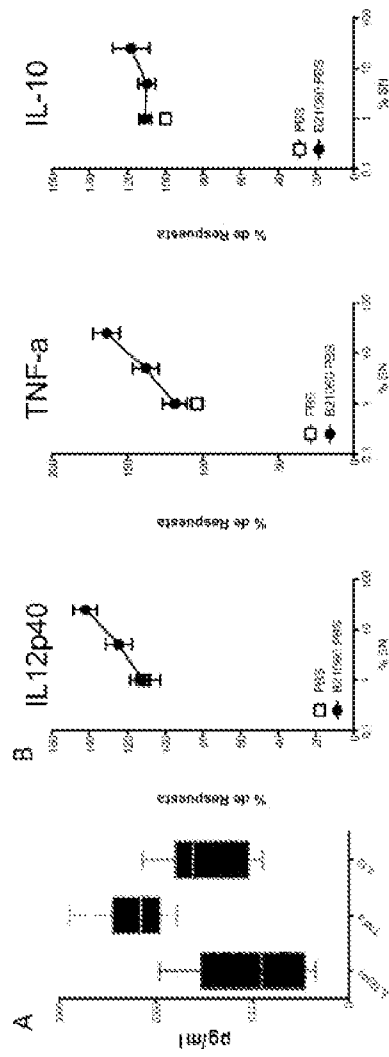


Fig.6

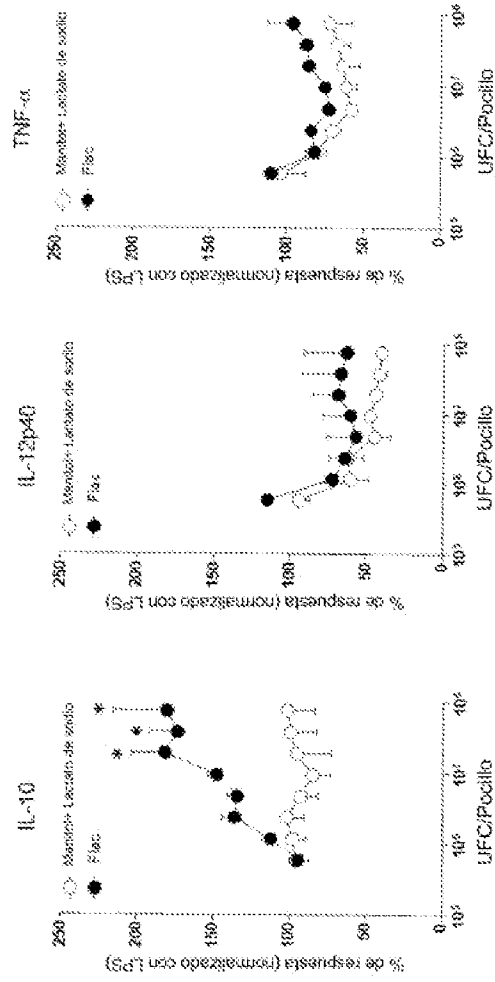


Fig.7

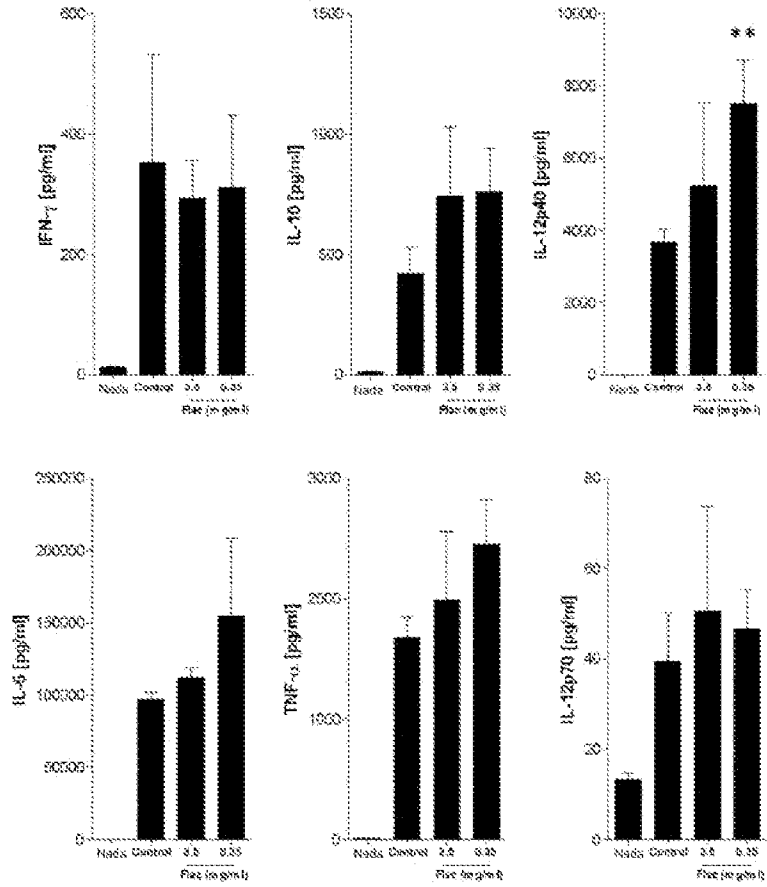


Fig.8

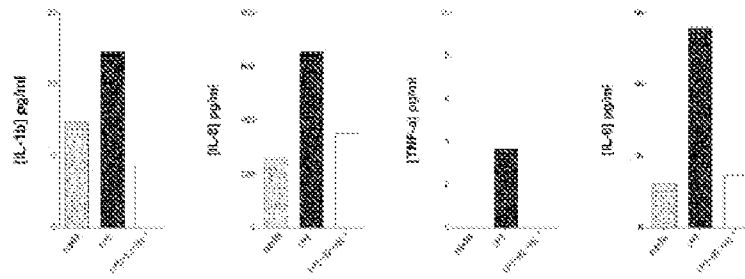


Fig.9

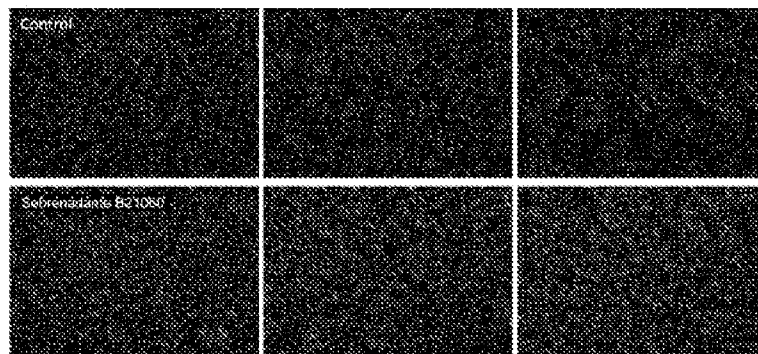


Fig.10