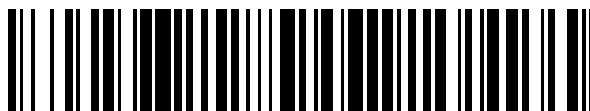


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 782 198**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/64 (2015.01)

C12R 1/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2017 PCT/EP2017/051839**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2017 WO17129787**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2017 E 17703353 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3408373**

54 Título: **Cepa bacteriana como agentes de prevención y/o de tratamiento de patologías respiratorias**

30 Prioridad:

27.01.2016 FR 1650656

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

11.09.2020

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR
L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET
L'ENVIRONNEMENT (100.0%)
147 rue de l'Université
75007 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**THOMAS, MURIEL;
REMOT-BRIZION, AUDE y
LANGELLA, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 782 198 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 bacteriana como agentes de prevención y/o de tratamiento de patologías respiratorias

5 **Introducción**

Se ha creído desde hace mucho tiempo que los pulmones sanos eran estériles y que solo las vías aéreas superiores estaban colonizadas por bacterias. Sin embargo, desde 2010, se ha descrito una microbiota pulmonar, en primer lugar en pacientes que padecen asma y Bronco Neumopatía Obstructiva Crónica (BPOC), y después en individuos sanos.

Los datos disponibles en la bibliografía proceden mayoritariamente de estudios de metagenoma [1, 2, 3]. En efecto, la carga bacteriana en los pulmones de buena salud es por lo menos de un orden de magnitud más baja que la del intestino. La mayoría de estas cepas no puede ser detectada por las tecnologías habituales basadas en la puesta en cultivo de las muestras en medios sólidos. Sin embargo, los progresos de las tecnologías de secuenciación han hecho posible la identificación de cepas bacterianas mediante la secuenciación de los genes que codifican los ARNr 16S. Se ha podido demostrar así que la microbiota del pulmón está formada por una diversidad relativamente grande de especies bacterianas. Desde un punto de vista taxonómico, las ramas más expandidas que han sido identificadas en las vías respiratorias son las proteobacterias (Proteobacteria), los Firmicutes y los Bacteroidetes. Los géneros más frecuentes son las *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacteria*, *Veillonella*, *Haemophilus* así como *Neisseria* (Hilty *et al.*, PLoS One. 5(1):e8578, 2010; Erb-Downward *et al.*, PLoS One. 6(2): e16384, 2011).

La colonización por la microbiota tiene un impacto muy importante en la inmunidad y la salud. La investigación en este campo ha sido facilitada por la utilización de ratones axénicos (sin gérmenes). No se ha asociado por el momento ningún microorganismo residente del pulmón a unos efectos beneficiosos sobre la inmunidad pulmonar. Contrariamente al intestino, donde la bibliografía es abundante, la microbiota bacteriana pulmonar aún está poco descrita, y su influencia en el epitelio respiratorio y el desarrollo de la inmunidad en el recién nacido es un tema innovador.

Las patologías respiratorias afectan al sistema respiratorio y provocan trastornos de su funcionamiento. Según las estadísticas publicadas en 2012 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), todavía son la causa principal de muerte de niños menores de cinco años en el mundo en 2010. La mayoría de los agentes patógenos que causan infecciones respiratorias se transmiten por el aire y/o por contacto directo. Existe una necesidad en la técnica para utilizar de manera eficaz y fácil unas composiciones para tratar y prevenir las infecciones de las vías respiratorias y de sus síntomas.

Bei Zhang *et al.* (International Journal of Molecular Medicine, 1 de agosto de 2012, páginas 248-254) describe la utilización de una cepa de *Enterococcus faecalis* para el tratamiento de alergia pulmonar.

Descripción

La presente invención tiene por objeto nuevos tratamientos de las enfermedades respiratorias, en particular el asma. La presente invención tiene en particular por objeto su prevención.

Más particularmente, los presentes inventores han demostrado que una cepa particular de *Enterococcus* sp. posee unas propiedades muy ventajosas en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades respiratorias tales como el asma.

En efecto, esta cepa particular limita, incluso previene, la pérdida de peso en un modelo animal de asma alérgica crónica. En este modelo, los pulmones de los animales que han recibido esta cepa particular no presentan o presentan pocos signos de inflamación, lo cual muestra el efecto protector de dicha bacteria. El epitelio pulmonar de los animales tratados tiene el mismo grosor que el de los animales sanos, mientras que sus células epiteliales tienen un aspecto muy similar al de las células sanas. Además, la cepa de la invención provoca una expresión aumentada de ciertas citocinas Th1 pero no la de las citocinas Th2, cuya expresión podrá incluso disminuir en ciertos casos.

En un primer aspecto, la invención tiene por objeto una cepa de *Enterococcus* sp. que posee unas propiedades de prevención y/o de tratamiento de las enfermedades respiratorias. Más específicamente, la invención tiene por objeto la cepa de *Enterococcus* sp. depositada con el número I-4969 el 14 de abril de 2015 en la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes (CNCM), 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia.

La cepa I-4969 es producida por cultivo, por ejemplo, en un medio de crecimiento conocido por el experto en la materia (por ejemplo, un medio BHI: "Brain-Heart Infusion") durante 2 a 3 días, a una temperatura de 30-37°C, con o sin ajuste de pH. Se recoge el caldo de fermentación que contiene las células bacterianas. El caldo puede ser utilizado tal cual, concentrado o liofilizado. Ventajosamente, las bacterias se recogerán, por ejemplo por

centrifugación y luego se resuspenderán en un tampón apropiado, por ejemplo PBS ("phosphate buffered saline"). La concentración bacteriana se puede establecer utilizando un citómetro de flujo u otro procedimiento equivalente.

La cepa de la invención es particularmente ventajosa por que provoca un aumento de la expresión de citocinas Th1 pero no la de las citocinas Th2, cuya expresión podrá incluso disminuir en ciertos casos. El experto en la materia conoce en efecto que las citocinas Th2 se expresan en numerosas enfermedades respiratorias, en particular el asma alérgica (Atamas *et al.*, F1000 Biol Rep. 2013; 5:3). Ahora bien, también es conocido que las citocinas Th1 tienen un efecto inhibitor sobre la vía Th2. Sin querer estar vinculado por la teoría, se puede pensar que la expresión de las citocinas Th1 inducida por la bacteria de la invención permite atenuar los efectos de las enfermedades respiratorias, en particular del asma, por menor activación de la respuesta Th2. De hecho, los inventores han observado que la bacteria de la invención no activa, o incluso disminuye, la activación de la respuesta Th2 y protege contra el retraso del crecimiento inducido por el asma.

Por "vía Th1" o "respuesta Th1", y por "vía Th2" o "respuesta Th2" se entiende en la presente memoria el proceso de la diferenciación de células T nativas en linfocitos Th1 o Th2 respectivamente. Se denomina "linfocitos T CD4 Th1" una población de linfocitos T CD4 activados que orientan la respuesta inmunitaria hacia la respuesta celular y la citotoxicidad. Asimismo, los "linfocitos T CD4 Th2" en el sentido de la invención corresponden a una población de linfocitos T CD4 activados que orientan la respuesta inmunitaria hacia la respuesta humoral con la producción de anticuerpos y, llegados al extremo, la síntesis de IgE.

El término "citocina", tal como se entiende en la presente memoria, se refiere a una familia de pequeñas proteínas secretadas reguladoras que desempeñan un papel crucial en las respuestas inmunitarias. Las citocinas están implicadas en la comunicación entre células y regulan numerosas funciones celulares, como por ejemplo la supervivencia y el crecimiento de las células, así como la inducción de la expresión de numerosos genes. Las citocinas pueden ser producidas por numerosos tipos de células.

Por "citocinas Th1" se entiende en la presente memoria las citocinas que son producidas por los linfocitos T CD4 Th1 (IL-2, IFN γ y TFN β) o que son producidas por otros tipos de células en el mismo contexto que caracterizan una activación de la vía Th1 (IL-12p70). Por "citocinas Th2" se entiende en la presente memoria las citocinas que producen los linfocitos T CD4 Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) o que son producidas por otros tipos celulares en el mismo contexto que caracterizan una activación de la vía Th2 (TSLP).

Según la presente invención, los términos "sobreexpresión" o "expresión aumentada" se refieren a una expresión incrementada de un gen de interés, en particular el gen de una citocina Th1, con respecto a la de dicho gen en un control de referencia, tal como por ejemplo un control que no ha sido tratado con la bacteria de la invención. El término "expresión", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la transcripción y a la acumulación estable de sentido (ARNm). La expresión comprende asimismo la traducción del ARNm en un polipéptido. El término "aumentado", tal como se utiliza en la presente memoria en ciertos modos de realización, significa una cantidad mayor, por ejemplo, una cantidad ligeramente superior a la cantidad de origen o por ejemplo una cantidad en gran exceso con respecto a la cantidad de origen, y en particular todas las cantidades en el intervalo. Como variante, "aumento" puede hacer referencia a una cantidad o a una actividad que es por lo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% o 20% más que la cantidad o actividad con la cual se compara la cantidad o la actividad incrementada. Los términos "aumentado", "mayor que" e "incrementado" se utilizan en la presente memoria de manera intercambiable.

Por "disminución de la respuesta Th2" o "menor activación de la respuesta Th2", se entiende en la presente memoria una disminución de la expresión de un gen de interés, en particular el gen de una citocina Th2, con respecto a la de dicho gen en un control de referencia, tal como por ejemplo un control que no ha sido tratado con la bacteria de la invención. El término "disminución", tal como se utiliza en la presente memoria en ciertos modos de realización, significa una cantidad menor, por ejemplo, una cantidad ligeramente inferior a la cantidad de origen, o por ejemplo una cantidad mucho menor que la cantidad de origen, y en particular todas las cantidades en el intervalo. Como variante, "disminución" puede hacer referencia a una cantidad o a una actividad que es por lo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% o 20% menos que la cantidad o actividad con la cual se compara la cantidad o actividad disminuida. Los términos "disminuido", "más pequeño que", "menor" y "descendido" se utilizan en la presente memoria de manera intercambiable.

Dicho "control" tal como se utiliza en la presente memoria puede ser un paciente, un modelo animal o incluso un modelo celular *in vitro*. Preferentemente, el "control" es un paciente. Por "paciente" se entiende en la presente memoria un sujeto humano que padece una enfermedad respiratoria, en particular asma.

En otro aspecto, la presente invención tiene también por objeto una composición farmacéutica que comprende la cepa I-4969 y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La bacteria inactivada induce los mismos efectos que la cepa viva y también posee por lo tanto unas propiedades de prevención y/o de tratamiento de las enfermedades respiratorias.

Según un modo de realización particular de la invención, la cepa I-4969 presente en la composición farmacéutica es una cepa inactivada. Por "cepa inactivada" se entiende en la presente memoria una cepa bacteriana que es incapaz de crecer y/o de dividirse. Preferentemente, una cepa inactivada ya no tiene ninguna actividad metabólica. Sin embargo, las bacterias inactivadas según la invención todavía son capaces de moderar la vía de activación Th2, es decir que la administración de la bacteria inactivada provoca una disminución de la activación de la vía Th2.

Las técnicas de inactivación de las bacterias son muy conocidas por el experto en la materia. Se citará por ejemplo la inactivación por calor, la irradiación por UV o rayos gamma, el tratamiento por ácidos, el tratamiento por peróxido de hidrógeno, etc. Las bacterias según la invención serán inactivadas preferentemente mediante tratamiento con calor.

Es particularmente ventajoso utilizar unos extractos de la cepa I-4969 en las composiciones farmacéuticas de la invención. Un "extracto" tal como se entiende en la presente memoria consiste en un lisado de la cepa I-4969.

La lisis puede ser realizada mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia: lisis alcalina, lisis por sonicación, lisis por alta presión (prensa de French), etc.

Las composiciones de la invención son útiles para el tratamiento de las enfermedades respiratorias. Los términos "tratar", "tratado", "tratamiento", así como los términos análogos, tales como se utilizan en la presente memoria, se refieren a la reducción o a la mejora de los síntomas de un trastorno (por ejemplo, una enfermedad respiratoria, en particular el asma) y/o de los síntomas asociados con este en un sujeto. Se debe observar que, aunque no esté excluido, el tratamiento de un trastorno o de un estado no necesita que la patología, la condición o los síntomas que le están asociados sean eliminados por completo.

Los términos "prevenir", "prevención" así como los términos análogos, tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren a la supresión del riesgo de aparición de un trastorno (por ejemplo, una enfermedad respiratoria, en particular el asma) y/o los síntomas asociados con este en un sujeto.

En la presente memoria se entiende por "sujeto" cualquier mamífero que se pueda beneficiar del tratamiento descrito en la presente memoria, incluido el ser humano, el perro, el gato, los bovinos, los caprinos, los cerdos, los ovinos y los primates no humanos. Más específicamente, se denomina en la presente memoria "paciente" a un sujeto humano. Dicho paciente puede pertenecer a cualquier grupo de edad, es decir, el paciente puede ser un niño, un adolescente o un adulto. Es conocido que los niños son más sensibles a las enfermedades respiratorias, en particular el asma. En un modo de realización preferido, el paciente según la invención es un niño.

Por "enfermedad respiratoria" en el sentido de la invención, se entiende en la presente memoria las enfermedades del aparato respiratorio o que provocan trastornos de la respiración.

Más particularmente, las composiciones de la invención son útiles para el tratamiento y/o la prevención de trastornos respiratorios inflamatorios, por ejemplo el asma (leve, moderada o grave), por ejemplo, bronquítica, alérgica, intrínseca, extrínseca, inducida por el ejercicio, de origen medicamentoso (incluida la aspirina y AINS) y el asma inducida por el polvo, el asma resistente a los esteroides, la bronquitis, incluida la bronquitis infecciosa y eosinofílica, una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), como la BPCO (bronco-neumopatía crónica obstructiva), la fibrosis quística, la fibrosis pulmonar, incluida la alveolitis fibrosante criptogénica, la fibrosis pulmonar idiopática, neumonías intersticiales idiopáticas, la fibrosis que complica una terapia antineoplásica y la infección crónica, incluida la tuberculosis y la aspergilosis y otras infecciones fúngicas; complicaciones del trasplante pulmonar; vascularidad y trastornos tromboticos del sistema vascular pulmonar e hipertensión arterial pulmonar (incluida la hipertensión arterial pulmonar); actividad antitusiva que comprende el tratamiento de la tos crónica asociada a unas afecciones inflamatorias y secretoras de las vías respiratorias y la tos iatrogénica; rinitis aguda y crónica, incluida la rinitis medicamentosa y la rinitis vasomotora; rinitis alérgica perenne y estacional, incluida la rinitis nerviosa (fiebre del heno); poliposis nasal; infección viral aguda, incluido el resfriado, y la infección debida al virus respiratorio sincitial, la gripe, el coronavirus (en particular SRAS) y el adenovirus, un edema pulmonar, embolia pulmonar, neumonía, sarcoidosis pulmonar, la silicosis, pulmón de granjero y las enfermedades relacionadas; neumopatía de hipersensibilidad, insuficiencia respiratoria, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, el enfisema, la bronquitis crónica, la tuberculosis y el cáncer de pulmón.

En particular, las utilizaciones y las composiciones de la presente invención engloban la prevención y el tratamiento del asma, de la BPCO y de la rinitis. Aún más particularmente, las utilizaciones y las composiciones de la presente invención se refieren a la prevención y al tratamiento del asma. Los inventores han demostrado que la cepa I-4969, incluso cuando es inactivada por el calor, es particularmente eficaz para prevenir el asma cuando se administra antes de la aparición del conjunto de síntomas de la enfermedad. La utilización de la cepa de la invención y la composición que la comprende podrán así ser utilizadas en particular eficazmente para prevenir la aparición del asma en unos sujetos conocidos por su predisposición a esta patología (por ejemplo, unos sujetos que tienen una predisposición familiar al desarrollo del asma).

Se entiende en la presente memoria por "asma" una enfermedad pulmonar inflamatoria crónica que se caracteriza por la obstrucción reversible de las vías respiratorias. Más particularmente, el asma es un síndrome inflamatorio crónico de la mucosa bronquial en el que numerosas células desempeñan un papel (en particular los mastocitos, los eosinófilos y los linfocitos T) en un proceso en cascada. La inflamación provoca la contracción de los músculos bronquiales lisos (broncoconstricción) asociada a la inflamación de las paredes. Esto conduce a una reducción del diámetro de los bronquios, con lo cual, una limitación del flujo aéreo que es, por lo menos en parte, reversible (o bien espontáneamente, o bien por acción terapéutica). La inflamación causa asimismo un aumento asociado de la reactividad de las vías aéreas a una diversidad de estímulos. Además, la inflamación provoca una hipersecreción de moco. La enfermedad se manifiesta por unas crisis, en forma de sibilancias, de tos y de episodios de dificultad respiratoria sibilante (disnea).

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden, además de la cepa I-4969, uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

Por "excipiente farmacéuticamente aceptable", se entiende en la presente memoria un excipiente cuya administración a un individuo no va acompañada de efectos deletéreos significativos. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son muy conocidos por el experto en la materia.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "excipiente farmacéuticamente aceptable" comprende todos los disolventes, tampones, soluciones salinas, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y análogos que son fisiológicamente compatibles. Los excipientes se seleccionan según la forma farmacéutica y el modo de administración deseado, de entre los excipientes habituales conocidos por el experto en la materia. El tipo de soporte se seleccionará en función de la vía de administración prevista. En diversos modos de realización, el soporte es apropiado para una administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, transdérmica u oral. Los vehículos farmacéuticamente aceptables comprenden las soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de medios y agentes para unas sustancias farmacéuticamente activas es muy conocida en la técnica. Una composición farmacéutica típica para una perfusión intravenosa podría estar constituida para contener 250 ml de solución de Ringer estéril y 100 mg de la combinación. Los procedimientos para preparar unos compuestos administrables por vía parenteral serán conocidos o evidentes para el experto en la materia y se describen con mayor detalle en, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Science, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985)", y las ediciones 18ª y 19ª de este manual.

Las composiciones de la invención se administran al paciente a una dosis terapéuticamente eficaz. El término "dosis terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la cantidad necesaria para observar una actividad terapéutica o preventiva sobre la enfermedad respiratoria, en particular el asma, en particular la cantidad necesaria para observar una mejoría de los síntomas. La cantidad de bacteria I-4969 a administrar, así como la duración del tratamiento son evaluadas por el experto en la materia según el estado fisiológico del sujeto a tratar, la naturaleza de la o de las articulaciones artríticas a tratar, el péptido elegido, así como la vía de administración utilizada. La cepa bacteriana utilizada según la invención se puede administrar en forma de una dosis única o de dosis múltiples.

El experto en la materia sabrá así elegir lo mejor posible las vías y los modos de administración de la composición según la invención, así como las posologías y formas galénicas óptimas, según los criterios tenidos en cuenta generalmente en la fabricación de un medicamento o el establecimiento de un tratamiento farmacéutico o veterinario. Preferentemente, estos compuestos se administrarán por vía sistémica, en particular por vía intravenosa, por vía intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea, por vía oral, o por vía tópica (por medio de gel, aerosoles, gotas, etc.). Las formas unitarias de administración apropiadas comprenden las formas por vía oral tales como los comprimidos, las cápsulas blandas o duras, los polvos, los gránulos y las soluciones o suspensiones orales, las formas de administración sublingual, bucal, intratraqueal, intraocular, intranasal, por inhalación, las formas de administración tópica, transdérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa, las formas de administración rectal y los implantes. Para la aplicación tópica, se pueden utilizar los compuestos según la invención en cremas, geles, pomadas o lociones.

Será particularmente ventajoso según la invención administrar la composición por vía enteral, oral, parenteral (por ejemplo subcutánea, intradérmica o intramuscular) o mucosal (por ejemplo intranasal, sublingual, intravaginal, transcutánea). De manera más preferida, la composición farmacéutica de la invención se administrará varias veces, de manera espaciada en el tiempo. Su modo de administración, su posología y su forma galénica óptima pueden ser determinados según los criterios tenidos en cuenta generalmente en el establecimiento de un tratamiento adaptado a un paciente, como por ejemplo la edad o el peso corporal del paciente, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios constatados.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el principio activo o los principios activos se formulan generalmente en unidades de dosificación. Por ejemplo, cuando se administra la bacteria I-3699 viva, la unidad de

dosificación contiene entre 10^2 y 10^5 ufc, ventajosamente entre 10^3 y 10^5 ufc, preferentemente entre 10^3 y 10^4 ufc por unidad de dosificación, para las administraciones diarias, una o varias veces al día. Por otro lado, cuando se administran extractos bacterianos al paciente, la unidad de dosificación contiene entre 2,5 y 500 mg, ventajosamente entre 10 y 250 mg, preferentemente entre 10 y 150 mg por unidad de dosificación, para las administraciones diarias, una o varias veces al día. Aunque estas dosificaciones sean unos ejemplos de situaciones medias, puede haber casos particulares en los que son apropiadas unas dosificaciones más elevadas o más bajas, dichas dosificaciones pertenecen asimismo a la invención. Según la práctica habitual, la dosificación apropiada para cada paciente es determinada por el médico según el modo de administración, la edad, el peso y la respuesta de dicho paciente.

La invención se describirá de manera más precisa por medio de los ejemplos siguientes.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Los pulmones GF (*germ-free*) son totalmente funcionales a pesar de una homeostasis diferente.

- (A) Se fijaron los pulmones, se recubrieron con parafina y se cortaron por secciones de 5 μ m. Las secciones de pulmón se colorearon con hematoxilina eosina azafrán (HES) y se fotografiaron con la ayuda de un escáner de lámina y del programa CaseViewer. Se muestra una sección representativa por grupo.
- (B) Se dosificó la ferritina en 30 μ g de proteínas totales de pulmón. Los datos se muestran individualmente y como media $\pm$ desviación estándar.
- (C) El nivel de ARNm se expresa como $2^{-\Delta Ct}$, calculado a partir del Ct (ciclo umbral) del ARNm aplicado al Ct del ARNm de HPRT (ΔCt). Los datos se muestran individualmente y como media $\pm$ desviación estándar.
- (D) Transferencia de Western anti Aquaporine 4 y TLR4 a partir de proteínas de pulmones.
- (E) Se marcaron las células de pulmón con un anticuerpo monoclonal (mAb) o un control isotópico y se analizaron por citometría de flujo. Las células dendríticas plasmocitoides (pDC) se identificaron como unas células CD11c⁺ MHCII⁺ mPDCA1⁺ CD11b⁻. Las células dendríticas se analizaron por selección de las células CD11c⁺ de entre las CLH II^{high} y análisis de la expresión de CD11b y CD103, lo cual permite definir los dos subgrupos principales de células dendríticas: CD11b⁺ CD103⁻ (CD11b) y CD11b⁻ CD103⁺ (CD103). Las células T se identificaron como células CD3⁺ CD4⁺ o CD3⁺ CD8⁺. Los datos corresponden a la media $\pm$ desviación estándar de $n \geq 6$ ratones.

Todos los datos se obtuvieron en dos experimentos independientes.

Figura 2. El asma inducido por HDM no se exagera en los ratones GF.

- (A) Protocolo para inducir el asma con HDM.
- (B) Se contaron las células presentes en el lavado broncoalveolar (BAL), se citocentrifugaron y se colorearon con el May-Gründwald-Giemsa. Se contaron los eosinófilos y se expresan en % de las células BAL totales. Se midieron los niveles de la citocina IL-5 en el BAL y de IgE séricas mediante ELISA. Los datos corresponden a la media $\pm$ desviación estándar.
- (C) Se aislaron las células de cada ganglio linfático respiratorio (RLN) y se cultivaron 72 horas en RPMI con o sin HDM. Se midieron los niveles en el sobrenadante de las citocinas IL-5 e IL-10 mediante ELISA. Los valores RPMI $\pm$ HDM para un mismo ratón están unidos por una línea de puntos.
- (D) La histología de los pulmones se realizó como se describe para la figura 1. Se muestra una sección representativa por grupo.

Figura 3. La microbiota del pulmón se modificó durante el asma inducida por HDM.

- (A) Se incubaron unos homogeneizados BAL o de pulmón 24h en unas cajas yhBHI y se contaron las unidades formadoras de colonias (ufc) por ml de BAL o por g de pulmón.
- (B) Esquema experimental del protocolo y resultados del recuento bacteriano de los pulmones en diferentes días del protocolo. Unos homogeneizados de pulmón se incubaron 24h en unas cajas yhBHI y se contaron las unidades formadoras de colonias (ufc) totales o de *Staphylococcus* por g de pulmón.
- (C) Las cepas se coincubaron en presencia de explantes de pulmón. Se cuantificaron las citocinas IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-17a, IFN γ y TSLP mediante ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. "Medio": control de los medios de cultivo sin bacterias.

Figura 4. La intervención bacteriana puede modular las características del asma.

(A) Esquema experimental del protocolo.

(B) Los ratones se pesan diariamente. Las curvas de crecimiento corresponden a la media $\pm$ desviación estándar del peso de un ratón (normalizado al peso inicial en el día-2). Se utilizó para comparar las curvas de crecimiento el método de Tukey para las comparaciones múltiples en ANOVA.

Figura 5. La firma Th2 disminuye mediante CNCM I 4969.

(A) Se contaron las células presentes en el lavado broncoalveolar (BAL), se citocentrifugaron y se colorearon con el May-Gründwald-Giemsa. Se contaron los eosinófilos y se expresan en % de las células BAL totales. 4969

(B) Se midieron los niveles de citocina IL-5 en el BAL y de IgE séricas mediante ELISA. Los datos corresponden a la media $\pm$ desviación estándar.

(C) Se aislaron las células de cada ganglio linfático respiratorio (RLN) y se cultivaron 72 horas en RPMI con o sin HDM. Se midieron los niveles en el sobrenadante de las citocinas IL-5 e IL-10 mediante ELISA. Los valores RPMI $\pm$ HDM para un mismo ratón están unidos por una línea de puntos.

Figura 6. CNCM I 4969 protege contra la inflamación del pulmón, mientras que CNCM I 4970 la incrementa.

(A) Se colorearon unas secciones de pulmones de 5 μ m con hematoxilina eosina azafrán (HES) o con el azul Alcian/reactivo de Schiff con ácido periódico (PAS).

(B) Se midió el grosor de los epitelios de pulmón para cada sección de pulmón.

Figura 7. Cuando se administran juntas, CNCM I 4969 y 4970 inducen un perfil de inflamación intermedio.

(A) Los ratones se pesan diariamente. Las curvas de crecimiento corresponden a la media $\pm$ desviación estándar del peso de un ratón (normalizado al peso inicial en el día-2). Se utilizó para comparar las curvas de crecimiento el método de Tukey para las comparaciones múltiples en ANOVA.

(B) Se contaron las células presentes en el lavado broncoalveolar (BAL), se citocentrifugaron y se colorearon con el May-Gründwald-Giemsa. Se contaron los eosinófilos y se expresan en % de las células BAL totales.

(C) Se aislaron las células de cada ganglio linfático respiratorio (RLN) y se cultivaron 72 horas en RPMI con o sin HDM. Se midieron los niveles en el sobrenadante de citocina IL-5 mediante ELISA. Los valores RPMI $\pm$ HDM para un mismo ratón están unidos por una línea de puntos.

(D) Se colorearon unas secciones de pulmones de 5 μ m con hematoxilina eosina azafrán (HES) o con el azul Alcian/reactivo de Schiff con ácido periódico (PAS).

Figura 8. La cepa bacteriana CNCM I 4969 inactivada por el calor favorece el aumento de peso de los ratones asmáticos y los protege así contra el retraso del crecimiento debido al asma.

Los ratones se pesan diariamente. Las curvas de crecimiento corresponden a la media $\pm$ desviación estándar del peso de un ratón (normalizado al peso inicial en el día-2). Se utilizó para comparar las curvas de crecimiento el método de Tukey para las comparaciones múltiples en ANOVA.

Figura 9. La cepa bacteriana CNCM I 4969 inactivada por el calor no induce una disminución de las IgE sanguíneas.

Se midió el nivel de la citocina IgE sérica mediante ELISA. Los datos corresponden a la media $\pm$ desviación estándar.

Ejemplos

1. Procedimientos experimentales

• Efecto sobre la evolución del asma en unos ratones inoculados con la cepa bacteriana CNCM I 4969

Cepas bacterianas, medios, condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas pulmonares se aislaron a partir de homogeneizados de pulmones de ratón con un homogeneizador (Ultraturax (IKA) o Tissu Lyser (Qiagen)). Se cultivaron a continuación en medio yhBHI, M17, MRS, o Mannitol Sel Agar durante 24 a 48 h a 37°C en condiciones aeróbicas o 5 días a 37°C en una cámara Freter en condiciones anaeróbicas. Las cepas aisladas se congelaron a -80°C en 16% de glicerol. La identidad de cada cepa se confirmó por espectrofotometría de masas y secuenciación por PCR del ARN 16S. Las cepas seleccionadas se depositaron en la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes (CNCM). La cepa de la invención se depositó así con la referencia CNCM I 4969. Se debe observar que esta cepa se caracterizó originalmente como un estreptococo. Sin embargo, unos estudios posteriores por espectrofotometría de masas permitieron demostrar que esta bacteria es parte de la familia *Enterococcus* sp. que es muy parecida a un estreptococo. Por otra parte, una cepa *Staphylococcus sciuri* se aisló en la misma criba (CNCM I 4970).

Animales y procedimientos relacionados

Los presentes experimentos en los animales fueron aprobados por el comité de ética COMETHEA con el número 01553.01. SPF. Se obtuvieron los ratones C57BL/6 de Janvier (Le Genest, St Isle, Francia). Fueron cruzados y criados en condiciones FELASA SPF en los animalarios del solicitante (IERP, INRA, Jouy-en-Josas o VIB, Gent). Los ratones GF C57BL/6 se obtuvieron de CDTA (CNRS, Orleans, Francia) o por reproducción interna (INRA, Jouy-en-Josas). Fueron cruzados y criados en condiciones estériles en unos aisladores de tipo Trexler (La Calhène, Vélizy, Francia) en el animalario Anaxem (INRA, Jouy-en-Josas). Para la inducción del asma alérgica por HDM, unos ratoncillos de 7 días de edad recibieron 1 µg de HDM (Greer) o PBS sin LPS (Lonza) en un volumen total de 10 µl. Una semana después, recibían 10 µg de HDM (o PBS) durante 5 días consecutivos. En algunos experimentos, unos ratoncillos de 5 días recibieron 1.10⁶ bacterias en PBS en un volumen total de 10 µl, cada dos días.

Extracción de muestras

Los ratones fueron sacrificados por sobredosis de ketamina y de xilazina. El lavado broncoalveolar (BAL) se realizó en los lóbulos derechos con PBS 1 mM EDTA como se ha descrito anteriormente (Roux *et al.*, 2011). Los sobrenadantes de BAL se congelaron y se conservaron a -20°C. Las células BAL se citocentrifugaron (Cytospin 5) en unos portaobjetos de microscopio (Superfrost), y después se colorearon con el May-Grünwald y el Giemsa. El lóbulo derecho se utilizó para la citometría de flujo o para contar las bacterias en cajas de medio gelificado tras la homogeneización con un Tissue Lyser. Para la citometría de flujo, el lóbulo derecho y los ganglios linfáticos respiratorios (RLN) (cervical, mastoideos y mediastínicos) se trataron con 1 mg/ml de colagenasa D y 0,5 mg/ml de ADNasa I para aislar las células. El lóbulo izquierdo del pulmón se guardó a -80°C hasta que se utilizara para extraer el ARN. Alternativamente, los pulmones se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% y se recubrieron con parafina, antes del examen histológico.

Histología

Se colorearon unas secciones de pulmón de 5 µm con hematoxilina eosina azafrán (HES) o con el azul Alcian/reactivo de Schiff con ácido periódico (PAS) y se fotografiaron con la ayuda del programa de software CaseViewer.

Análisis de la expresión de los genes por q-RT-PCR

El ARN total se extrajo de los homogeneizados de pulmón con la ayuda del kit NucleoSpin® RNA (Macherey Nalgen). Los ADNc se obtuvieron mediante retrotranscripción utilizando unos cebadores aleatorios y la transcriptasa inversa (kit High-Capacity cDNA Archive Kit, Applied Biosystems by Life Technologies SAS, Saint Aubin, Francia) según las instrucciones del fabricante. Los cebadores utilizados (Sigma-Aldrich, Eurogentec) están listados en la Tabla Suplementaria 1. La reacción de q-RT-PCR se repitió tres veces para cada gen utilizando el sistema AbiPrism 7000 (Applied Biosystem) y el Takyon™ ROx SYBR MasterMix (Eurogentec). Los datos se analizaron con el programa 700 System SDS (Applied Biosystem) para determinar los valores de ciclo umbral (Ct). La expresión del ARN mensajero (ARNm) se calculó con el procedimiento ΔCt y se aplicó a la expresión de mHPRT.

Transferencia de Western

Se realizaron las extracciones de proteínas y los experimentos de inmunotransferencia como se ha descrito anteriormente (Deschemin *et al.*, 2015). Los anticuerpos utilizados son los siguientes: TLR4 antirratón (sc-30002, Santa Cruz); anti-aquaporin4 (sc-20812, Santa Cruz) y anti-β-actina (Sigma AC-74, producto número A5316). Los anticuerpos secundarios utilizados eran unos anticuerpos anticabra (Calbiochem) o anticonejo (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

Citometría de flujo

Después de haber sido saturadas por unos anticuerpos anti-CD32/CD16, las células se incubaron con unos anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos contra mPDCA1 (JF05-1C2.4.1, conjugados con FITC), MHCII (IA/IE,

2G9 o M5/114.15.2, FITC o PE), CD103 (M290 o 145-2D11, PE), CD86 (GL1, FITC) CD11b (M1/70, PerCP Cy5.5) o CD11c (HL3, Biotina o BV786). Para el marcado de las células T, las células se incubaron con unos anticuerpos dirigidos contra CD4 (L3T4 o RM4-5, FITC o PECy7), CD45.2 (104, A780), CD3 (145-2C11, PerCP Cy5.5) y CD8 (Ly2, 53-6.8, biotina o APC). Todos los mAb se obtuvieron de BD Biosciences excepto para mPDCA1 (Miltenyi Biotec). Se utilizó la estreptavidina conjugada con APC- (BD Biosciences) para marcar el anticuerpo-biotina. Se adquirieron por lo menos $2 \cdot 10^6$ eventos con un FACS Accuri o un Fortessa (BD Biosciences) que se analizaron a continuación con el programa FlowJo Software v7.5 (Tree Star Inc).

Dosificación ELISA de las citocinas y de las Ig

Las citocinas IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-17a e IFN γ (Mabtech) TSLP (Ready-SET-Go, eBiosciences) se cuantificaron mediante ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. Las IgE y las IgG1 se midieron en suero de los diferentes ratones (Ready-SET-Go, eBiosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

La prueba no paramétrica de Mann-Whitney (comparación de 2 grupos, $n \geq 4$), o el método de Tukey para comparaciones múltiples (> 2 grupos) se utilizaron para comparar los valores no apareados (programa GraphPadPrism). La significatividad se representa: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; y **** $p < 0.0001$.

• Efecto sobre la evolución del asma en unos ratones inoculados con la cepa bacteriana CNCM I 4969 inactivada por el calor

Los cultivos de CNCM69 se obtuvieron como se ha descrito anteriormente (108 cfu/mL) y después se incubaron o no durante 10 minutos a 100°C en un baño maría. Después de este tratamiento, el cultivo se extendió en un medio yhBHI Agar durante 24 h a 37°C para verificar la eficacia del tratamiento térmico. No creció ninguna bacteria después del tratamiento térmico, mientras que los cultivos crecieron (después de 24 h a 37°C) para los tubos que no tuvieron el choque térmico.

El protocolo de administración de la cepa y el desencadenamiento del asma en presencia de HDM es el descrito en la figura 2A de la presente solicitud. Se utilizó el mismo procedimiento de inoculación en los animales como el descrito anteriormente, pero la cepa CNCM69 inoculada se inactivó o no mediante un tratamiento con calor.

Además, el nivel de IgE sérica se midió mediante dosificación ELISA en dos grupos de ratones HDM inoculados con la cepa CNCM69 inactivada o no por un tratamiento térmico. El protocolo de dosificación es el mismo que el descrito anteriormente en la leyenda de la figura 5B.

2. Resultados

Con el fin de aislar unas bacterias residentes del pulmón capaces de modular la susceptibilidad del huésped frente a unas patologías respiratorias, se utilizó un modelo de asma inducida en unos ratoncillos. En primer lugar se demostró que los pulmones de las bacterias GF (germ free) son funcionales a pesar de una homeostasis diferente (figura 1). Cuando se indujo el asma alérgica, no se exacerbó en unos ratones GF con respecto al control (figura 2).

Tras la inducción del asma alérgica en el ratoncillo, se modifica la microbiota del pulmón. En efecto, el número de bacterias cultivadas por gramo de pulmón aumenta significativamente al inicio de la inflamación pulmonar (figura 3A). Ciertas bacterias en particular participan en este aumento, mientras que otras bacterias no varían significativamente entre los animales tratados y de control (figura 3B). Este resultado demuestra que una patología respiratoria como el asma está asociada a un cambio de las poblaciones bacterianas residentes del pulmón.

Unas bacterias primo-colonizadoras del pulmón de los ratoncillos se aislaron muy pronto tras el nacimiento (3 días) y hasta el destete (3 semanas). Estas bacterias están vivas, y se pueden cultivar en ausencia o en presencia de oxígeno.

Se depositó una cepa en el CNCM con el número CNCM I-4969. Esta bacteria posee unas propiedades inmunomoduladoras. Cuando estas bacterias primo-colonizadoras se co-cultivan en unas secciones de pulmones, inducen una respuesta del tejido, fuerte y específica, ya que las respuestas inmunitarias medidas por ELISA son diferentes en función de la bacteria utilizada (figura 3C). Por ejemplo, la secreción de citocinas Th1 (IFN γ , IL-12p70), Th2 (TSLP) y antiinflamatoria (IL-10) se midió en presencia de diferentes bacterias, incluyendo CNCM I-4969 y otras bacterias respiratorias aisladas en el laboratorio (una cepa de *E. coli* y un *Proteus mirabilis*).

Los presentes resultados demuestran que la bacteria CNCM 64969, que es una bacteria primocolonizadora del pulmón, posee unas propiedades inmunomoduladoras (tabla siguiente).

Cepas		Screening funcional <i>ex vivo</i> (PCLS, figura 3)	Evolución <i>in vivo</i> durante el asma (figura 1)
A	N/A	Th1	Sin variación
B	N/A	Th1	Sin variación
CNCM I 4969	Estreptococo	Th1	Sin variación
CNCM I 4970	N/A	Th2	Aumenta

Este aspecto se estudió con mayor detalle probando la cepa I-4969 *in vivo* en el ratón como se describe a continuación.

5

Los presentes resultados muestran que los ratoncillos que reciben la bacteria CNCM 4969 están protegidos contra el retraso del crecimiento debido al asma (figura 4).

10

La tabla siguiente, así como la figura 8, muestran que esta protección contra el retraso de crecimiento de los ratoncillos también se mantiene tras la inoculación de la cepa CNCM 4969 desactivada por el calor.

Método de Tukey para comparación múltiple	Diferencia media	q	Significativo? P <0.05?	Resumen	95% CI de la dif.
PBS vs HDM	0.1584	8.100	Sí	***	0.07633 a 0.2406
PBS vs CNCM I 4969 + PBS	0.01299	0.6639	No	ns	-0.06912 a 0.09510
PBS vs CNCM I 4969 + HDM	0.07679	3.925	No	ns	-0.005323 a 0.1589
PBS vs CNCM I 4969 inactivada por el calor + PBS	0.02078	1.062	No	ns	-0.06133 a 0.1029
PBS vs CNCM I 4969 inactivada por el calor + HDM	-0.01388	0.8631	No	ns	-0.09899 a 0.06523
HDM vs CNCM I 4969 + PBS	-0.1455	7.436	Sí	***	-0.2276 a -0.06335
HDM vs CNCM I 4969 + HDM	-0.08166	4.174	No	ns	-0.1638 a 0.004534
HDM vs CNCM I 4969 inactivada por el calor + PBS	-0.1377	7.037	Sí	***	-0.2198 a -0.05555
HDM vs CNCM I 4969 inactivada por el calor + HDM	-0.1753	8.963	Sí	***	-0.2574 a -0.09322
CNCM I 4969 + PBS vs CNCM I 4969 + HDM	0.0638	3.261	No	ns	-0.01831 a 0.1459
CNCM I 4969 + PBS vs CNCM I 4969 inactivada por el calor + PBS	0.007792	0.3984	No	ns	-0.07432 a 0.08990
CNCM I 4969 + PBS vs CNCM I 4969 inactivada por el calor + HDM	-0.02987	1.527	No	ns	-0.1120 a 0.05224
CNCM I 4969 + HDM vs CNCM I 4969 inactivada por el calor + PBS	-0.05601	2.863	No	ns	-0.1382 a 0.02610
CNCM I 4969 + HDM vs CNCM I 4969 inactivada por el calor + HDM	-0.09367	4.788	Sí	*	-0.1758 a -0.01156
CNCM I 4969 inactivada por el calor + PBS vs CNCM I 4969 inactivada por el calor + HDM	-0.03766	1.925	No	ns	-0.1198 a 0.04445

15

Se analizaron a continuación varios parámetros inmunitarios e inflamatorios. Se observó que la bacteria CNCM 4970 aumenta la cantidad de IgE en la sangre (este tipo de inmunoglobulina aumenta en las reacciones alérgicas) (figura 5B). Reestimulando *in vitro* las células de los ganglios linfáticos respiratorios con medio solo o medio que contiene HDM, se constató que las citocinas Th2 han aumentado significativamente menos para los que reciben la CNCM 4969 (figura 5C). Por otro lado, la inflamación del pulmón se atenúa en presencia de la CNCM I-4969, como lo muestran diversos parámetros fisiológicos (figura 6). En contrapartida, la cepa CNCM I-4970 exacerba esta inflamación. Las conclusiones del solicitante son que la bacteria CNCM 4969 disminuye la firma Th2 y protege contra el retraso del crecimiento, lo cual le confiere unas propiedades protectoras contra el asma.

20

Además, los resultados obtenidos tras la dosificación de la tasa de IgE sanguínea en unos ratones inoculados con la cepa CNCM 4969 inactivada por el calor muestran que esta tasa no disminuye, lo cual sugiere que la firma Th2 no aumenta (figura 9).

25

En cuanto a las bacterias CNCM 4969 inactivadas por el calor, también se puede concluir que éstas permiten conferir unas propiedades protectoras contra el asma.

El segundo experimento que realizó el solicitante confirma las curvas de peso del primero. Para este 2º experimento, se tuvieron más ratoncillos y se pudieron añadir unos grupos: las dos bacterias juntas (figura 7); las bacterias inactivadas con calor. Los presentes resultados basados en las curvas de peso y las dosificaciones de las IgE en la sangre muestran que las dos bacterias administradas juntas inducen un perfil intermedio con respecto a los resultados observados con CNM 4969 o 70 solas.

Referencias bibliográficas

1. Sibley CD, Grinwis ME, Field TR, Eshaghurshan CS, Faria MM, *et al.* (2011) Culture Enriched Molecular Profiling of the Cystic Fibrosis Airway Microbiome. PLoS ONE 6: e22702.
2. Gollwitzer E, Saglani S, Trompette A, Yadava K, Sherburn R, *et al.* (2014) Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nature medicine* 20: 642-647.
3. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, *et al.* (2011) Analysis of the Lung Microbiome in the "Healthy" Smoker and in COPD. PLoS ONE 6.
4. Erb-Downward JR, Huffnagle GB, y Martinez FJ (2012) The microbiota in Respiratory Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 185: 1037-1038.
5. Yun Y, Srinivas G, Kuenzel S, Linnenbrink M, Alnahas S, *et al.* (2014) Environmentally determined differences in the murine lung microbiota and their relation to alveolar architecture. PLoS One 9: e1134.
6. Jang S, Kim H, Kim Y, Kang M, Kwon J, *et al.* (2012) Asthma Prevention by Lactobacillus Rhamnosus in a Mouse Model is Associated With CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T Cells. *Allergy, asthma & immunol research* 4: 150-156.
7. Kim H, Kim Y, Lee S, Kang M, Yu H, *et al.* (2013) Effects of Lactobacillus rhamnosus on asthma with an adoptive transfer of dendritic cells in mice. *Journal of applied microbiology* 115: 872-879.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Enterococcus* sp. depositada en la Collection nationale des cultures de microorganismes (CNCM, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia) con el número I-4969.
2. Composición farmacéutica que comprende la cepa de la reivindicación 1 y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
3. Composición según la reivindicación 2, caracterizada por que la cepa está inactivada.
4. Composición según la reivindicación 3, caracterizada por que la cepa está inactivada por el calor.
5. Composición farmacéutica, caracterizada por que comprende un extracto que consiste en un lisado de la cepa de la reivindicación 1.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de las enfermedades respiratorias.
7. Composición para una utilización según la reivindicación 6, caracterizada por que la expresión de las citocinas Th2 no aumenta o disminuye en un paciente tratado con respecto a un paciente no tratado por dicha cepa.
8. Composición para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, caracterizada por que el paciente tratado es un niño.

Figura 1

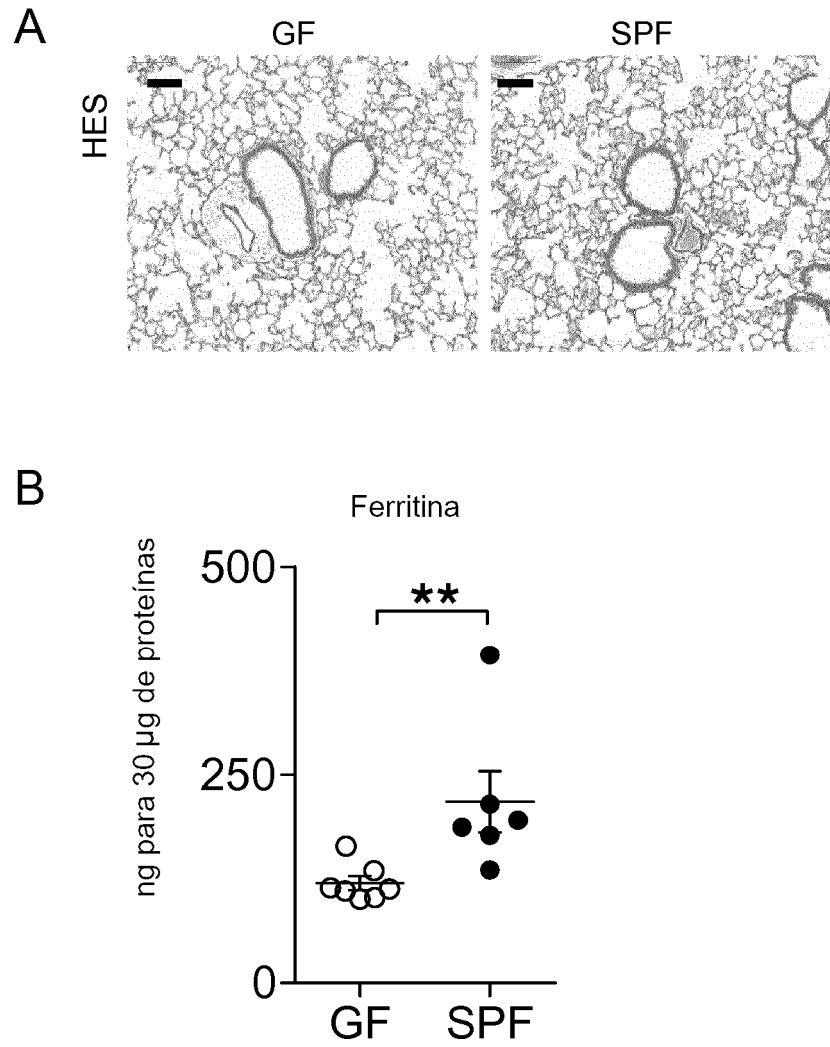


Figura 1 (continuación)

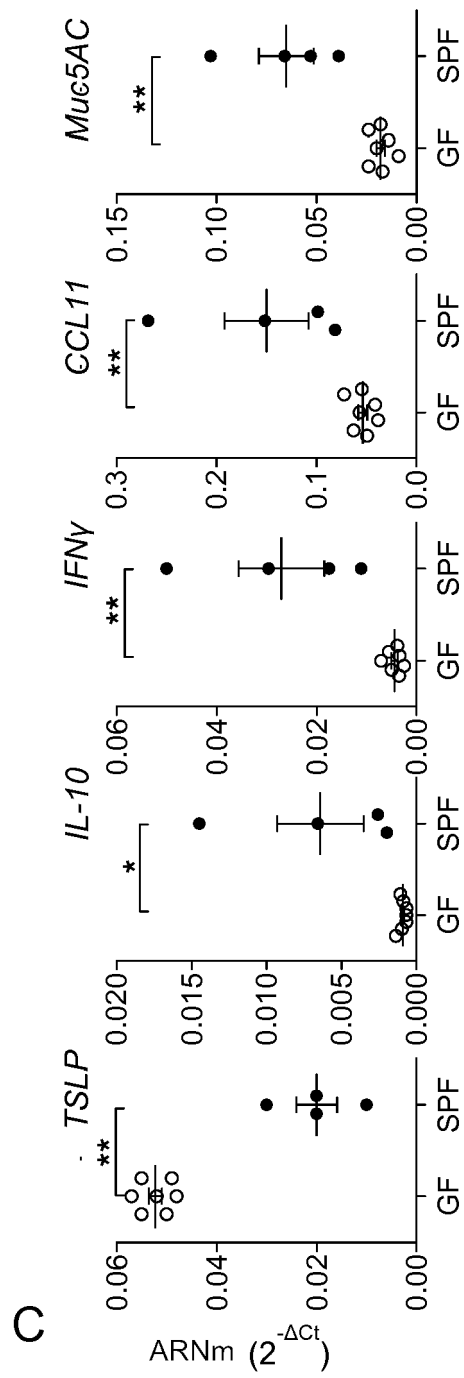
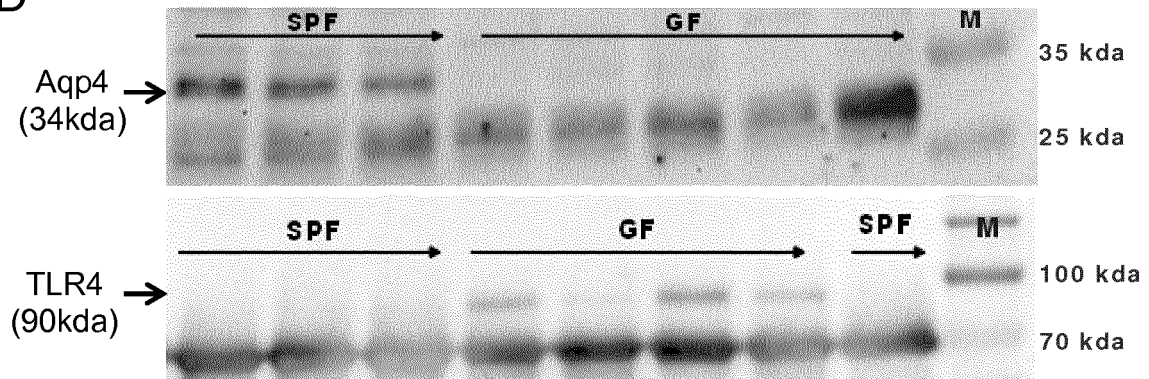


Figura 1 (continuación)

D



E

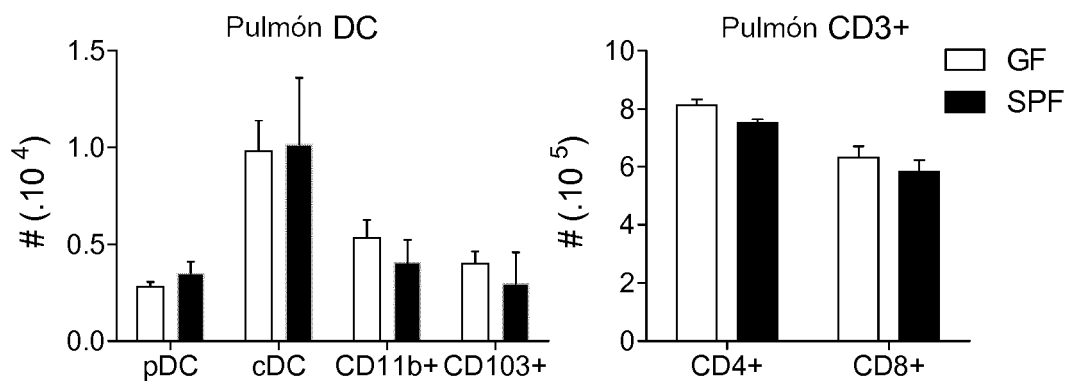


Figura 2

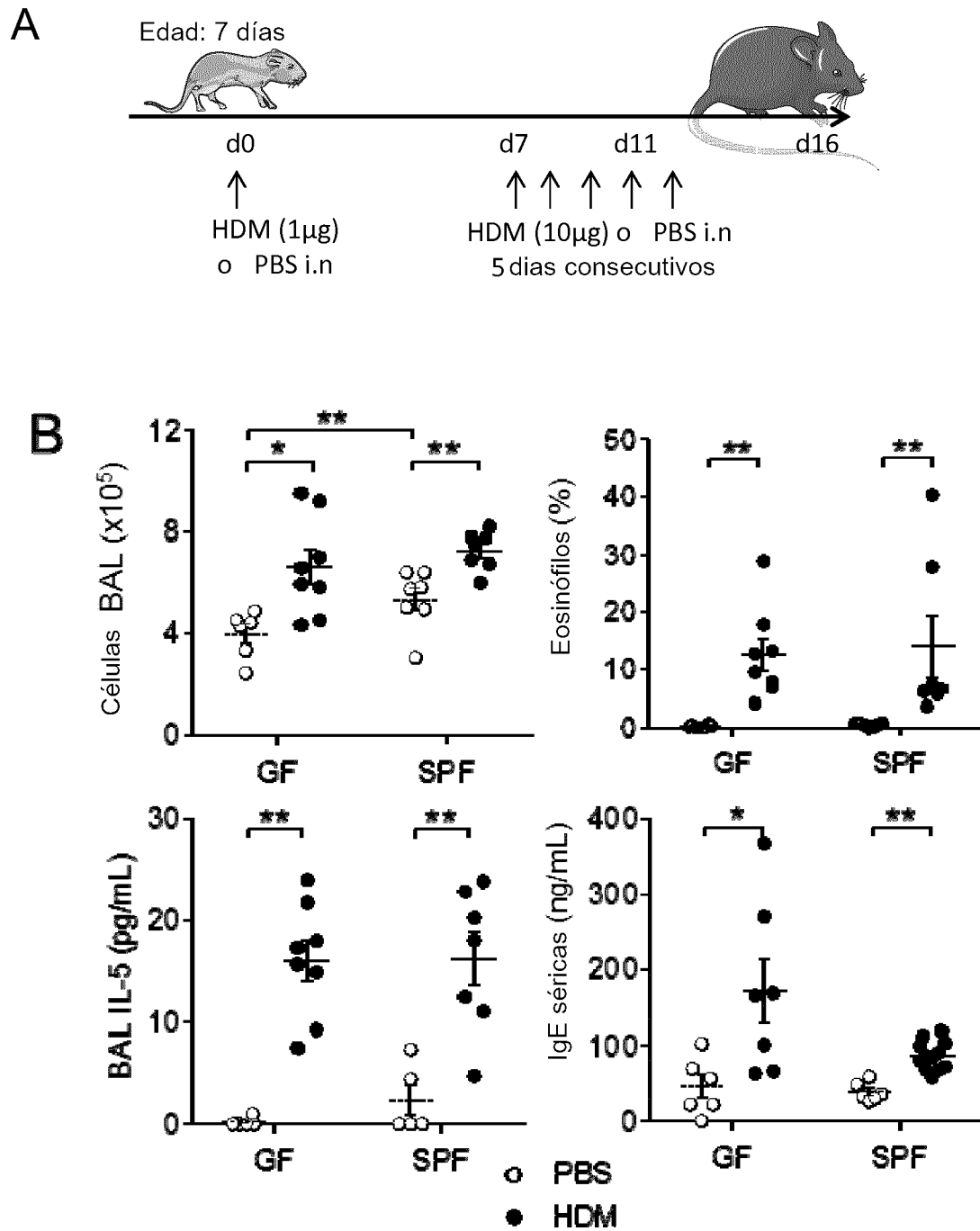


Figura 2 (continuación)

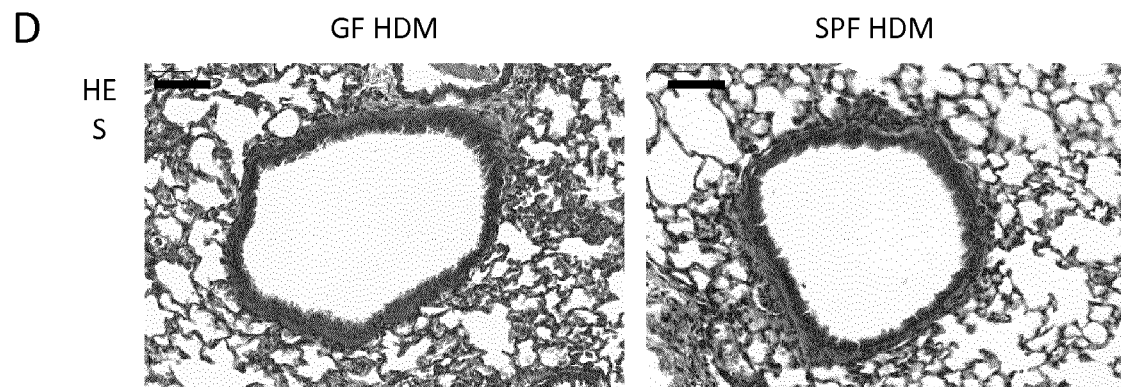
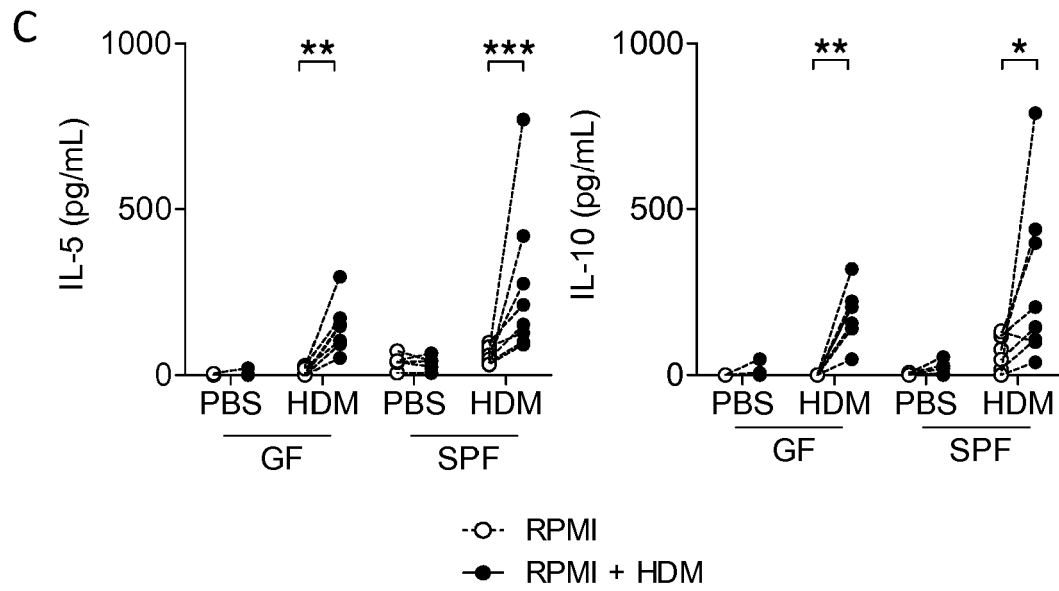


Figura 3

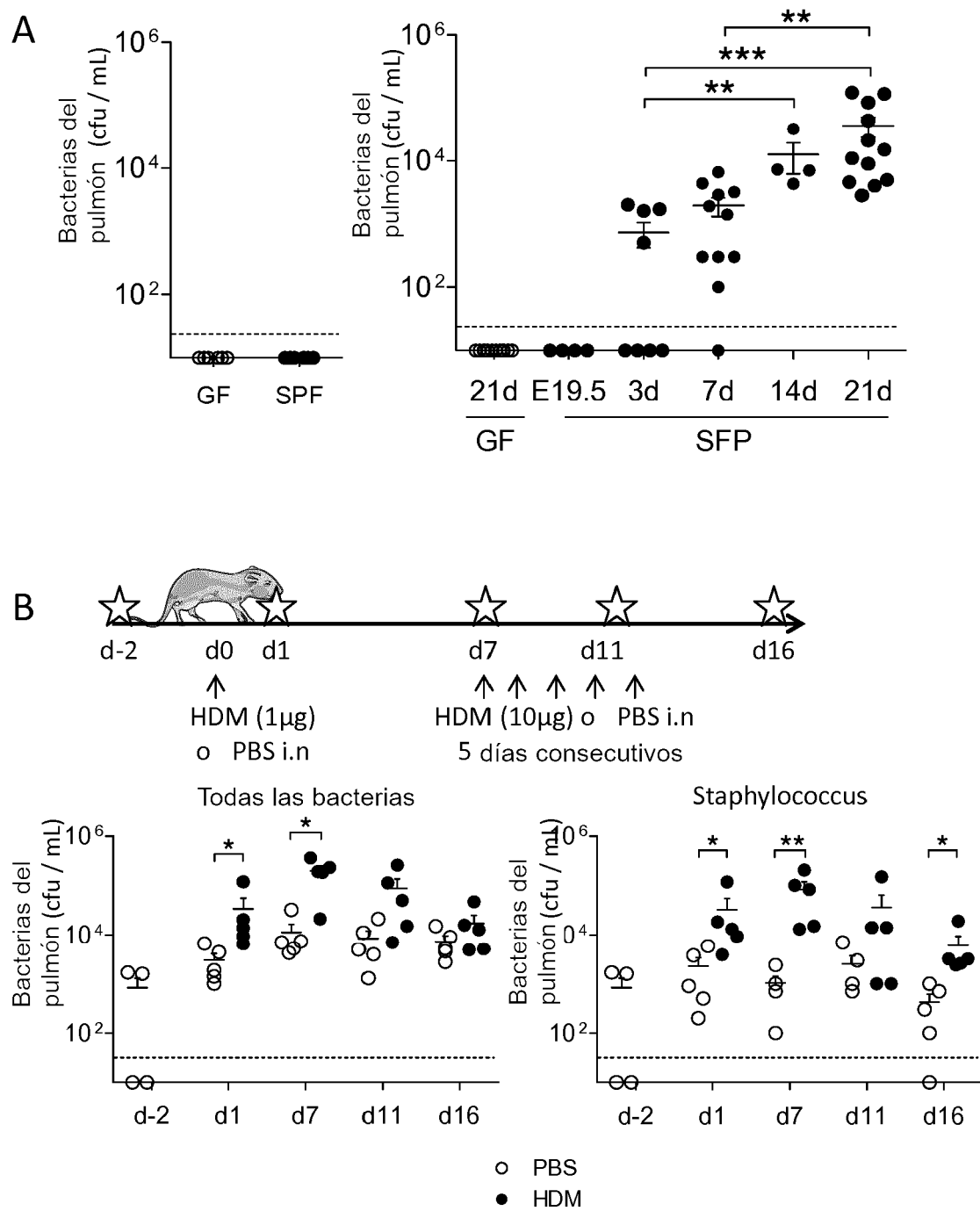


Figura 3 (continuación)

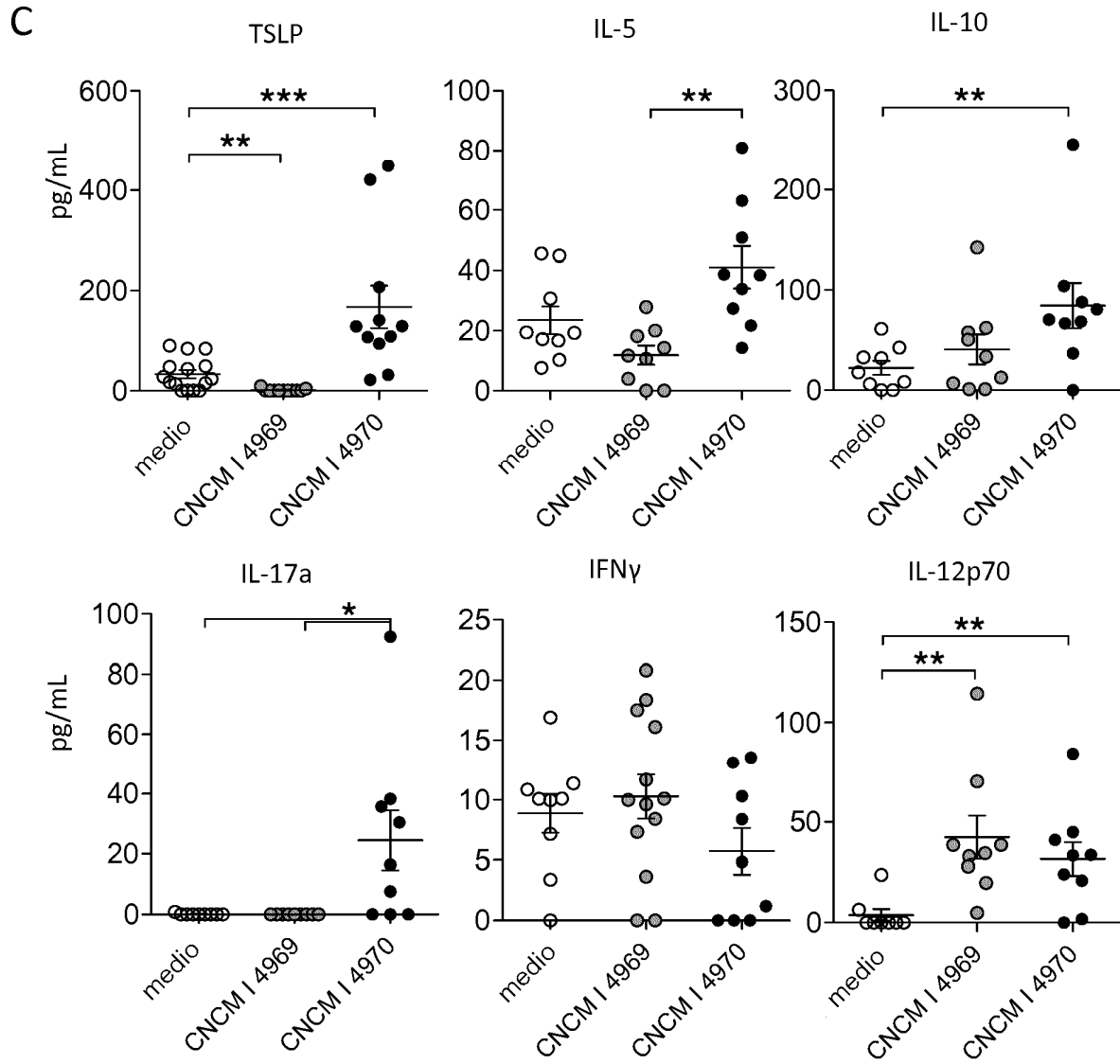


Figura 4

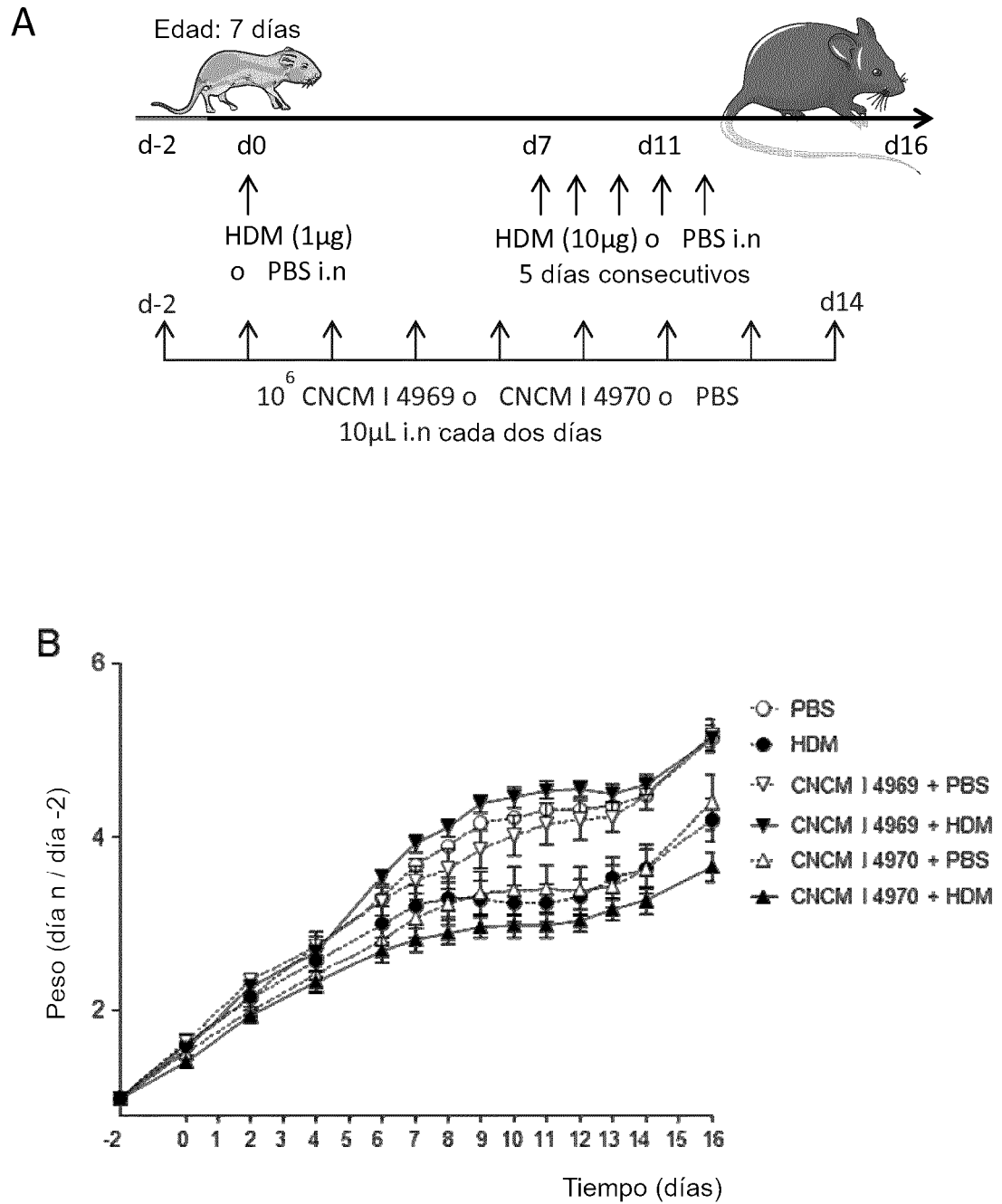


Figura 5

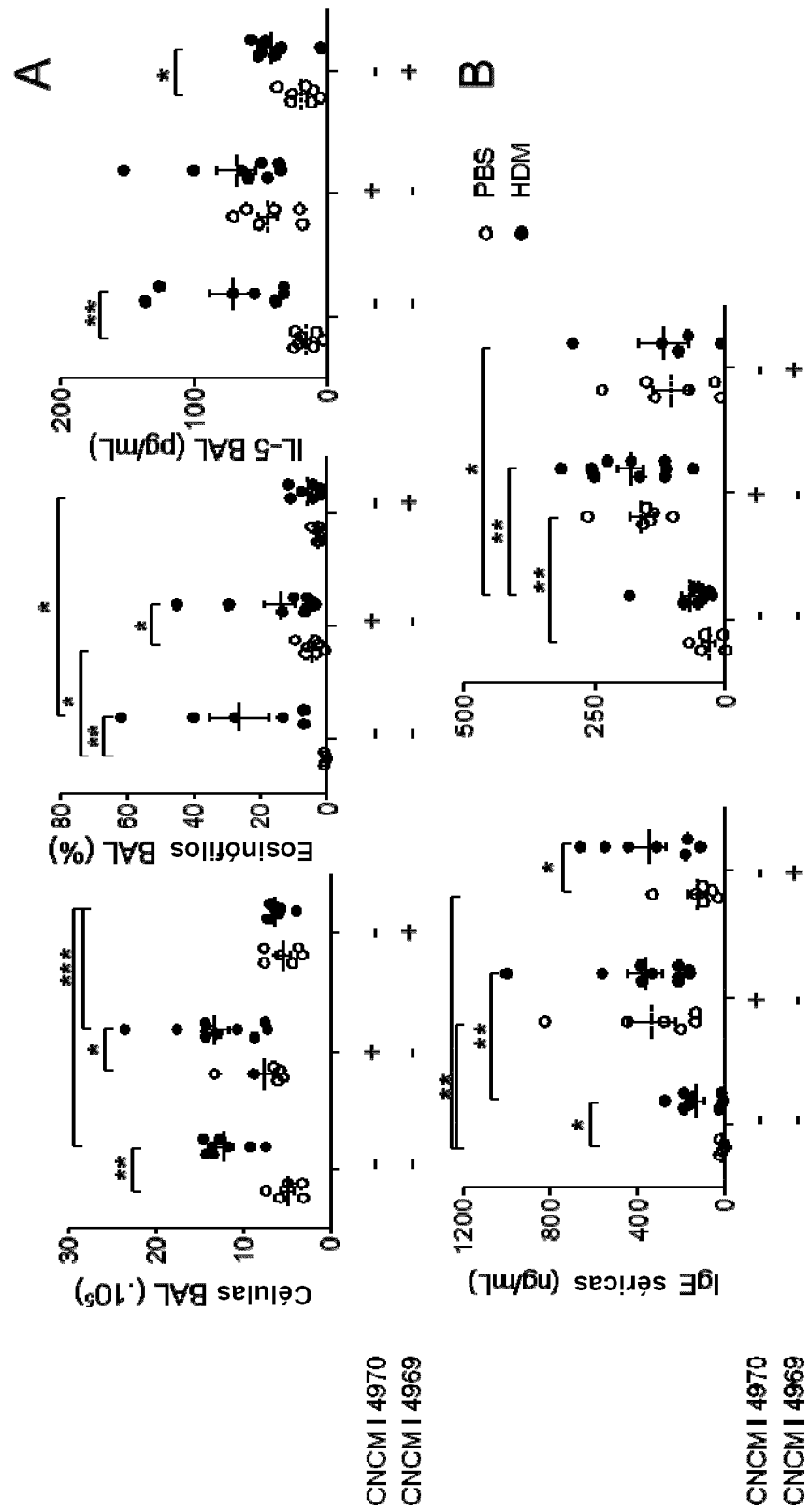


Figura 5 (continuación)

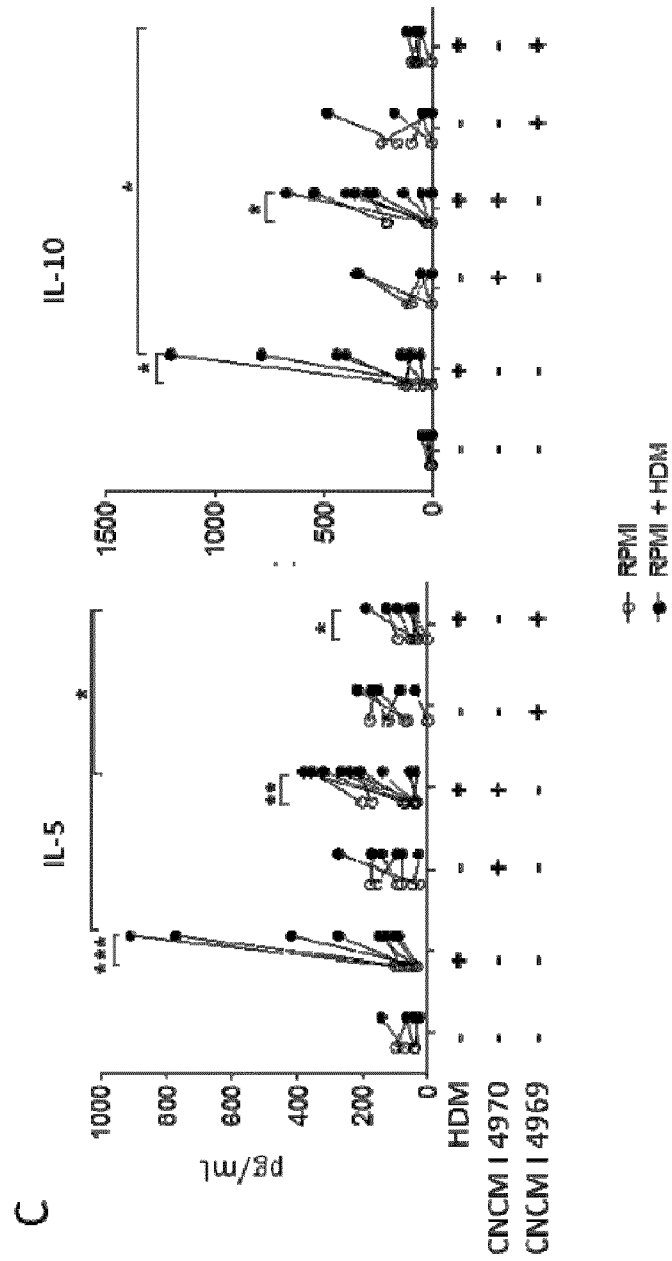


Figura 6

A

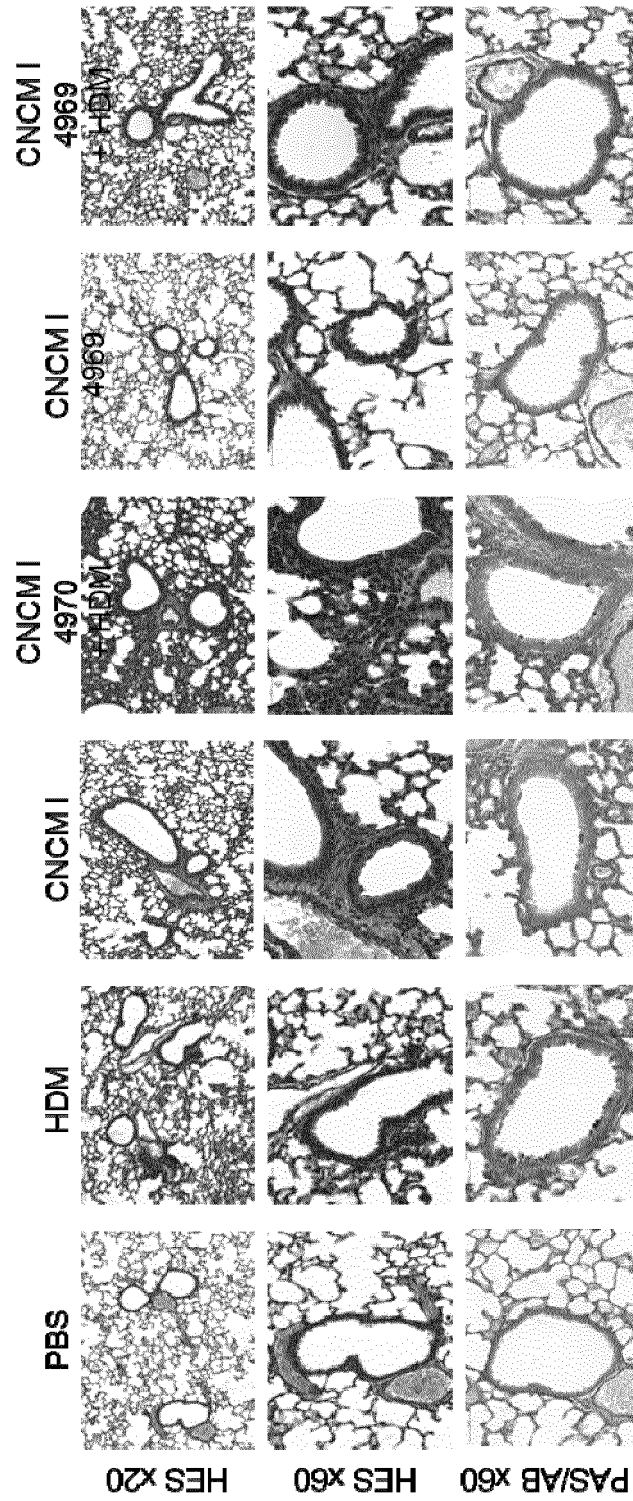


Figura 6 (continuación)

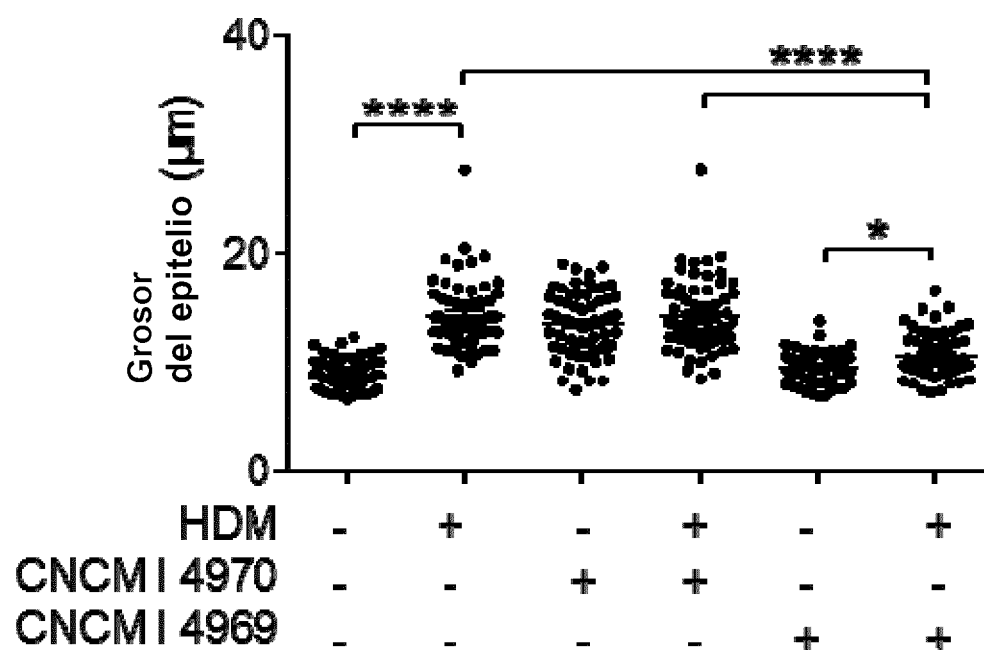
B

Figura 7

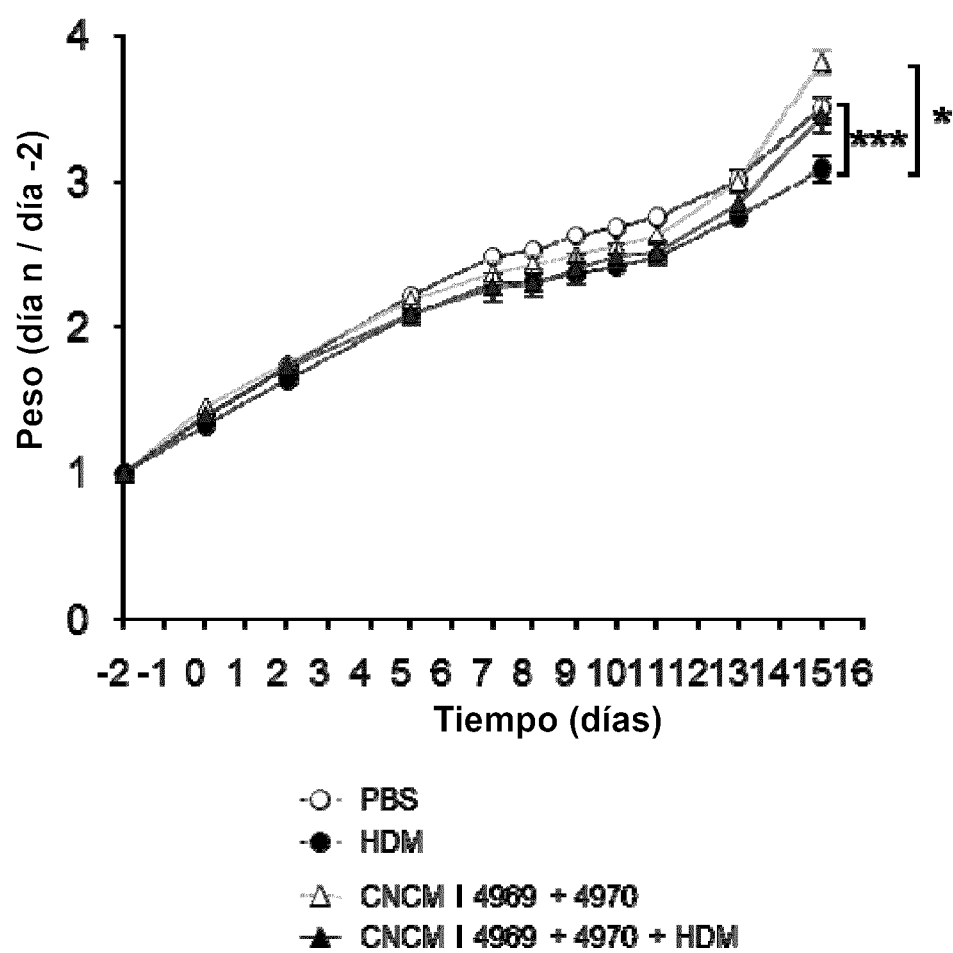
A

Figura 7 (continuación)

B

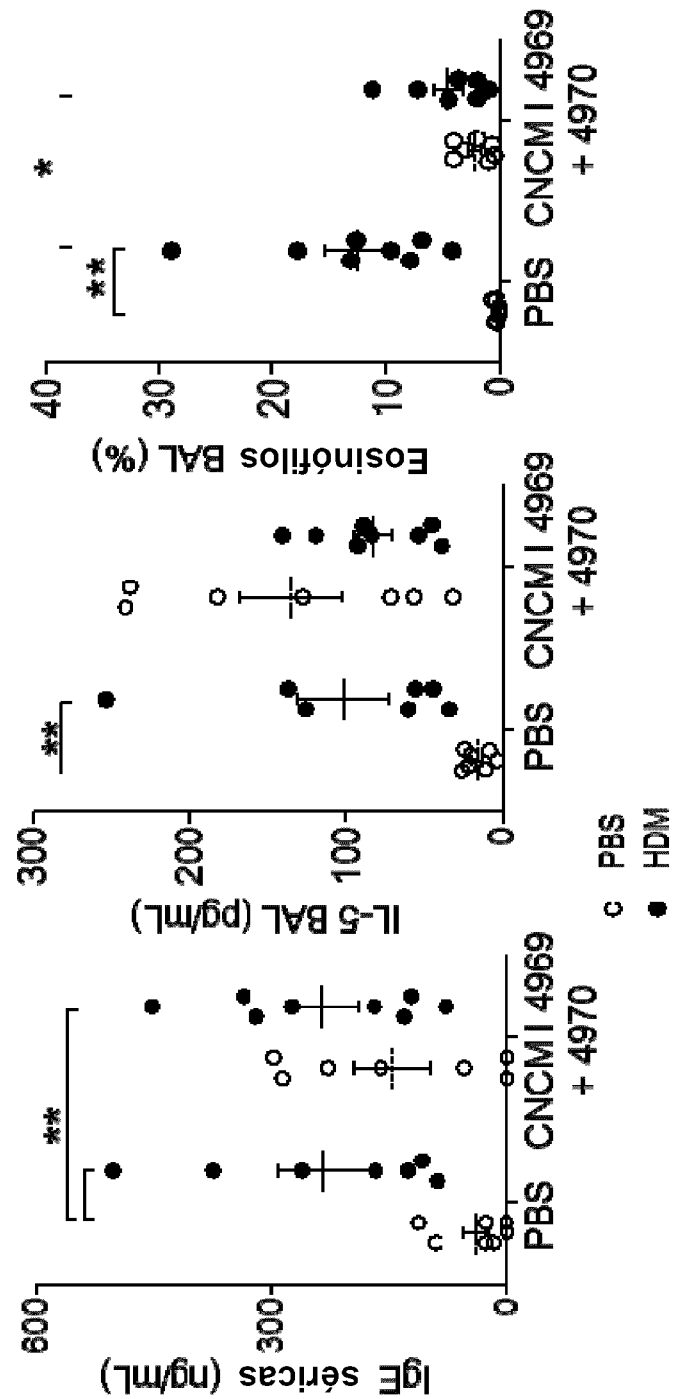
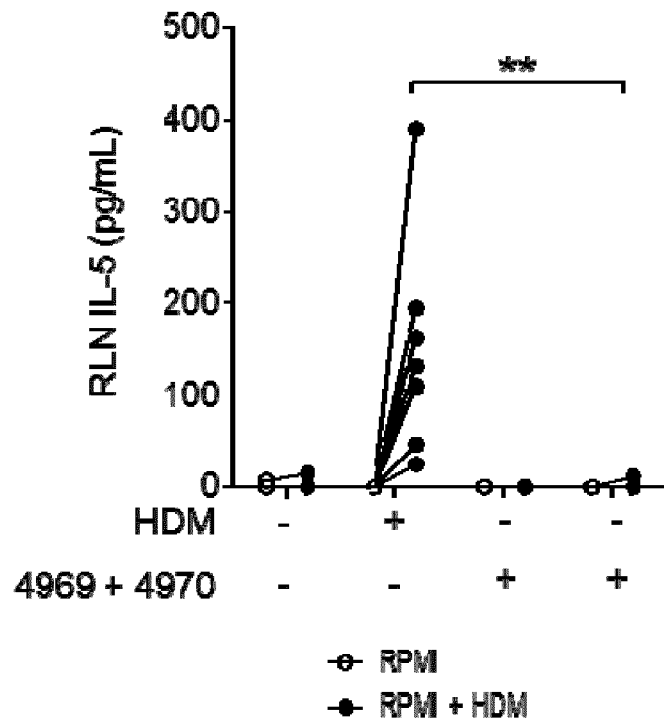


Figura 7 (continuación)

C



D

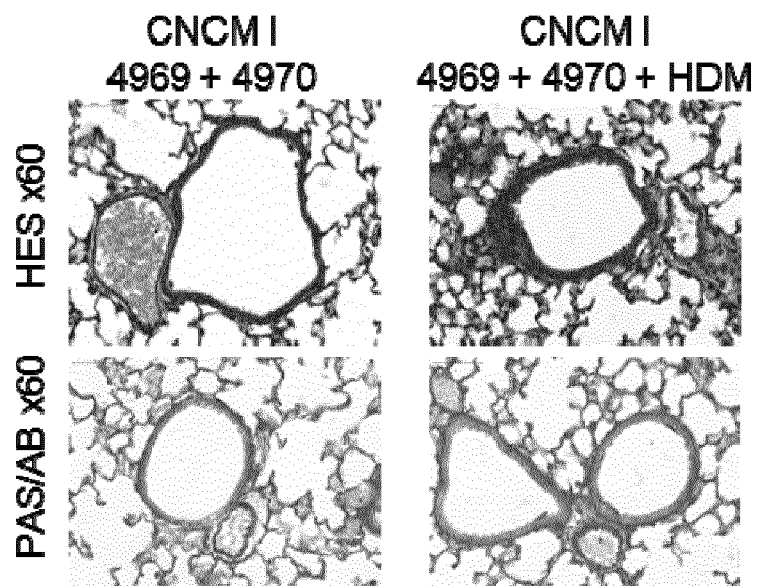


Figura 8

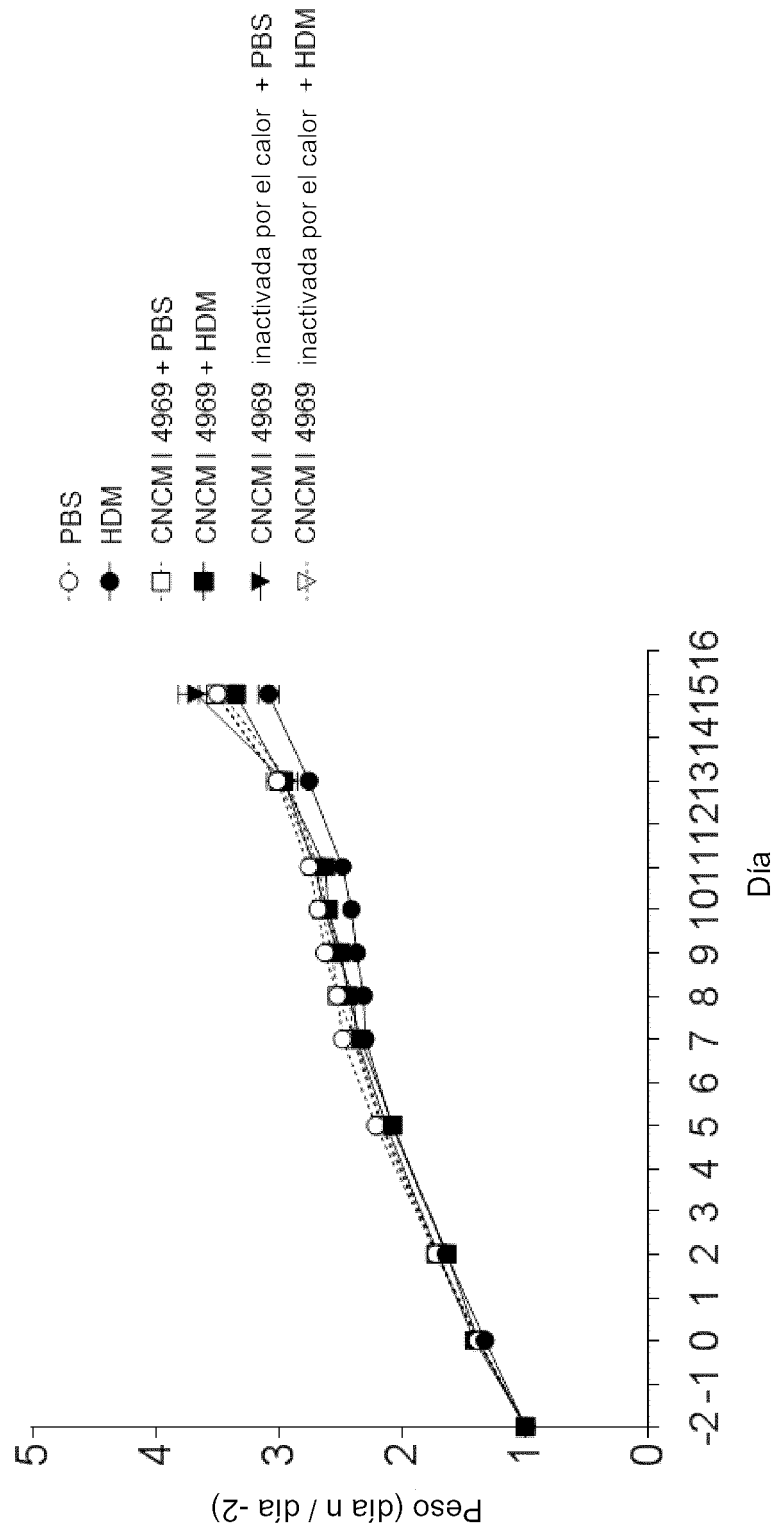


Figura 9

