

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 503 516**

21 Número de solicitud: 201330474

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

03.04.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

06.10.2014

71 Solicitantes:

**INMUNOTEK, S.L. (100.0%)
Punto Mobi, 5
28805 Alcalá de Henares (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**SUBIZA GARRIDO-LESTACHE, José Luis;
CAÑADA VICINAY, Javier;
SORIA CASTRO, Irene;
FERNÁNDEZ-CALDAS RODRÍGUEZ, Enrique;
MANZANO PÉREZ, Ana;
CASES ORTEGA, Bárbara;
JIMÉNEZ BARBERO, Jesús y
CASANOVAS VERGÉS, Miguel**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **COMPLEJO INMUNOGÉNICO PARA VACUNACIÓN Y MÉTODO DE OBTENCIÓN**

57 Resumen:

Complejo inmunogénico para vacunación y método de obtención.

La presente invención se relaciona con un complejo inmunogénico que comprende un antígeno polimerizado, manano y un dialdehído, la composición que lo comprende, y el uso del mismo como estimulador de la respuesta inmune y vacuna, útil en el tratamiento de enfermedades infecciosas, neoplasias y alergias. Asimismo, la invención se relaciona con el método de obtención de dicho complejo inmunogénico, basado en la polimerización y conjugación simultánea del antígeno y el manano mediante el empleo de un dialdehído.

ES 2 503 516 A2

Complejo inmunogénico para vacunación y método de obtención**DESCRIPCIÓN**

La presente invención se relaciona con un complejo inmunogénico que comprende un
5 antígeno polimerizado, manano y un dialdehído, la composición que lo comprende, y el
uso del mismo como estimulador de la respuesta inmune y vacuna. Asimismo, la
invención se relaciona con el método de obtención de dicho complejo inmunogénico,
basado en la polimerización y conjugación simultánea del antígeno y el manano mediante
10 el empleo de un dialdehído. Por lo tanto, la invención se encuadra dentro del campo de la
inmunología y de la producción de vacunas, así como en el tratamiento y prevención de
las alergias.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Las células dendríticas (DC) son células presentadoras de antígeno especializadas para
15 estimular eficazmente a los linfocitos T, y por ello son fundamentales en la inducción de
una respuesta inmune específica. Las DC inmaduras están distribuidas de forma
estratégica en tejidos y órganos donde actúan como centinelas, tomando continuamente
muestras de antígenos en su micro-entorno. Las DC inician un proceso de maduración en
respuesta a diferentes estímulos, en los que se incluyen los propios antígenos, productos
20 de microorganismos y señales de alarma tisulares, que desemboca en la migración hacia
las áreas T de los órganos linfáticos secundarios, portando los antígenos cargados por
ellas en la periferia. Aquí, las DC maduras, que tienen un aumento en la expresión de
moléculas HLA-II y moléculas coestimuladoras, interactúan con las células T,
presentándolas los péptidos antigénicos tras su procesamiento, y estimulándolas para
25 iniciar la respuesta específica.

Las DC inmaduras capturan los antígenos por endocitosis mediada por receptor,
micropinocitosis y fagocitosis. Existen diferentes receptores implicados en la captura
endocítica, entre los que se encuentran los receptores para manosa (MR) (CD206 y
30 CD209). A través de dominios de reconocimiento de carbohidratos reconocen residuos
terminales de manosa, fucosa y/o N-acetilglucosamina. Los ligandos naturales incluyen
productos de origen bacteriano (glicoproteínas y glicolípidos), así como glicoproteínas de
mamíferos con alto contenido en manosa. Los MR se expresan en macrófagos y DC

inmaduras, interviniendo en la endocitosis de antígenos manosilados para su procesamiento y presentación a los linfocitos T.

La inmunoterapia en las enfermedades alérgicas mediadas por anticuerpos IgE se basa
5 en la administración de vacunas terapéuticas cuyos antígenos son los mismos alérgenos
frente a los que el paciente alérgico está sensibilizado. Los alérgenos son proteínas
procedentes de pólenes, ácaros del polvo, epitelios, etc, que son las superestructuras
transportadas por el aire que respira el enfermo (inhalantes ambientales). Es
ampliamente aceptado que la eficacia clínica de estas vacunas se asocia a la dosis de
10 alérgeno administrada, por lo que la OMS y las guías consenso de las sociedades
científicas recomiendan que las vacunas se preparen con una concentración suficiente de
alérgenos. Esta necesidad hace que la respuesta del paciente alérgico a la dosis de
vacuna suponga riesgo de efectos adversos que se tratan de limitar. Una vía para ello es
la preparación de vacunas a base de alérgenos modificados (alergoides) con menor
15 capacidad de reacción con los anticuerpos IgE (menor alergenidad).

Las modificaciones químicas basadas en el tratamiento de los alérgenos con
formaldehído y/o glutaraldehído son las más usadas por los fabricantes de vacunas. La
reacción de grupos aldehídos (R-CHO) con los grupos aminos (R-NH₂) presentes en los
20 aminoácidos de los alérgenos, por ejemplo, lisinas, es la base de la modificación. Al
contrario del formaldehído que es un mono-aldehído, el glutaraldehído es un di-aldehído
con dos grupos R-CHO, capaz de reaccionar con R-NH₂ de lisinas presentes en
moléculas distintas. Esto produce una polimerización de los alérgenos y una pérdida de
reactividad con los anticuerpos IgE específicos (el alergoide que se forma a través del
25 formaldehído se basa en la modificación estructural de la proteína, no por su
polimerización). Se considera que esta polimerización es la que determina la menor
alergenidad del alergoide, al perder los anticuerpos IgE su accesibilidad para reaccionar
con sus epitopos (sitios de unión al alérgeno) y reducir el número de mastocitos
sensibilizados con IgE que pueden ser activados por ellos. La pérdida de alergenidad
30 de los alérgenos polimerizados puede conllevar una pérdida de inmunogenicidad, lo que
reduciría la eficacia clínica de estos preparados. Se ha sugerido que la polimerización
reduce el acceso de los MR en las DC a los residuos de manosa de los alérgenos y que
ello es determinante para la pérdida de inmunogenicidad de los alérgenos polimerizados.
Esto es apoyado por el hecho de que los residuos de manosa son uno de los principales

ligandos utilizados por las DC para la captación de alérgenos, y que estas células juegan un papel crítico en la presentación de alérgenos a los linfocitos T respondedores.

Los métodos de conjugación de azúcares con proteínas se basan principalmente en la
5 activación del azúcar por un proceso de oxidación, a través de la generación de grupos
aldehídos reactivos (R-CHO) por conversión de los grupos cis-glicol. Los R-CHO
generados en el azúcar oxidado, tras tratamiento con meta-peryodato por ejemplo,
pueden reaccionar con los grupos ϵ -aminos de lisinas dando lugar a la formación de
bases de Schiff. Esta metodología resulta muy apropiada para conjugar glicoproteínas (p.
10 ej., enzimas, anticuerpos), ya que se aprovecha su residuo carbohidrato para la
conjugación y evita la porción proteica asociada a su actividad biológica.

Aunque la oxidación del azúcar con peryodato se ha descrito también para manosilar
proteínas (Masarova *et al.* 2002. Int. J. Polymer. Anal. Charact., 7: 106–116), incluyendo
15 alérgenos (Weinberger *et al.* 2013. J Control Release, 165: 101-109), su uso para
manosilar antígenos polimerizados tiene dos importantes inconvenientes:

a) La oxidación de los azúcares produce la rotura de los enlaces entre los átomos de
carbono adyacentes que contienen los grupos hidroxilos (OH), y que son la base
para la generación de aldehídos reactivos. Dicha rotura afecta a la estructura de la
20 manosa (Shibuya, N., *et al.* 1988. J. Biol. Chem., 263: 728-734), alterándose su
capacidad de unión con lectinas que reconocen manosa (Masarova *et al.* 2001,
Chem. Pap. 55: 130-135) y de activación de DC (Sheng *et al.* 2006. Immunology,
118:372–383). Aunque se puede minimizar la pérdida de la integridad estructural
de la manosa disminuyendo el grado de oxidación (Masarova *et al.* 2001, Chem.
25 Pap. 55: 130—135), su eficacia para la conjugación en condiciones más suaves
queda supeditada a la naturaleza de la proteína a manosilar (Weinberger *et al.*
2013, J. Control Release, 165: 101-109). Para preservar la manosa en su forma
nativa se ha intentado la manosilación de proteínas mediante reacciones de
glicosilación a alta temperatura pero con resultado negativo en ausencia de
30 oxidación (Kanska *et al.* 2008. Biotechnol. Appl. Biochem. 49: 57–64).

b) La manosa activada tras su oxidación genera aldehídos reactivos que deben
interaccionar con grupos aminos libres de la proteína a manosilar. Sin embargo,
la polimerización de proteínas con glutaraldehído produce una drástica reducción

de estos grupos aminos, al haber sido ya utilizados en su reacción con el propio glutaraldehído. En estas condiciones, es previsible que la eficacia de la manosa activada para manosilar proteínas previamente tratadas con glutaraldehído sea muy baja, de la misma forma que lo es la capacidad del glutaraldehído para
5 polimerizar en defecto de grupos aminos a los que unirse (Silva *et al.* 2004. Food Technol. Biotechnol. 42: 51–56). Este inconveniente no solo afecta a la manosilación de alérgenos polimerizados, sino a la de cualquier proteína polimerizada con glutaraldehído que eventualmente se quiera manosilar.

10 Patterson *et al.* 1977 (J Allergy Clinical Immunology 59: 314-319) describen la polimerización de alérgenos (polen de gramíneas) con glutaraldehído. Los alérgenos polimerizados resultan hipoalergénicos ya que tienen reducida su capacidad de activación de los mastocitos sensibilizados con anticuerpos IgE.

15 Subiza *et al.* 2008 (Clinical and Experimental Allergy, 39: 987-994) describen el uso de alérgenos (polen de gramíneas, *Trisetum paniceum* y *Dactylis glomerata*) modificados con glutaraldehído (también llamados alergoides) para inmunoterapia en alergia. Los investigadores indican que la vacunación con alergoides de polen de gramíneas obtenidos por polimerización con glutaraldehído es eficaz.

20

Heydenreich *et al.* 2012 (Immunology, 136: 208-217) describen un estudio comparativo de las diferencias en inmunogenicidad y alergenicidad entre extractos alérgenos de polen intactos de las especies *Phleum pratense* y *Betula verrucosa* y sus correspondientes alergoides modificados con glutaraldehído o formaldehído. Se indica que la modificación
25 con glutaraldehído disminuye más la alergenicidad y la inmunogenicidad de los alergoides que la modificación con formaldehído, y que las DC no captan de forma eficaz este tipo de alérgenos modificados.

Weinberger *et al.* 2013 (Journal of Control Release, 165: 101-109) describen la
30 conjugación de proteínas alergénicas (ovoalbúmina y papaína) con manosa activando el azúcar mediante una oxidación suave con peryodato. Obtienen un diferente grado de eficacia dependiendo de la proteína a manosilar. Se describe que los conjugados manosilados son captados por las DC *in vivo* y producen una respuesta inmune en ratones, por lo que podrían ser útiles para inmunoterapia.

Por lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar un método de obtener vacunas basadas en antígenos polimerizados y manosilados alternativo a los que actualmente se emplean en el estado de la técnica, que permita la polimerización del antígeno al mismo tiempo que su conjugación con manosa con alta eficacia, sin que el azúcar pierda su integridad estructural y sin que las propiedades del polímero (menor alergenidad) se vean afectadas, con objeto de que la vacuna, a base de proteínas polimerizadas y manosiladas, aumente su inmunogenicidad al mejorar su captación por las DC.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han descubierto que la adición de un dialdehído a una mezcla de un antígeno de naturaleza proteica y manano, permite la polimerización del antígeno simultáneamente a la conjugación del antígeno al manano, lo que posibilita la obtención de un complejo inmunogénico o vacuna capaz de estimular y/o inducir una respuesta inmune en el individuo sin desencadenar una respuesta alérgica a dicho complejo, y que es capaz de ser reconocida y captada por las células dendríticas (DC).

En base a este descubrimiento, se han desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán descritos en detalle a continuación.

Complejo inmunológico de la invención

Tal como se ha mencionado previamente, la adición de un dialdehído, en particular, glutaraldehído, a una mezcla de proteína (antígeno) y manano, permite la polimerización del antígeno simultáneamente a la conjugación del antígeno al manano, lo que posibilita la obtención de un complejo inmunogénico o vacuna.

Así, en un aspecto, la presente invención se relaciona con un complejo inmunogénico, de aquí en adelante, “complejo inmunogénico de la invención”, que comprende un antígeno polimerizado, manano y un dialdehído.

En la presente invención, se entiende por “complejo inmunogénico” a la agrupación de dos o más unidades que permanecen conjugadas entre sí mediante enlace químico

(conjugación química), o mediante atrapamiento físico (conjugación física), siendo dichas unidades un antígeno polimerizado, manano y un dialdehído.

Se entiende por “antígeno polimerizado” al polímero formado por monómeros de antígeno
 5 unidos entre sí, los cuales pueden ser distintos o iguales. Por lo tanto, en una realización particular, el antígeno polimerizado comprende al menos dos antígenos iguales o distintos entre sí. Se entiende por “antígeno” a cualquier sustancia que es capaz de inducir una respuesta inmune, tanto humoral como celular, en el organismo de un sujeto (un hombre o un animal), o que puede inducir una respuesta inmune celular (expansión,
 10 activación y/o maduración de células inmunes, producción de citoquinas, o anticuerpos) cuando entra en contacto con células inmunitarias. En particular, un antígeno es una proteína que puede ser un alérgeno, una proteína derivada de un agente infeccioso, o célula neoplásica, un péptido o fragmento de dichas proteínas,, una proteína recombinante de dichas proteínas o incluso un péptido sintético capaz de inducir las
 15 respuestas señaladas. En una realización particular, el antígeno es un alérgeno.

Se entiende por “alérgeno” a aquella sustancia que es capaz de provocar alergia en un individuo, es decir, aquella sustancia que es reconocida como extraña por el sistema inmune de un individuo, provocando una reacción inmunitaria, principalmente, la
 20 producción de inmunoglobulinas de tipo E (IgE). Ejemplos de alérgenos incluyen, sin limitarse a, extractos alergénicos de pólenes, extractos alergénicos de artrópodos, extractos alergénicos de alimentos o productos alimenticios, componentes presentes en saliva, pinzas o aguijones de insectos que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto, componentes presentes en plantas que inducen una reacción de sensibilidad en
 25 un sujeto, etc. Así, por ejemplo, pueden utilizarse extractos proteicos de pólenes, tal como el polen de gramíneas (*Lolium perenne*, *Poa pratense*, *Phleum pratense*, *Cynodon dactylon*, *Festuca pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*, *Avena sativa*, *Triticum sativa*), de otras hierbas (tales como *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, *Plantago lanceolata*, *Taraxacum vulgare*, *Parietaria judaica*, *Salsola kali*, *Urtica dioica*), o de árboles (tales como *Olea europaea*, *Platanus* spp, *Cupressus* spp), etc.
 30 Pueden utilizarse también extractos proteicos de artrópodos, tal como de ácaros del polvo (tales como *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Acaro siro*, *Blomia tropicalis*, *Euroglyphus maynei*, *Glyciphagus domesticus*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*), etc. Otros extractos alergénicos pueden obtenerse

de esporas de hongos (*Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum*) y epitelios animales (epitelio de perro, epitelio de gato, epitelio de caballo, mezcla de plumas) así como de componentes alimentarios, etc. Como entiende el experto en la materia, dentro del término “epitelio” se incluye la piel y los anexos cutáneos como el pelo. Prácticamente cualquier alérgeno puede ser utilizado en el complejo inmunogénico de la invención; no obstante, en una realización particular, el alérgeno se selecciona del grupo que consiste en pólenes, ácaros, epitelios, esporas de hongos y combinaciones de ellos.

10 En otra realización particular, el polen procede de la especie *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata*, *Cynodon dactylon*, *Lolium perenne*, *Trisetum* spp., *Olea europaea*, *Cuppressus* spp., *Ambrosia* spp., *Betula* spp., *Platanus* spp., *Corylus avellana* o *Alnus glutinosa*.

En otra realización particular, el ácaro pertenece a la especie *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* o *Blomia tropicalis*.

En otra realización particular, el epitelio pertenece a la especie *Felis domesticus* o *Canis familiaris*.

20 En otra realización particular, la espora del hongo pertenece a la especie *Alternaria alternata* o *Alternaria tenuis*.

En la presente invención se entiende por “manano” a un polímero de carbohidrato compuesto por manosa y enlaces glucosídicos de los siguientes tipos: alfa-1,6-glucósido, alfa-1,2-glucósido, alfa-1,3-glucósido o beta-1,3-glucósido. Se entiende por manosa al azúcar simple o monosacárido formado por 6 átomos de carbono y cuyo grupo químico funcional es un aldehído en el carbono 1 o carbono anomérico. El manano puede contener un residuo peptídico de la manoproteína a la que va unida de forma natural. Cualquier manano puede emplearse en el contexto de la presente invención. Ejemplos de mananos incluyen, sin limitar a, polimánosa, galactománano, glucománano, acemánano y aloérído.

Se entiende por polimánosa, una estructura lineal formada por manosas unidas por enlaces α -D-(1 $\rightarrow$ 6), con frecuentes ramificaciones cortas de varias unidades, a través de enlaces α -D-(1 $\rightarrow$ 2) principalmente, pero también α -D-(1 $\rightarrow$ 3).

- 5 Se entiende por “galactomanano”, al compuesto formado por una cadena de manosas unidas entre sí por enlaces β (1 $\rightarrow$ 4) en la mayoría de los casos con ramificaciones formadas por unidades de galactosa unidas a las manosas por un enlace α (1 $\rightarrow$ 6). Dependiendo del vegetal del que se extraigan, los galactomananos tienen distinto grado de ramificación.

10

Se entiende por “glucomanano”, al compuesto cuya estructura química incluye D-manosa y D-glucosa en una proporción 8:5, respectivamente, unidas por enlace β (1 $\rightarrow$ 4). Se encuentra, por ejemplo, en los tubérculos de la planta *Amorphophallus konjac*.

- Se entiende por “acemanano” a la mezcla de polisacáridos complejos de tipo beta(1-4)-
15 manano O-acetilados. El acemanano se encuentra, por ejemplo, en la planta *Aloe vera*.

Se entiende por “aloérido” a aquel polisacárido de elevado peso molecular constituido por glucosa, galactosa, manosa y arabinosa. El aloérido se encuentra, por ejemplo, en la planta *Aloe vera*.

20

Los mananos (polimanasas, galactomananos, glucomananos, etc.) pueden obtenerse de fuentes naturales, por ejemplo, de hongos, levaduras y plantas, o por síntesis química mediante técnicas ampliamente conocidas por el experto en la materia. En una realización particular, el manano que forman parte del complejo inmunogénico de la
25 invención procede, de una levadura, de un vegetal o de un hongo. En otra realización particular, la levadura se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces* ssp., *Pichia* ssp., y *Candida* ssp.

- Ejemplos de levaduras *Saccharomyces* ssp. incluyen, sin limitar a, *S. bayanus*, *S.*
30 *boulardii*, *S. bulderi*, *S. cariocanus*, *S. cariocus*, *S. cerevisiae*, *S. chevalieri*, *S. dairenensis*, *S. ellipsoideus*, *S. eubayanus*, *S. exiguus*, *S. florentinus*, *S. kluyveri*, *S. martiniae*, *S. monacensis*, *S. norbensis*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*, *S. spencerorum*, *S. turicensis*, *S. unisporus*, *S. uvarum* y *S. zonatus*. En una realización más particular, la levadura es *S. cerevisiae*.

Ejemplos de levaduras de *Pichia* ssp. incluyen, sin limita a, *P. pastoris*, *P. anomola*, *P. heedii*, *P. guilliermondii*, *P. kluyveri*, *P. membranifaciens*, *P. norvegensis*, *P. ohmeri*, *P. pastoris* y *P. subpelliculosa*.

5

Ejemplos de levaduras de *Candida* ssp. incluyen, sin limitar a, *C. albicans*, *C. ascalaphidarum*, *C. amphixiae*, *C. Antarctica*, *C. argêntea*, *C. atlântica*, *C. atmosphaerica*, *C. blattae*, *C. carpophila*, *C. cerambycidarum*, *C. chauliodes*, *C. corydali*, *C. dosseyi*, *C. dubliniensis*, *C. ergatensis*, *C. fructus*, *C. glabrata*, *C. fermentati*, *C. guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. insectamens*, *C. insectorum*, *C. intermédia*, *C. jeffresii*, *C. kefir*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. lyxosophila*, *C. maltosa*, *C. marina*, *C. membranifaciens*, *C. milleri*, *C. oleophila*, *C. oregonensis*, *C. parapsilosis*, *C. quercitrusa*, *C. rugosa*, *C. sake*, *C. shehatea*, *C. temnochilae*, *C. tenuis*, *C. tropicalis*, *C. tsuchiyae*, *C. sinolaborantium*, *C. sojiae*, *C. subhashii*, *C. viswanathii*, *C. utilis*.

10

15

Ejemplos de vegetales de los que se puede extraer manano incluyen, sin limitar a, leguminosas (por ejemplo, *Ceratonia siliqua*, *Cyanaposis tetragonolobus*, etc.), tubérculos (por ejemplo, *Amorphophallus konjac*, etc.), semillas de plantas de la familia *Liliaceae*, *Iridaceae*, en el que el manano es empleado como reserva de energía y las paredes vegetales de las algas verdes, tales como *Acetabularia*, *Codium*, *Halicoryne*, etc., y las algas rojas (*Porphyra umbilicalis*).

20

Ejemplos de hongos de los que se puede extraer manano incluyen, sin limitar a, *Paecilomyces* ssp. y *Ganoderma lucidum* (reishi).

25

Como entiende el experto en la materia, si el manano se obtiene de un hongo o una levadura, éste se va a encontrar formando parte de la pared celular de los hongos y levaduras, por lo que puede contener restos de la proteína empleada por el organismo para sintetizar la pared celular. Así, el manano puede comprender en su estructura grupos aminos procedentes de los restos de aminoácidos presentes. Por lo tanto, en otra realización todavía más particular, el manano comprende grupos amino que, en otra realización más particular, dichos grupos amino proceden del aminoácido lisina.

30

En la presente invención se entiende por “dialdehído” al compuesto que comprende dos grupos aldehído. Ejemplos de dialdehídos incluyen, sin limitar a, glutaraldehído, glioxal, malonaldehído, succinaldehído y adipaldehído. Así, en una realización particular, el dialdehído se selecciona del grupo que consiste en glutaraldehído, glioxal, malonaldehído, succinaldehído y adipaldehído. En una realización más preferida, el dialdehído es glutaraldehído.

Como se ha indicado previamente, el complejo inmunogénico de la invención comprende un antígeno polimerizado, manano y un dialdehído. Así, la unión de los componentes del complejo inmunogénico de la invención puede producirse mediante conjugación química, conjugación física o ambas al mismo tiempo.

En la presente invención, se entiende por “conjugación química” a la unión de los componentes del complejo inmunogénico de la invención mediante un enlace químico. Como se ha explicado previamente, el manano puede comprender grupos amino debido a la presencia de aminoácidos en su estructura, por ejemplo lisinas. Sin querer estar vinculado a ninguna teoría, se piensa que la unión entre los componentes del complejo inmunogénico de la invención puede producirse a través del enlace entre los grupos amino presentes en el manano y el dialdehído presente en la reacción. Así, en una realización particular, el antígeno polimerizado está unido a manano a través del dialdehído. El dialdehído en medio acuoso está presente en una cierta proporción en forma polimérica existiendo por tanto diversas especies con 2 o más grupos funcionales aldehído cuya reacción con los grupos amino presentes en el manano y en la proteína antigénica conducen al entrecruzamiento covalente entre los diversos componentes presentes en la mezcla de reacción. La reacción primaria entre los grupos aldehído y amino conduce a la formación de las denominadas bases de Schiff que, dependiendo de las condiciones de pH, pueden ser reversible. Sin embargo en el caso que los grupos aldehído pertenezcan a compuestos dialdehídicos o polialdehídicos como por ejemplo el glutaraldehído, y sus formas poliméricas presentes en solución acuosa, se producen otras reacciones de tipo condensación aldólica y deshidratación que generan sistemas carbonílicos alfa-beta insaturados de carácter polimérico multifuncional. Adicionalmente se ha mostrado que las bases de Schiff son también susceptibles de producir condensaciones tipo aldólica con los aldehídos presentes en el medio de reacción para generar iminas alfa-beta insaturadas más estables que las bases de Schiff originales. Por

otro lado, tanto los carbonilos como las iminas alfa-beta insaturadas derivadas de las condensaciones aldólicas son susceptibles de sufrir una reacción de adición conjugada por parte de los grupos amino para formar nuevos enlaces covalentes estables. La reactividad química descrita junto con el carácter multifuncional del dialdehído original y sus formas poliméricas presentes en el medio de reacción es la base del entrecruzamiento químico covalente y estable entre el manano y los antígenos para formar los conjugados químicos poliméricos finales.

En la presente invención se entiende por “conjugación física” a la unión de los componentes del complejo inmunogénico de la invención mediante atrapamiento físico. Sin querer estar vinculados a ninguna teoría, se piensa que cuando el antígeno se está polimerizando, el manano, queda atrapado en el entramado del polímero favorecido por la rigidez y el alto grado de ramificación de su estructura. Así, en una realización particular, el alérgeno está unido al manano mediante atrapamiento físico por el polímero.

Una vez que el complejo inmunogénico está formado, la proporción de los componentes puede variar dependiendo de la concentración en el medio de manano. Así, en una realización particular, la proporción antígeno:manano es de entre 1:10 a 1:0,1, preferiblemente, de entre 1:4 y 1:0,15, más preferiblemente, de entre 1:3 y 1:0,3, más preferiblemente, de entre 1:4 y 1:0,5. En una realización particular, la proporción antígeno:manano es 1:0,3 o 1:0,5.

Método de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto que la adición de un dialdehído a una mezcla de antígeno y manano, permite la polimerización del antígeno simultáneamente a la conjugación del antígeno al manano, lo que posibilita la obtención de un complejo inmunogénico o vacuna capaz de estimular y/o inducir una respuesta inmune en el individuo sin desencadenar una respuesta alérgica a dicho complejo, y que es capaz de ser reconocida y captada por las células dendríticas (DC).

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método para obtener el complejo inmunogénico de la invención, de aquí en adelante, “método de la

invención”, que comprende (i) preparar una disolución que comprende un antígeno y manano, y (ii) añadir un dialdehído a dicha disolución.

En una primera etapa [etapa (i)], el método de la invención comprende preparar una
5 disolución que comprende un antígeno y manano.

El término antígeno ha sido definido previamente. En una realización particular, el antígeno es un alérgeno. Ejemplos de alérgenos incluyen, sin limitar a, extractos alérgenos de pólenes, extractos alérgenos de artrópodos, extractos alérgenos de
10 alimentos o productos alimenticios, componentes presentes en saliva, pinzas o aguijones de insectos que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto, componentes presentes en plantas que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto, etc. En una realización particular, el alérgeno se selecciona del grupo que consiste en pólenes, preferiblemente, *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata*, *Cynodon dactylon*, *Lolium*
15 *perenne*, *Trisetum spp.*, *Olea europaea*, *Cupressus spp.*, *Ambrosia spp.*, *Betula spp.*, *Platanus spp.*, *Corylus avellana* o *Alnus glutinosa*; ácaros, preferiblemente, el ácaro pertenece a la especie *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* o *Blomia tropicalis*; epitelios, preferiblemente, el epitelio pertenece a la especie *Felis domesticus* o *Canis familiaris*; esporas de hongos, preferiblemente, la espora del hongo
20 pertenece a la especie *Alternaria alternata* o *Alternaria tenuis*; y combinaciones de ellos.

Como entiende el experto en la materia, la disolución de la etapa (i) puede contener más de un antígeno los cuáles, pueden ser iguales o distintos entre sí. Por lo tanto, en una realización particular, la disolución comprende al menos dos antígenos iguales o distintos
25 entre sí.

Las técnicas y metodologías empleadas para obtener antígenos y extractos alérgenos son ampliamente conocidas por el experto en la materia, aunque también pueden encontrarse disponibles comercialmente o en forma de proteínas recombinantes. En caso
30 de que el antígeno o el extracto alérgeno esté liofilizado, éste tendrá que ser reconstituido, por ejemplo, con tampón fosfato, para poder ser empleado en el método de la invención.

- Por otro lado, la disolución de la etapa (i) también comprende manano. El término manano ha sido definido previamente y es aplicable al presente aspecto inventivo. Ejemplos de mananos incluyen, sin limitar a, polimánosa, galactománano y glucománano. En una realización particular del método de la invención, el manano empleado en el
- 5 método de la invención procede de una levadura, de un vegetal o de un hongo. En otra realización más particular, la levadura se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces* ssp., en particular, *S. cerevisiae*; *Pichia* ssp., y *Candida* ssp. Ejemplos de levaduras, hongos y vegetales de los que puede obtenerse manano han sido descritos previamente en la presente descripción. Asimismo, tal como se ha explicado
- 10 anteriormente, el manano puede comprender en su estructura grupos amino procedentes de los restos de aminoácidos presentes en la manoproteína. Por lo tanto, en otra realización todavía más particular, el manano comprende grupos amino que, en otra realización más particular, dichos grupos amino proceden del aminoácido lisina.
- 15 La cantidad de manano a añadir a la disolución puede variar en función de la proporción antígeno:manano que se quiera obtener en el complejo inmunogénico de la invención. Así, en una realización particular, la proporción antígeno:manano es de entre 1:10 a 1:0,1, preferiblemente, de entre 1:4 y 1:0,15, más preferiblemente, de entre 1:3 y 1:0,3, más preferiblemente, de entre 1:4 y 1:0,5. En una realización particular, la proporción
- 20 antígeno:manano es 1:0,3 o 1:0,5.

- Una vez preparada la disolución de antígeno y manano, se procede a añadir el dialdehído que actuará como agente polimerizante [etapa (ii) del método de la invención]. El dialdehído se añadirá gradualmente a la disolución hasta alcanzar la concentración
- 25 suficiente para conseguir la polimerización del antígeno al mismo tiempo que la conjugación del manano con el antígeno. La técnica y metodología empleadas para preparar polimerizados mediante el empleo de dialdehídos es ampliamente conocida en el estado de la técnica y es práctica de rutina para el experto en la materia (Silva et al. 2004. Chemical Modifications on Proteins Using Glutaraldehyde. Food Technol. Biotechnol. 42: 51–56).
- 30

Tras añadir el dialdehído a la disolución de antígeno y manano, se deja la mezcla en las condiciones adecuadas y el tiempo suficiente para que se produzca la reacción de polimerización, por ejemplo, alrededor de 15 horas, a 4°C en agitación.

En una realización particular, el dialdehído se selecciona del grupo que consiste en glutaraldehído, glioxal, malonaldehído, succinaldehído y adipaldehído. Preferiblemente, el dialdehído es glutaraldehído.

5

Pasado el tiempo necesario para que se produzca la reacción de polimerización, se procede a detener la reacción mediante la adición a la mezcla de un agente que neutralice (agente neutralizante) los grupos aldehídos libres, como son los agentes que contienen grupos aminos (por ejemplo, aminoácidos, ácido ϵ -amino-n-caproico, etc.), u
10 otros agentes reactivos con aldehídos (por ejemplo, metabisulfito sódico, amonio, etc.), excluyendo a los agentes oxidantes (por ejemplo, peróxido de hidrógeno, peryodato sódico, etc) por su efecto sobre la manosa. En una realización particular del método de la invención, el método comprende una etapa adicional (iii) que comprende la adición de un agente neutralizante, por ejemplo, un aminoácido, en particular, glicina, para detener
15 la reacción de polimerización. La cantidad de glicina añadida a la mezcla de reacción para detener la polimerización puede variar en función las condiciones de la reacción, pero es práctica de rutina para el experto en la materia calcular la cantidad de glicina que es necesario añadir para detener la polimerización. En general, la glicina tiene que estar en exceso con respecto a la cantidad de dialdehído añadido, por ejemplo, en una relación
20 dialdehído:glicina 1:50.

A continuación de parar la reacción de polimerización, puede procederse a aislar el complejo inmunogénico de la invención, lo que es práctica de rutina para el experto en la materia. Así, en una realización particular, el método de la invención comprende una
25 etapa (iv) de aislamiento del complejo inmunogénico. Prácticamente cualquier método de aislamiento de complejos proteicos puede emplearse en el contexto de la presente invención. Ejemplo de dichos métodos incluyen, sin limitar a, cromatografía en columna líquida de baja o alta presión, cromatografía de afinidad con lectinas de unión a manosa (por ejemplo, Concanavalina A), técnicas de precipitación (por ejemplo, sulfato amónico),
30 separación en gradientes de densidad y centrifugación diferencial. A modo de ejemplo, la mezcla que contiene el complejo inmunogénico de la invención ya formado se puede dializar con el objetivo de eliminar las sales y los posibles restos no polimerizados, tras lo cual, se lleva a cabo la filtración de la mezcla polimerizada, por ejemplo, mediante ultrafiltración tangencial con una membrana con un tamaño de poro de 100 KDa.

Usos del complejo inmunogénico de la invención

El complejo inmunogénico de la invención presenta unas características técnicas que le permiten estimular y/o inducir una respuesta inmune en el individuo con una baja
5 respuesta alérgica a dicho complejo en caso de tratarse de alérgenos. Esta propiedad hace posible el uso del complejo inmunogénico de la invención para elaborar una composición farmacéutica que, cuando es administrada a un sujeto, estimula y/o induce la respuesta inmune de dicho sujeto y por lo que puede ser empleado como vacuna en el tratamiento, por ejemplo, de alergias, de enfermedades infecciosas o neoplasias.

10

Por lo tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con el uso del complejo inmunogénico de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, de
15 aquí en adelante, “composición farmacéutica de la invención”, que comprende el complejo inmunogénico de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en el estado de la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, disoluciones
20 estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse mediante procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica. Todas las realizaciones particulares explicadas para el complejo inmunogénico de la invención son aplicables al presente aspecto inventivo. Adicionalmente, la composición farmacéutica de la invención puede comprender, además, un excipiente, un diluyente, un adyuvante (por
25 ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato cálcico, monofosforil lípido A, quitosan y otros) y/o un estabilizante (por ejemplo, glicerol), farmacéuticamente aceptables. Como entiende el experto en la materia, el complejo inmunogénico de la invención estará presente en la composición de la invención en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, en una cantidad tal que es suficiente para ejercer su efecto estimulador y/o inductor de la
30 respuesta inmune en un sujeto.

El término composición farmacéutica incluye composiciones para su uso en sanidad humana o animal (composiciones veterinarias).

En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende, además, una sustancia activa adicional. Prácticamente cualquier sustancia potencialmente útil para el tratamiento sintomático de una enfermedad o alergia puede ser incorporada como sustancia activa adicional. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dicha sustancia activa adicional incluyen agentes antihistamínicos, hormonas esteroideas, cromoglicato disódico, fluticasona, rupatadina, ebastina, loratadina, desloratadina y otros antagonistas de receptores de histamina, leucotrienos, etc., y sus mezclas.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse por cualquier vía apropiada (por ejemplo, oral, sublingual, perioral, intranasal, parenteral, transdérmica, tópica, etc.), para lo cual se utilizarán los excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma farmacéutica de administración elegida. Las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación son conocimiento general para el experto en la materia. A modo ilustrativo, no limitativo, la composición farmacéutica de la invención puede encontrarse formando parte de una formulación en macropartículas, nanopartículas o liposomas, y puede administrarse en una forma farmacéutica de administración sólida, en una forma farmacéutica de administración líquida, o en una forma farmacéutica de administración que comprende un sistema disperso. Más concretamente, la composición farmacéutica de la invención puede encontrarse en forma de soluciones inyectables, formas farmacéuticas adecuadas para su administración sublingual, polvos, gránulos, perlas, comprimidos, cápsulas, jarabes, emulsiones, supositorios, colirios, nebulizaciones, aerosoles, cremas, geles, etc. La pauta de dosificación de la composición de la invención será determinada por el médico y los factores clínicos. Como es muy conocido en medicina, las dosificaciones dependen de muchos factores que incluyen las características físicas del paciente (edad, estatura, sexo), el procedimiento de administración usado, la gravedad de la enfermedad, el compuesto particular usado y las propiedades farmacocinéticas del individuo.

En una realización particular, dicha composición farmacéutica es útil para estimular y/o inducir la respuesta inmune. En otra realización particular, dicha composición farmacéutica es útil como vacuna. En otra realización particular, dicha composición

farmacéutica es útil en el tratamiento de la alergia, de enfermedades infecciosas y neoplasias en un sujeto.

En la presente invención se entiende por “alergia” una hipersensibilidad a una partícula o sustancia (denominada “alérgeno”) que, si se inhala, ingiere o toca, produce un cuadro clínico característico y desencadena una respuesta inmunitaria, principalmente de IgE, en el sujeto. El término “alérgeno” ya ha sido descrito previamente en la presente descripción.

En la presente invención se entiende por “enfermedad infecciosa” a la manifestación clínica consecuente a una infección provocada por un microorganismo — como bacterias, hongos, virus, protozoos, etc. — o por priones. Ejemplos de enfermedades infecciosas bacterianas incluyen, sin limitar a, brucelosis (*Brucella* spp.), carbunco (*Bacillus anthracis*), cólera (*Vibrio cholerae*), difteria (*Corynebacterium diphtheriae*), erisipela (*Streptococcus* spp.), fiebre Q (*Coxiella burnetii*), fiebre tifoidea (*Salmonella typhi*, *S. paratyphi*), legionelosis (*Legionella pneumophila*), neumonía (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma* spp., *Chlamydia* spp.), tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) y tétanos (*Clostridium tetani*). Ejemplos de enfermedades infecciosas virales incluyen, sin limitar a, dengue (*Flavivirus*), fiebre amarilla (*Flavivirus*), fiebre hemorrágica de Ébola (*Filovirus*), gripe (*Influenzavirus*), hepatitis A (*Enterovirus* (VHA)), hepatitis B (*Orthohepadnavirus* (VHB)), hepatitis C (*Hepacivirus* (VHC)), herpes (*Herpesvirus*), mononucleosis (Virus de Epstein-Barr), parotiditis (*Paramixovirus*), peste porcina (*Pestivirus*), poliomielitis (*Enterovirus*), resfriado común (*Rinovirus*, *Coronavirus*, *Ecovirus*, *Coxsackievirus*), rabia (*Rhabdovirus*), rubéola (*Rubivirus*), sarampión (*Morbillivirus*), varicela (*Varicela-zoster*) y viruela (*Orthopoxvirus*). Ejemplos de infecciones fúngicas incluyen, sin limitar a, aspergilosis, candidiasis, cromomicosis, criptococosis, dermatofitosis, esporotricosis, histoplasmosis, herpes circinado, otomicosis, pitiriasis versicolor, queratomicosis y zigomicosis. Ejemplos de enfermedades infecciosas provocadas por protozoos incluyen, sin limitar a, leishmaniosis, malaria, criptosporidiosis, toxoplasmosis, amebiasis, giardiasis y enfermedad de Chagas. Ejemplos de enfermedades infecciosas provocadas por priones incluyen, sin limitar a, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, encefalopatía espongiforme bovina ("Mal de la Vaca Loca"), scrapie (o *tembleque*), insomnio familiar fatal y kuru.

En la presente invención se entiende por “neoplasia” a la enfermedad provocada por una alteración de la proliferación y, muchas veces, de la diferenciación celular, que se manifiesta por la formación de una masa o tumor que, en el caso de ser maligno, se denomina cáncer. Ejemplos de neoplasias benignas incluyen, sin limitar a, fibroma (tejido

5 conjuntivo fibroso), mixoma (tejido conjuntivo laxo), lipoma (tejido adiposo), condroma (tejido cartilaginoso), osteoma (tejido óseo), hemangioma (vasos sanguíneos), linfangioma (vasos linfáticos), meningioma (meninges), tumor glómico (tejido nervioso de sostén), leiomioma (tejido muscular liso), rabdomioma (tejido muscular estriado), papiloma (tejido epitelial formando papilas), adenoma (tejido glandular) y teratoma

10 (células totipotenciales). Ejemplos de neoplasias malignas incluyen, sin limitar a, sarcomas (por ejemplo: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma, angiosarcoma, lifangiosarcoma, sinoviosarcoma, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, etc.), carcinomas (por ejemplo: carcinoma epidermoide o escamoso, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, cistoadenocarcinoma, coriocarcinoma,

15 carcinoma de pene, carcinoma de pulmón, carcinoma de mama, carcinoma de colon etc.), gliomas, linfomas, leucemias, melanoma, el hepatoma, el seminoma, el cordoma y el mesotelioma. Por otro lado, ejemplos de cáncer, incluyen, si limitar a, Cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon y recto, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, leucemia, cáncer de próstata y cáncer de hígado y vesícula.

20

En la presente invención se entiende por individuo o sujeto a un miembro de una especie de animal, preferentemente mamífero e incluye, pero no se limita a, un animal doméstico, un primate y un humano; en el contexto de la presente invención, el individuo es preferiblemente un ser humano, masculino o femenino, de cualquier raza o edad.

25

Se entiende por “vacuna” al preparado de antígeno/s que una vez dentro del organismo provoca la activación de linfocitos específicos y producción de anticuerpos y con ello una respuesta de defensa ante sustancias extrañas o microorganismos patógenos. Esta respuesta puede generar memoria inmunológica produciendo inmunidad transitoria o de

30 larga duración frente al ataque patógeno correspondiente.

Así, la presente invención permite diseñar vacunas personalizadas a un sujeto, es decir se puede elegir el antígeno en función de las necesidades del sujeto para producir el complejo inmunogénico de la invención, el cual podrá emplearse como vacuna. La

enfermedad a tratar/prevenir dependerá del antígeno seleccionado para fabricar el complejo inmunogénico de la invención. Así, cualquier alergia, enfermedad infecciosa o antineoplásica es susceptible de ser tratada con el complejo inmunogénico de la invención. Por ejemplo, sabiendo el alérgeno al que el sujeto presenta alergia, se puede preparar un complejo inmunogénico según la presente invención que comprende el/los alérgeno/s de selección, y administrarlo al sujeto para producir una respuesta inmune, tratando de este modo la alergia.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una vacuna que comprende un complejo inmunogénico de la invención.

Método de tratamiento de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para prevenir y/o tratar una enfermedad infecciosa, una neoplasia o una reacción alérgica causada por un alérgeno en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto el complejo inmunogénico de la invención o la composición farmacéutica de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es una representación gráfica de la reacción de oxidación de manano con peryodato. En el esquema se muestran los dos tipos de uniones glicosídicas, alfa(1-2) y alfa(1-6) en el manano derivado de levadura. La oxidación con peryodato degrada los anillos de piranosa en ambos casos.

La Figura 2 es una representación gráfica del espectro monodimensional de manano pretratado con peryodato y sin tratar. Aparecen grupos aldehídos en el manano pretratado.

La Figura 3 muestra cuatro gráficas donde se representa el porcentaje de grupos aminos libres en diversos alérgenos polimerizados (barras negras) sobre el valor del alérgeno en su forma nativa sin polimerizar (barras blancas). Los datos son la media de al menos 4 lotes diferentes.

La Figura 4 es una imagen que muestra el resultado de una electroforesis (PAGE) en condiciones desnaturalizantes tras el tratamiento de albúmina sérica bovina (BSA) con manano previamente oxidado. Los carriles corresponden a la mezcla cruda tras la conjugación (BSA conjugada) y las dos muestras que provienen de la filtración en el AMICON YM100 (BSA menor 100kDa y BSA mayor 100kDa).

La Figura 5 es una gráfica que muestra el análisis de aminoácidos del extracto nativo de *Phleum pratense* y del polímero de *Phleum pratense* por cromatografía de gases. Se observa una importante disminución de lisinas libres en la muestra polimerizada.

La Figura 6 es una gráfica que muestra el análisis de aminoácidos de una muestra de manano stock procedente de *S. cerevisiae*.

La Figura 7 es una gráfica que muestra el espectro monodimensional de muestras polimerizadas con manano a diferentes proporciones (proteína: carbohidrato). Como control se utilizó una muestra polimerizada sin manano.

La Figura 8 es una gráfica que muestra un espectro bidimensional (DOSY) "Diffusion Ordered SpectroscopY", de muestras polimerizadas con manano a diferentes proporciones (proteína: carbohidrato). Como control se utilizó una muestra polimerizada sin manano.

La Figura 9 es una representación gráfica del porcentaje de monosacáridos de las diferentes muestras analizadas por cromatografía de gases de *Phleum pratense*

La Figura 10 es un gráfico que muestra el espectro monodimensional de comparación de muestras de *Phleum pratense*: extracto nativo (no polimerizado), polimerizado (sin manano) y de polimerización conjunta a proporción (1:0,5).

La Figura 11 es un gráfico que muestra el espectro bidimensional (DOSY) “Diffusion Ordered SpectroscopY”, de muestras de *Phleum pratense*, sin polimerizar, y polimerizadas con y sin manano.

5

La Figura 12 es un gráfico que muestra el espectro bidimensional HSQC (H-C) donde se comparan diferentes muestras de *Phleum pratense*. Región ampliada de la zona no monomérica.

10 La Figura 13 es una gráfica que muestra el espectro bidimensional (DOSY) “Diffusion Ordered SpectroscopY”, de muestras de extracto de ácaro (*D. farinae*) polimerizadas con manano a diferentes proporciones (proteína: carbohidrato). Como control se utilizó una muestra polimerizada sin manano.

15 La Figura 14 es una gráfica que muestra la superposición de espectros monodimensionales de muestras de *D. farinae*: extracto nativo, polimerizado (sin manano) y de polimerización conjunta a proporción (1:0.3).

20 La Figura 15 es una representación gráfica del porcentaje de monosacáridos de las diferentes muestras analizadas por cromatografía de gases de *D. farinae*.

La Figura 16 es una gráfica que muestra el espectro bidimensional (DOSY) “Diffusion Ordered SpectroscopY”, de muestras de *D. farinae*, sin polimerizar, y polimerizadas con y sin manano.

25

La Figura 17 es una imagen de microscopía electrónica de las muestras de *D. farinae* de: a) extracto nativo, b) polimerizado y c) polimerizado con manano (1:0,3).

30 La Figura 18 es un conjunto de gráficas que muestran los espectros monodimensionales de protón de *Phleum pratense* a diferentes tiempos.

La Figura 19A es una gráfica que muestra los resultados de los ensayos de ELISA de inhibición de unión a IgE a un extracto nativo de *Phleum pratense* con el alérgeno nativo (sin polimerizar), alérgeno polimerizado sin manosilar y alérgeno manosilado con

glutaraldehído. La Figura 19B es una imagen correspondiente a un gel de electroforesis en poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) y a una inmunodetección (*immunoblotting*) con sueros de pacientes alérgicos de un extracto de *Phleum pratense*: reactividad IgE con las proteínas separadas mediante PAGE.. Pm = patrón de pesos
 5 moleculares; 1= alérgeno nativo; 2= alérgeno polimerizado sin manosilar; 3= alérgeno manosilado con glutaraldehído.

La Figura 20A es una gráfica que muestra los resultados de los ensayos de ELISA de inhibición de unión a IgE a un extracto nativo de *D. pteronyssinus* y *D. farinae*,
 10 respectivamente con el alérgeno nativo (sin polimerizar), alérgeno polimerizado sin manosilar y alérgeno manosilado con glutaraldehído. La Figura 20B es una imagen correspondiente a un gel de electroforesis en poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) y a una inmunodetección (*immunoblotting*) con sueros de pacientes alérgicos, de un extracto de *D. pteronyssinus* y *D. farinae*: reactividad IgE con las proteínas separadas
 15 mediante PAGE; Pm = patrón de pesos moleculares; 1= alérgeno nativo; 2= alérgeno polimerizado sin manosilar; 3= alérgeno manosilado con glutaraldehído.

La Figura 21 es un conjunto de gráficas que muestran los resultados de los ensayos de activación de basófilos *ex vivo* en pacientes alérgicos a *Phleum pratense* o *D. farinae*
 20 con la misma concentración de proteína de extractos sin polimerizar (Nativo), polimerizados (Pol) o polimerizados con manano (Pol Manano). La evaluación de la activación de los basófilos se realizó por citometría de flujo con el kit BASOTEST®

La Figura 22 es una gráfica que muestra los resultados de los ensayos de respuesta *in vivo* (prick test) en pacientes alérgicos a *Phleum pratense* con la misma concentración de proteína de extractos sin polimerizar (Nativo), polimerizados (Pol) o polimerizados con manano (Pol Manano).

La Figura 23 es un diagrama de caja de los valores que muestra los resultados de los
 30 ensayos de respuesta *in vivo* (prick test) en pacientes alérgicos a *D. farinae* con la misma concentración de proteína de extractos sin polimerizar (Nativo), polimerizados (Pol) o polimerizados con manano (Pol Manano).

La Figura 24 es una representación gráfica que muestra los resultados obtenidos en los ensayos de captación de células dendríticas (DC) derivadas de monocitos humanos con alérgenos de *Phleum pratense* polimerizados (Pol) o *Phleum pratense* polimerizados y manosilados (Pol Manano). Los ensayos se realizaron mediante citometría de flujo
5 aprovechando la autofluorescencia de los pigmentos asociados al extracto de esta gramínea.

La Figura 25 es un conjunto de gráficas que muestran la producción de citocinas en sobrenadantes de células dendríticas (DC) estimuladas durante 24 horas con extracto de
10 *Phleum pratense* nativo (N), *Phleum pratense* polimerizado (P) y *Phleum pratense* polimerizado con manano (PM).

La Figura 26 es una gráfica que muestra la expresión de marcadores de maduración en células dendríticas estimuladas con alérgenos de *Phleum pratense* sin polimerizar
15 (Nativo), *Phleum pratense* polimerizado sin manosilar (Pol) o *Phleum pratense* polimerizado manosilado (Pol-Man).

La Figura 27 es una gráfica que muestra la expresión de marcadores de maduración en células dendríticas estimuladas con alérgenos de *D. farinae* sin polimerizar (Nativo),
20 polimerizados sin manosilar (Pol) o polimerizados y manosilados (Pol-Man).

La Figura 28 es una gráfica que muestra la inducción de células productoras de IFN γ , IL-10 e IL-4 específicas tras ensayos de inmunización *ex vivo* con alérgenos polimerizados (Pol) o polimerizados y manosilados (Pol Man) de *Phleum pratense*. El número de células
25 productoras se determinó por ELISPOT.

La Figura 29 es una gráfica que muestra la inducción de células productoras de IFN γ , IL-10 e IL-4 específicas tras ensayos de inmunización *ex vivo* con alérgenos polimerizados (Pol) o polimerizados y manosilados (Pol Man) de *D. farinae*. El número de células
30 productoras se determinó por ELISPOT.

La Figura 30 es un esquema del protocolo de inmunización de los ratones Balb/c.

La Figura 31 es un esquema del protocolo seguido en el ensayo de proliferación de linfocitos.

La Figura 32 es un gráfico que muestra la respuesta proliferativa en ratones inmunizados con 5 µg de alérgenos de *Phleum pratense* polimerizados sin manosilar (Polímero) o polimerizados y manosilados (Polímero Manano). Ensayo de proliferación con CSFE.

La Figura 33 es un gráfico que muestra la respuesta proliferativa en ratones inmunizados con 20 µg de alérgenos de *D. farinae* polimerizados sin manosilar (Polímero) o polimerizados y manosilados (Polímero Manano). Ensayo de proliferación con CSFE.

La Figura 34 es un conjunto de gráficas que muestra la producción de citocinas por esplenocitos de ratones inmunizados con polímeros de *Phleum pratense* en respuesta al alérgeno de *Phleum pratense* nativo (sin polimerizar). Las barras representan la media de los ratones de un mismo grupo. Barras grises: polímero sin manosilar; Barras negras: polímero manosilado.

La Figura 35 es un conjunto de gráficas que muestran la producción de citocinas por esplenocitos de ratones inmunizados con polímeros de *D. farinae* en respuesta al alérgeno de *D. farinae* nativo (sin polimerizar). Las barras representan la media de los ratones de un mismo grupo. Barras grises: polímero sin manosilar; Barras negras: polímero manosilado.

La Figura 36 es un conjunto de gráficas que muestran los niveles de anticuerpos específicos contra alérgenos de *Phleum pratense* en su forma nativa (sin polimerizar) detectados en el suero de ratones inmunizados con alérgenos polimerizados no manosilados (Polímero) o polimerizados y manosilados (Polímero Manano).

La Figura 37 es un conjunto de gráficas que muestran los niveles de anticuerpos específicos contra alérgenos de *D. farinae* en su forma nativa (sin polimerizar) detectados en el suero de ratones inmunizados con alérgenos polimerizados no manosilados (Polímero) o polimerizados y manosilados (Polímero Manano).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Elaboración de vacunas mediante la conjugación de alérgenos (polimerizados o no) con manano oxidado

5

1.- Oxidación del manano

El manano procedente de *Saccharomyces cerevisiae* se fraccionó previamente mediante ultrafiltración con una membrana de 100KDa de corte. Se recogió la fracción filtrada de bajo peso molecular y se sometió a la oxidación con peryodato. En la Figura 1 se muestra la acción teórica del peryodato sobre la integridad de la manosa y la generación de grupos aldehídos. En la Figura 2 se demuestra experimentalmente la generación de estos grupos tras la oxidación del manano.

2.- Polimerización de alérgenos

Alérgenos procedentes de distinto origen (*Phleum pratense*, *Olea europea*, *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Alnus glutinosa*) fueron polimerizados mediante el empleo de glutaraldehído. En la Figura 3 se puede observar la disminución de grupos amino en los alérgenos polimerizados sobre el valor del alérgeno en su forma nativa sin polimerizar. La presencia de los grupos aminos se determinaron mediante reacción con la nihidrina según Farmacopea Europea (sección 2.2.56, análisis de aminoácidos).

3.- Conjugación del manano oxidado con BSA (albúmina sérica bovina)

Los resultados obtenidos mostraron que existía una conjugación entre BSA y el manano oxidado, como se demuestra por electroforesis en poliacrilamida [Figura 4, (BSA conjugada)]. En la misma figura se muestra cómo la fracción de BSA conjugada, retenida en la fracción mayor de 100 kDa por ultrafiltración, aparecía mayoritariamente como BSA monomérica. Ello supone que una gran proporción de los posibles conjugados formados revertían a la condición inicial en condiciones desnaturalizantes, lo que indicaba que la reacción de conjugación con manano preoxidado no generaba productos de suficiente estabilidad. La estabilización de estos conjugados se puede realizar mediante el proceso químico que se denomina aminación reductiva que implica una reducción química, con ciano-borohidruro sódico, de las bases de Schiff formadas en la reacción de conjugación para obtener las correspondientes aminas secundarias más estables. Sin embargo esta reacción conlleva una nueva transformación química sobre los sustratos iniciales que

genera grupos funcionales y entidades químicas (aminas secundarias) no existentes en ninguno de los reactivos de partida (manano y proteína) y que por tanto sería necesario definir y caracterizar.

5 4.- *Conjugación del manano oxidado con un extracto proteico procedente del alérgeno *Phleum pratense* previamente polimerizado con glutaraldehído.*

A pesar de que no era evidente que se pudiese obtener una exitosa conjugación debida a la disminución significativa de grupos aminos libres en los polímeros (Figura 3), se
10 procedió a probar la conjugación de manano preoxidado con polimerizados de alérgenos de *Phleum pratense* siguiendo el protocolo descrito para la albúmina (Masárová, J. and Mislovicová, D. 2002. Int. J. Polymer. Anal. Charact., 7: 106-116). Como era esperable, tras la polimerización con glutaraldehído, el número de lisinas libres es 4,5 veces menor en % de aminoácidos totales con respecto al extracto nativo sin polimerizar (Figura 5).

15

El manano oxidado se conjugó con el extracto de *Phleum pratense* polimerizado (material de tamaño molecular superior a 100KDa). Seguidamente el producto de la reacción de conjugación se fraccionó nuevamente a través de una membrana de 100KDa. En esta etapa se recogió la fracción retenida superior a 100KDa, donde se encuentra el extracto
20 polimerizado original y el manano que haya sido conjugado.

Se analizó el contenido en carbohidratos totales de la muestra retenida mediante análisis colorimétrico con antrona y no se observó un incremento significativo en la cantidad de carbohidratos en la muestra, comparado con el contenido inicial del extracto polimerizado
25 no tratado con manano. Por otra parte, estudios por resonancia magnética nuclear (estudios monodimensional y bidimensionales) no mostraron una unión covalente entre ambos compuestos, ni diferencias estructurales a nivel molecular, indicando que con este protocolo de conjugación no se obtenía una interacción molecular entre ambos componentes y por lo tanto no se obtenía una unión o conjugación entre ambos
30 productos. Sin querer estar vinculado a ninguna teoría, ello puede ser debido a la reducción de los grupos aminos libres (fundamentalmente aportados por lisinas), junto con la baja accesibilidad de las lisinas libres residuales debido a que el material proteico es un polímero, y por tanto una estructura rígida y de poca flexibilidad. Esta posibilidad es apoyada por el hecho de que los mismos resultados negativos se obtuvieron con otros

alérgenos previamente polimerizados con glutaraldehído, y por tanto con reducción de grupos aminos libres como se muestra en la Figura 3.

5.- Conclusión

- 5 Estos resultados evidencian una falta de conjugación entre las muestras polimerizadas de *Phleum pratense* (y otros alérgenos polimerizados) con manano oxidado. Ello, junto con los inconvenientes referentes a la transformación de la manosa tras su oxidación (Figura 1) (Shibuya, N., et al. 1988. Journal of Biological Chemistry, 263: 728-734) y la falta de estabilidad de los conjugados formados incluso con una proteína rica en lisinas como la
- 10 BSA (Figura 4), permite descartar esta metodología para su uso en la fabricación de vacunas de alérgenos polimerizados.

Ejemplo 2

Elaboración de vacunas mediante la conjugación de alérgenos polimerizados con manosa mediante de glutaraldehído.

15

Material y Métodos

El método de polimerización y conjugación de extractos proteicos consta de los siguientes pasos:

- 20 1. Se parte de un extracto liofilizado de *Phleum pratense*, que se reconstituye en el volumen necesario de tampón fosfato (PBS) para conseguir una concentración final de 2 mg/mL de proteína. Posteriormente, el pH se ajusta a 7,2 utilizando los tampones fosfato potásico o fosfato sódico, según sea necesario bajar o subir el pH del extracto y se calcula la concentración proteica del extracto teniendo en cuenta el
- 25 volumen de tampón utilizado para ajustar el pH.

Ej.: Cantidad de proteína de partida: 300 mg de proteínas de *P. pratense*.

Volumen necesario de PBS: 150 mL

Volumen necesario para ajustar el pH a 7,2: 1 mL de tampón.

- 30 Concentración final de la muestra: 1,986 mg/mL

2. Reacción de polimerización y conjugación del extracto:

El agente polimerizador, en este caso glutaraldehído, se añade gota a gota sobre el extracto en agitación hasta alcanzar una concentración final de 0,025 M.

El manano, para la conjugación de la muestra, se añadirá también en este punto a una relación 1:0,5 (masa proteína: masa manano). Se deja la reacción durante 15 horas a 4°C en agitación.

5 Ej.: Concentración inicial de glutaraldehído: 2,5 M.

Volumen a añadir al extracto: 1,5 mL

Manano (relación proteína:carbohidrato 1:0,5): 90 mg.

3. Parada de la reacción:

10 Se atempera el extracto a temperatura ambiente (25°C) y se añade glicina en polvo para parar la reacción de polimerización. La glicina debe estar en exceso, por ejemplo a una relación 1:50 con el glutaraldehído. Se disuelve la glicina en la muestra y se deja a 4°C en agitación, durante 2 horas.

15 Ej.: Concentración inicial de glicina (Masa molecular: 75,07): 1,25 M

Concentración de glutaraldehído: 0,025 M

Volumen del extracto: 152,5 mL (151 mL iniciales + 1,5 mL glutaraldehído)

Cantidad de glicina a añadir: 14,31 g

20 4. Posteriormente el extracto es dializado frente a 7 volúmenes de agua destilada, con el fin de eliminar las sales y posibles restos no polimerizados. Se utiliza un sistema de ultrafiltración tangencial (Pellicon, Merck Millipore) con una membrana de 100 kDa de poro.

25 Ej.: Volumen del extracto: 152,5 mL

Volumen de agua: 1.525 mL

5. Finalmente el extracto polimerizado y conjugado con manano se filtra por 0,22 µm, se alícuota, congela a -60°C y se liofiliza para su conservación.

30

Resultados

Como resultado de aplicar dicho método, se obtuvo un polímero manosilado inmunológicamente mejorado con respecto al alérgeno polimerizado original. El

tratamiento con glutaraldehído permite unir ambas estructuras (alérgeno y manano), produciéndose conjugación y polimerización a la vez, como se evidencia con los resultados que se muestran en el siguiente ejemplo (ejemplo 3).

Dicho polímero manosilado tiene unas propiedades estructurales e inmunológicas superiores a las del alérgeno nativo o polimerizado sin manosilar, como se evidencia en el ejemplo 4 y en los ejemplos 5-10, respectivamente.

Se establece así un método de conjugación de antígenos polimerizados con manano mediante glutaraldehído en un solo paso, en donde la integridad de la estructura de la manosa es mantenida. Para ello se aprovecha por un lado que el manano de origen natural, p.ej., procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, tiene un resto peptídico de la manoproteína original sobre la que se sintetiza el manano en levaduras que contiene lisinas (Figura 6), dando lugar a una conjugación química. Por otro se aprovecha la estructura polimérica, ramificada y rígida del manano en solución con un polímero naciente de proteína en el que el primero queda atrapado por la proteína que está siendo polimerizada por el glutaraldehído, dando lugar a una conjugación física. En cualquiera de los dos casos, sin ser mutuamente excluyentes, el tratamiento con glutaraldehído de la mezcla de proteína en su forma nativa (no polimerizada) con manano permite unir ambas estructuras, produciéndose la conjugación y polimerización de forma simultánea.

Ejemplo 3

Evidencia de la polimerización y conjugación de alérgenos (gramíneas y ácaros) con manano mediante reacción con glutaraldehído

25 Material y Métodos

Alícuotas de 2 mg de la muestra liofilizadas obtenidas en el ejemplo 2 se disolvieron en 0,5 mL de agua deuterada y se analizaron por resonancia magnética nuclear (RMN) en un espectrómetro Bruker Advance de 500 MHz o en un Bruker Advance de 600MHz equipado con criosonda. De las diversas muestras se adquirieron espectros monodimensionales de resonancia de protón, bidimensionales de correlación heteronuclear protón-carbono¹³ (HSQC; Zwaalen *et al.*, 1997. J. Am. Chem. Soc. 119: 6711-6721) y bidimensionales ordenados por difusión translacional (DOSY, Wu *et al.* 1995. J. Magn. Reson. A. 115: 260-264) siguiendo los protocolos estandarizados e

implementados por el fabricante, Bruker Biospin Corporation, (Billerica, Massachusetts, USA), en el software de adquisición y procesamiento de espectros TOPSPIN.

Se analizó el contenido en carbohidratos y proteínas de las muestras mediante técnicas colorimétricas, método de la antrona (Shields, R. and W. Burnett.1960. Analytical Chemistry 32: 885-886) para el análisis de carbohidratos totales y método Bradford para el análisis de proteínas (Bradford, M. M. 1976. Analytical Biochemistry 72: 248-254).

Se analizó la proporción de distintos monosacáridos de la parte glucídica de las muestras mediante hidrólisis total ácida y análisis por cromatografía de gases de los monosacáridos liberados en forma de sus acetatos de alditol (M. F. Chaplin & J. F. Kennedy editors, Carbohydrate Analysis: a practical approach. (1986) Oxford IRL PRESS).

Se analizó la proporción de los distintos aminoácidos en la parte proteica de las muestras mediante hidrólisis total ácida de las muestras y análisis por cromatografía líquida de los de los aminoácidos liberados en un equipo Biochrom Aminoacid Analyzer.

Resultados

3.1.- Estudios del proceso de polimerización conjunta de *Phleum pratense* con diferentes proporciones de manano con el fin de establecer la proporción más adecuada, que permita una conjugación adecuada del extracto polimerizado con el manano.

La estructura de las muestras obtenidas en este proceso con diferentes proporciones de proteína:manano fueron analizadas por resonancia magnética nuclear (RMN), utilizando como control una muestra de polimerizado sin manano. El extracto proteico polimerizado por sí solo tenía restos de oligosacáridos pertenecientes a la propia muestra (12-20%), lo que se confirmó por cromatografía de gases (análisis de monosacáridos). Al aumentar la cantidad de azúcar en el medio se aumentaba la señal del polisacárido en el espectro como era de esperar (Figura 7). Se realizó un estudio de difusión traslacional, el cual ordena los compuestos por su coeficiente de difusión, que depende a su vez del tamaño molecular (espectro bidimensional por RMN; Espectro bidimensional (DOSY) "Diffusion Ordered Spectroscopy"). En este estudio se observó que en las muestras polimerizadas con manano había partículas más grandes que en muestras sin polimerizar, lo que

indicaba una asociación entre el extracto proteico y el manano en todos los casos (Figura 8). Concretamente en el caso de la proporción 1:4 se observó una alta cantidad de la parte oligosacáridica, posiblemente debido al exceso de carbohidrato en el medio de reacción.

5

Por otra parte se cuantificó la cantidad de proteína y de azúcar para intentar averiguar a groso modo la relación de proteína:azúcar de las muestras que habían sufrido el proceso de polimerización y poder compararlo con las proporciones iniciales (Tabla 1).

10 Tabla 1: Comparación de la relación proteína:manano antes y después de la polimerización

Relación (Peso seco) proteína:manano (antes del proceso de polimerización)	Relación (Bradford/antrona) proteína:manano (después del proceso de polimerización)
1:0,5	1:0,8
1:1	1:1,3
1:4	1:3

En el caso de la muestra polimerizada en la proporción 1:4, era normal que después del proceso se obtuviera una menor proporción en la cantidad de azúcares debido al gran exceso inicial en que se encuentra en el medio de reacción, siendo eliminada en la etapa de lavado la parte que no reaccione. En el resto de las muestras se observó un incremento de la proporción de polisacárido en comparación a la proporción inicial, que se debe a que el propio extracto tiene restos de polisacáridos unidos covalentemente.

20 Con todos los datos se eligió la proporción (1:0,5), ya que confirma la incorporación de carbohidratos en la muestra y se minimiza el uso de manano.

3.2.- Análisis de la polimerización conjunta de *Phleum pratense* a la proporción proteína:carbohidrato

25

3.2.1 Análisis de carbohidratos mediante cromatografía de gases

A partir de una disolución de material liofilizado se cuantificó por cromatografía de gases, mediante hidrólisis ácida (análisis alditol) (Fukuda, M. & Kobata, A. 1993. Glycobiology. A

Practical Approach. The practical Approach Series. Oxford University Press Inc., New York.) el porcentaje de carbohidratos en peso seco con respecto al total de la muestra.

Se analizaron tres muestras (Figura 9):

- 5 - *Phleum pratense* Extracto nativo
- *Phleum pratense* Polimerizado
- *Phleum pratense* Polimerizado con manano (1:0.5)

10 Los resultados mostraron un aumento significativo de manosa en las muestras sometidas a la polimerización conjunta con respecto a la muestra polimerizada (sin manano) y al extracto nativo.

3.2.2 Estudios de RMN (Resonancia Magnética Nuclear)

15 Los estudios estructurales por RMN demuestran un ensanchamiento de las señales en las muestras polimerizadas indicando un aumento de tamaño, que se corrobora en el espectro bidimensional de difusión traslacional DOSY (Difusión Ordered Spectroscopy) (Figuras 10 y 11). En este experimento bidimensional se observa que en el caso del extracto proteico sin polimerizar existe material de diferente tamaño y por consiguiente es una muestra muy heterogénea, que al polimerizar aumenta de tamaño molecular

20 promedio. Por otra parte cuando el extracto se polimeriza en presencia de manano, se obtiene también un material de incluso menor coeficiente de difusión (dato indicativo de mayor tamaño) que el polimerizado (debido a que el polisacárido es de un alto peso molecular), indicando unión o interacción entre el polisacárido y el extracto proteico, ya que ambas partes del espectro, tanto la zona de carbohidratos como la de proteínas

25 tienen el mismo coeficiente de difusión indicando una interacción entre ambos componentes. Estos experimentos de resonancia magnética nuclear corroboran la conjugación proteína:manano tras la polimerización del el extracto proteico con glutaraldehído en presencia de manano.

30 Por otro lado se llevó a cabo otro estudio bidimensional por RMN basado en la correlación heteronuclear entre carbono 13 y protón (^{13}C - ^1H) (HSQC, "Heteronuclear Single Quantum Coherence"). Estos estudios muestran a nivel atómico los enlaces entre un hidrógeno y un carbono, a cada enlace le corresponde una señal (pico) de correlación concreta del espectro y su posición (coordenadas: abcisas desplazamiento químico de

^1H ; ordenadas: desplazamiento químico de ^{13}C) que es diferente dependiendo del tipo de compuesto. El conjunto de señales (enlaces H-C) dan lugar a un patrón bidimensional específico y exclusivo para cada compuesto, de forma similar a una “huella dactilar” (Claridge, T. D. W. 1999. High-resolution NMR techniques in Organic Chemistry.

5 Tetrahedron Organic Chemistry Series. Elsevier).

Se realizaron tres experimentos de HSQC para caracterizar el patrón característico de cada tipo de muestra:

- Manano libre
- 10 - Polimerizado de *Phleum pratense*
- Polimerizado de *Phleum pratense* en presencia de manano (1:0,5)

La muestra polimerizada en presencia de manano presenta las señales propias del manano y las de los carbohidratos intrínsecos de la propia muestra indicando la
15 interacción entre el extracto proteico y el polisacárido (Figura 12).

3.3.- Estudios del proceso de polimerización conjunta de *D. farinae* con diferentes proporciones de manano

20 A partir de los resultados obtenidos con *Phleum pratense*, se realizaron experimentos preliminares con la proporción proteína: carbohidrato (1:0,5); sin embargo los resultados obtenidos no fueron tan satisfactorios como para caso del extracto de *Phleum pratense*, debido a que se observó un exceso de restos de manano no asociados a material proteico (Figura 13, señal enmarcada por el círculo negro). Se llevaron a cabo nuevas
25 polimerizaciones con menor proporción de carbohidrato en el medio (1:0,3 y 1:0,15). Se eligió la relación (1:0,3), dado que se observó la incorporación de manano en la muestra mayormente en la forma asociada a la proteína (Figura 13 recuadro b) y no en forma libre (Figura 13 recuadro c círculo negro) y esta incorporación de manano era superior que con la relación (1:0,15) y en la mayor perturbación observada, también para la relación 1:0,3,
30 en la zona del espectro correspondiente a la parte proteica (Figura 13).

3.3.1 Análisis de la polimerización conjunta de *D. farinae* a la proporción proteína: carbohidrato (1:0,3)

En la Figura 14 se presenta la comparación cualitativa de los espectros monodimensionales de protón de una muestra de extracto de *D. farinae* polimerizado en presencia de manano en relación 1:0,3 con referencia a una muestra polimerizada en ausencia de manano y a una muestra del extracto sin polimerizar. En el espectro se indica la presencia de señales específicas de manano en la muestra polimerizada con manano así como el cambio de patrón espectroscópico, motivado por la polimerización, en la zona del espectro específica de proteína.

3.3.1.1 *Análisis de carbohidratos mediante cromatografía de gases*

A partir de una disolución de material liofilizado se cuantificó por cromatografía de gases (Fukuda, M. & Kobata, A. 1993. Glycobiology. Oxford University Press Inc., New York) el porcentaje de carbohidratos en peso seco con respecto al total de la muestra.

Se analizaron tres muestras (Figura 15):

- *D.farinae* Extracto nativo
- *D.farinae* Polimerizado
- *D.farinae* Polimerizado con manano (1:0,3)

Los extractos y polimerizados de *D. farinae* contienen restos de oligosacáridos intrínsecos en la propia muestra (aproximadamente 17-20% determinado por cromatografía de gases con presencia mayoritaria de glucosa, manosa y galactosa). Los resultados para el polimerizado conjunto con manano mostraron un aumento significativo de manosa tanto con respecto a la muestra polimerizada sin manano como al extracto nativo.

25

3.3.1.2 *Estudios de RMN (Resonancia Magnética Nuclear)*

Las muestras obtenidas en el proceso de polimerización y conjugación conjunta a la proporción (1:0,3) (proteína:manano) fueron analizadas por RMN. Estos resultados mostraron un ensanchamiento de la señal en muestras polimerizadas, indicando un aumento de tamaño molecular que se corrobora en el espectro bidimensional DOSY” (Figura 16). De forma similar a lo que ocurría con *Phleum pratense*, la muestra polimerizada con manano era homogénea y de mayor tamaño a la polimerizada sin manano, indicando una asociación entre el polisacárido y el extracto proteico de *D. farinae* y por tanto, corroborando, la conjugación de ambos componentes.

3.3.1.3 Estudios de microscopía electrónica de transmisión

Imágenes a microscopía electrónica de transmisión de las diferentes muestras de *D. farinae*, nos permitió observar diferencias a nivel estructural entre los extractos nativos y polimerizados. Donde la polimerización ofrece una mayor densidad en las partículas y la conjugación con manano además produce cambios a nivel morfológico y estructural muy visibles en el polímero, siendo una evidencia más de la asociación entre el polisacárido y el extracto proteico (Figura 17).

10

Ejemplo 4

La polimerización y manosilación mediante reacción con glutaraldehído genera polímeros más estables que los polímeros no manosilados

Se comparó la estabilidad de tres muestras de *Phleum pratense*, una polimerizada en presencia de manano (relación proteína/manano 1:0.5), otra polimerizada en ausencia de manano y el propio alérgeno sin polimerizar frente al almacenamiento prolongado en medio acuoso. Alícuotas de muestras equivalentes a las analizadas en el Ejemplo 3 se disolvieron en agua deuterada y se analizaron por RMN y seguidamente se almacenaron a 4°C. Las muestras no se sacaron de los tubos de RMN ni tuvieron ningún otro tipo de manipulación. A los 4 meses de almacenaje se repitieron los experimentos de RMN con los mismos parámetros de adquisición para comprobar la estabilidad de las muestras en estas condiciones de disolución (agua deuterada 4°C). Los resultados, presentados como la diferencia de los espectros a tiempo inicial y a los 4 meses (sustracción de espectros realizada con el software TOPSPIN del propio espectrómetro), mostraron que las muestras polimerizadas eran más estables que los extractos nativos (pérdida señal 40%), y que la conjugación con manano aumentaba aún más la estabilidad, tan sólo se perdía un 4% de señal de la muestra, lo que indicaba un bajo índice de degradación / precipitación de la muestra (Figura 18).

30

Ejemplo 5

Los polímeros manosilados con glutaraldehído son comparables con los polímeros no manosilados en cuanto a su pérdida de alergenicidad

5.1.- Ensayos de reactividad con anticuerpos IgE específicos

Material y Métodos

Los ensayos de reactividad IgE se llevaron a cabo mediante técnicas de ELISA de inhibición. Se tapizaron placas de 96 pocillos (Microlon, alta capacidad de unión, Greiner bio-one, Alemania) con 1 µg de extracto nativo por pocillo diluido en tampón 0,05 M carbonato/ bicarbonato, pH = 9,6. Las placas se dejaron a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente las placas se lavaron con tampón PBS-t (tampón fosfato con 0,25% Tween-20) y se añadieron el pool de sueros de pacientes alérgicos correspondiente en cada caso (alérgicos a gramíneas o ácaros) y los inhibidores (extracto nativo, extracto polimerizado y extracto polimerizado manosilado) haciendo diluciones seriadas ½ desde 100µg/mL hasta 0,01µg/mL. Las placas se incubaron con la mezcla durante toda la noche y al día siguiente, después de realizar los lavados con PBS-t, se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti IgE humana conjugado con peroxidasa (Southern Biotech, USA) a una dilución 1:2000. Las placas se revelaron con el sistema de OPD (Sigma Aldrich, USA) durante de 30 minutos. La reacción se paró con ácido clorhídrico diluido 1/10 en agua y se las placas se leyeron a 492 nm.

La reactividad de IgE de los extractos nativos, polimerizados y polimerizados manosilados también se analizó mediante electroforesis e inmunodetección. La separación de proteínas de los extractos se llevó a cabo en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las inmunodetecciones se realizaron transfiriendo las proteínas separadas por electroforesis a membranas de nitrocelulosa (Bio Rad, Alemania). Las membranas se bloquearon con PBS-t con 5% BSA (albúmina sérica bovina) y se incubaron con los sueros de pacientes alérgicos. Posteriormente se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti IgE humana conjugado con peroxidasa (Southern Biotech, USA) a una dilución 1:2.000. Para el revelado se utilizó el sistema de quimioluminiscencia ECL (GE- Healthcare, USA).

30 Resultados

5.1.1 La pérdida de reactividad IgE con polímeros de *Phleum pratense* manosilados con glutaraldehído es comparable a la de los polímeros sin manosilar

En la Figura 19A se muestra un ELISA de inhibición donde se puede apreciar que los alérgenos polimerizados de *P. pratense* con y sin manosilar presentan una reactividad de IgE menor que los alérgenos nativos. En la Figura 19B se pueden apreciar las bandas correspondientes a las proteínas alergénicas de *P. pratense* tanto en el gel de electroforesis como en la inmunodetección realizada con el suero de pacientes alérgicos, en los carriles correspondientes al alérgeno polimerizado y polimerizado manosilado no se aprecian bandas (PAGE-SDS) ni unión a IgE (inmunodetección).

5.1.2 La pérdida de reactividad IgE con polímeros de *D. pteronyssinus* y *D. farinae* manosilados con glutaraldehído es comparable a la de los polímeros sin manosilar.

En la Figura 20A se muestra un ELISA de inhibición donde se puede apreciar que los alérgenos polimerizados de *D. pteronyssinus* y *D. farinae* con y sin conjugar con manano presentan una reactividad de IgE similar y que es menor que la observada en los alérgenos nativos. En la Figura 20B se pueden apreciar las bandas correspondientes a las proteínas alergénicas de ambas especies de ácaros tanto en el gel de electroforesis como en la inmunodetección realizada con el suero de pacientes alérgicos, en los carriles correspondientes a alérgenos polimerizado y polimerizado manosilado no se aprecian bandas (PAGE-SDS) ni unión a IgE (inmunodetección).

5.2.- Ensayos de activación *ex vivo* de basófilos humanos

Se valoró la capacidad de los diferentes preparados de *Phleum pratense* y *D. farinae* para activar basófilos de pacientes alérgicos a esos alérgenos.

Material y Métodos

La evaluación de la activación de los basófilos se realizó utilizando el kit comercial BASOTEST® (ORPEGEN Pharma, Heidelberg, Alemania) el cual permite la medición del porcentaje de activación de basófilos en sangre periférica mediante la citometría de flujo.

Procedimiento:

- 1- Extracción de la sangre venosa periférica en tubo con heparina sódica.
- 2- Incubación de la sangre con el buffer de estimulación (que contiene IL-3)
- 3- Estimulación con los alérgenos de *P. pratense* y *D. farinae* (nativo, polímero y polímero-manano). También se incluyen un control negativo (sólo con buffer de

lavado) y control positivo (péptido quimiotáctico N-formil metionil leucil fenilalanina (fMLP))

4- Marcaje de las células con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos (anti-CD203c y anti-CD63.FITC). Las células doble positivas (CD203c/CD63) reflejan los basófilos activados.

5- Lisis de eritrocitos con buffer hipotónico.

6- El análisis se realizó en un citómetro FC500 (Beckman Coulter).El marcaje específico para la determinación de basófilos activados fue: CD203c+ y CD63+.

10 Resultados

El porcentaje de basófilos activados (CD203c+CD63+) tras la incubación con cada uno de los alérgenos sin polimerizar (nativos) fue, como era de esperar, alta y similar a la obtenida con el control positivo del ensayo. Por el contrario, el grado de activación disminuía cuando la incubación se realizaba con los alérgenos polimerizados tanto de *Phleum pratense* como de *D. farinae*. Esta pérdida en la capacidad de los polímeros para activar basófilos es un reflejo de su pérdida en alergenicidad, y como se muestra en la Figura 21 era comparable tanto entre polímeros sin manosilar como en los manosilados. Todo ello indica que los polímeros manosilados mantienen disminuida su alergenicidad para ambos alérgenos en la misma medida que la tienen los alérgenos polimerizados convenciobnales (no manosilados).

5.3.- Pruebas cutáneas en pacientes alérgicos (prick test)

Se valoró la capacidad de los diferentes preparados de *Phleum pratense* y *D. farinae* para producir pruebas cutáneas positivas en pacientes alérgicos a esos alérgenos.

Material y Métodos

Prick test

El prick test consistió en la colocación de una gota por duplicado de cada alérgeno (nativo, polímero o polímero-manano) de *P. pratense* y *D. farinae* sobre la piel del antebrazo de pacientes alérgicos a *P. pratense* y *D. farinae* respectivamente. Estos alérgenos, preparados como se ha descrito anteriormente, se ajustaron a la misma concentración de proteína en una solución salina glicerizada al 50%. Mediante una

punción de la piel con una lanceta de 1 mm a través de la gota, se introdujo el alérgeno en la dermis. El alérgeno reacciona con los mastocitos sensibilizados de los pacientes a través de la IgE específica, que liberan histamina tras su activación. La histamina liberada aumenta la permeabilidad capilar produciendo una extravasación de líquidos que se traduce en la aparición de una pápula cutánea a los 20 minutos de realizar la punción.

El tamaño de la pápula (mm^2) se considera un índice de alergenidad del preparado, siendo este mayor cuando mayor es la superficie de la pápula desarrollada.

10 *Estadística:*

Para estadística descriptiva se empleó la media con sus respectivos límites de confianza del 95%, desviación estándar, mediana con los correspondientes primer y tercer cuartil, el coeficiente de variación y el rango de valores (valor máximo y mínimo).

15 Para la estadística comparativa se empleó el análisis de varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni (para comparar entre pares de valores) en los datos de los tests cutáneos con ácaros, ya que estos siguen una distribución normal. En el caso de los datos de los tests cutáneos con *Phleum pratense* se emplearon tests no paramétricos ya que estos datos no seguían una distribución normal. Se empleó el test de Friedman para
20 comparar entre los tres preparados y el test de Wilcoxon para comparar entre pares.

Para la representación gráfica se usó el diagrama de caja, que representa la mediana con sus respectivos cuartiles del 25 y 75%.

25 Resultados

5.3.1 La pérdida de alergenidad en prick test con polímeros de *Phleum pratense* manosiados con glutaraldehído es superior a la de los polímeros no manosiados

30 Se estudiaron 12 pacientes, 5 hombres y 7 mujeres, clínicamente alérgicos al polen de gramíneas. La media de edad era de 41 años, con un rango de 11 a 78 años. La mediana del tamaño del área de la pápula inducida por el extracto nativo (no modificado) de *Phleum pratense* fue de $28,4 \text{ mm}^2$, siendo los valores de los cuartiles del 25 y del 75% de $23,0$ y $43,1 \text{ mm}^2$, respectivamente. Los valores correspondientes al extracto polimerizado

fueron de 8,0 mm² para la mediana y de 8,0 y 19,7 para los cuartiles, respectivamente. Para el extracto polimerizado y manosilado los valores fueron de 0,0 para la mediana y de 0,0 y 5,4 para los cuartiles, respectivamente (Tabla 3).

- 5 Las diferencias entre los tamaños de pápulas, obtenidos con los tres tipos de preparaciones, son muy significativas (test de Friedman, $P<0,0001$), siendo también muy significativas (test de Wilcoxon, $P<0,0001$) entre parejas de preparaciones: nativo-polímerizado, nativo-polimerizado manosilado y polimerizado-polimerizado manosilado. La preparación que muestra una menor alergenidad *in vivo* es el polimerizado manosilado.
- 10

En las Tablas 2 y 3 se muestran los valores individuales del área de cada una de las pápulas obtenidas con cada una de las preparaciones, además de la estadística descriptiva de estos valores y los datos epidemiológicos de los pacientes (edad y sexo).

15

Tabla 2: Datos epidemiológicos (edad y sexo) de los pacientes y valores del área de cada una de las pápulas inducidas por cada preparación.

Pacientes	Sexo	Edad (años)	Histamina (mm ²)	Nativo (mm ²)	Pol (mm ²)	Pol manano (mm ²)
1	V	70	63,59	40,69	12,56	0,00
2	M	29	38,47	12,56	4,52	4,52
3	V	27	50,24	18,09	8,04	0,00
4	M	78	50,24	24,62	18,09	0,00
5	M	54	38,47	32,15	12,56	8,04
6	M	63	50,24	40,69	12,56	0,00
7	M	25	78,50	24,62	24,62	12,56
8	M	33	38,47	24,62	4,52	0,00
9	V	24	50,24	113,04	24,62	8,04
10	V	11	63,59	72,35	12,56	0,00
11	V	46	63,59	18,09	8,04	0,00
12	M	35	50,24	50,24	32,15	0,00
TOTAL	5V					

	7M
--	----

Tabla 3: Estadística descriptiva de los datos mostrados en la Tabla 2.

Parámetro	Edad (años)	Histamina (mm ²)	Nativo (mm ²)	Pol (mm ²)	Pol manano (mm ²)
Media	41,3	53,0	39,3	14,6	2,8
IC del 95% superior	53,0	59,9	55,5	19,5	5,3
IC del 95% inferior	29,5	46,0	23,2	9,7	0,3
Desviación estándar	20,8	12,3	28,5	8,7	4,4
Mediana	34,0	50,2	28,4	12,6	0,0
Primer cuartil	26,5	47,3	23,0	8,0	0,0
Tercer cuartil	56,3	63,6	43,1	19,7	5,4
Coeficiente de variación	50,5	23,2	72,6	59,5	160,3
Máximo	78,0	78,5	113,0	32,2	12,6
Mínimo	11,0	38,5	12,6	4,5	0,0
n	12	12	12	12	12

En la Figura 22 se muestran mediante un diagrama de caja, los valores del área de las pápulas obtenidas con cada una de las preparaciones de *Phleum pratense*. Como se observa, las pruebas cutáneas realizadas con el polímero manosilado son virtualmente negativas, lo que supone una disminución con respecto al polímero sin manosilar, que a su vez es mucho menor que la del antígeno nativo (sin polimerizar). Todo ello indica una pérdida de alergenicidad del polímero de *Phleum pratense* manosilado en igual o mayor medida que el polímero convencional (no manosilado)

5.3.2 La pérdida de reactividad en prick test con polímeros de *D. farinae* manosilados con glutaraldehído es comparable a la de los polímeros no manosilados.

Se estudiaron 22 pacientes, 14 hombres y 8 mujeres, clínicamente alérgicos frente a *Dermatophagoides farinae*. La media de edad era de 32 años, con un rango de 12 a 82 años. La mediana del tamaño del área de la pápula inducida por el extracto nativo (no modificado) de *Dermatophagoides farinae* fue de 64,2 mm², siendo los valores de los cuartiles del 25 y del 75% de 54,2 y 72,3 mm², respectivamente. Los valores

correspondientes al extracto polimerizado fueron de 32,5 mm² para la mediana y de 1,0 y 45,7 para los cuartiles, respectivamente. Para el extracto polimerizado y manosilado los valores fueron de 24,1 para la mediana y de 16,3 y 33,8 para los cuartiles, respectivamente.

5

Las diferencias entre los tamaños de pápulas, obtenidos con los tres tipos de preparaciones, son muy significativas (test de ANOVA, $P < 0,0001$), siendo también muy significativas (corrección de Bonferroni, $P < 0,0001$) entre las parejas de preparaciones: nativo-polimerizado y nativo-polimerizado manosilado. La diferencia no es significativa ente el extracto polimerizado y el polimerizado manosilado. Las dos prepraciones muestran una disminución *in vivo* muy importante de la alergenicidad en comparación con el alérgeno no polimerizado

10

En las Tablas 4 y 5 se muestran los valores individuales del área de cada una de las pápulas obtenidas con cada una de las preparaciones, además de la estadística descriptiva de estos valores y los datos epidemiológicos de los pacientes (edad y sexo).

15

Tabla 4: Datos epidemiológicos (edad y sexo) de los pacientes y valores del área de cada una de las pápulas inducidas por cada preparación

Pacientes	Sexo	Edad (años)	Histamina (mm ²)	Nativo (mm ²)	Pol (mm ²)	Pol manano (mm ²)
1	V	49	12,13	29,53	1,00	18,19
2	V	44	69,01	118,71	71,61	44,47
3	V	21	62,90	37,03	1,00	1,00
4	M	28	43,35	64,10	18,06	15,72
5	V	33	47,17	81, 21	35,75	25,50
6	V	34	57,54	66,60	29,22	29,76
7	M	36	46,91	88,72	39,06	33,00
8	M	48	34,89	57,84	1,00	1,00
9	V	28	26,36	70,83	48,32	61,81
10	V	37	24,65	54,45	41,31	22,77
11	V	19	66,21	60,86	1,00	1,00
12	M	20	67,72	100,09	77,24	77,67

13	V	18	43,52	81,25	51,32	34,10
14	M	27	49,04	50,75	51,37	31,38
15	V	21	26,56	65,05	1,00	40,48
16	V	38	23,56	18,73	1,00	18,87
17	V	22	55,55	24,52	41,52	19,27
18	V	44	36,73	54,66	47,14	30,84
19	M	27	52,12	1,00	1,00	1,00
20	V	37	81,87	77,56	25,28	40,34
21	M	28	69,38	70,46	20,81	1,00
22	M	35	31,67	118,45	41,12	21,50
TOTAL	14V					
	8M					

Tabla 5: Estadística descriptiva de los datos mostrados en la Tabla 4

Parámetro	Edad (años)	Histamina (mm ²)	Nativo (mm ²)	Pol (mm ²)	Pol manano (mm ²)
Media	31,5	46,8	63,3	29,4	25,9
IC del 95% superior	35,5	54,4	75,7	39,4	34,3
IC del 95% inferior	27,6	39,1	50,8	19,3	17,6
Desviación estándar	9,5	18,4	29,8	24,0	19,9
Mediana	30,5	47,0	64,6	32,5	24,1
Primer cuartil	23,3	32,5	51,7	1,0	16,3
Tercer cuartil	37,0	61,6	80,3	45,7	33,8
Coeficiente de variación	30,1	39,3	47,1	81,8	76,7
Máximo	49,0	81,9	118,7	77,2	77,7
Mínimo	18,0	12,1	1,0	1,0	1,0
n	22	22	22	22	22

- 5 En la Figura 23 se muestran mediante un diagrama de caja, los valores del área de las pápulas obtenidas con cada una de las preparaciones de *D. farinae*. Como se observa, las pruebas cutáneas realizadas con el polímero manosilado son similares al polímero sin

manosilar, y a la vez mucho menor que la del antígeno nativo (sin polimerizar). Todo ello indica una pérdida de alergenidad del polímero de *D. farinae* manosilado en igual medida que el polímero convencional (no manosilado)

5

Ejemplo 6

Los polímeros manosilados mediante glutaraldehído son mejor captados por células dendríticas que los polímeros no manosilados.

Material y Métodos

- 10 Las células dendríticas (DC) se indujeron a partir de monocitos de sangre periférica de donantes sanos, cultivados durante 5 días con GM-CSF e IL-4. Las DC así obtenidas (inmaduras) se expusieron a los polímeros de *Phleum pratense* (con o sin manano conjugado) preparados como se ha descrito anteriormente, para valorar su captación por estas células. Los ensayos de captación se realizaron tras 2 horas de contacto entre la
- 15 DC y el preparado mediante citometría de flujo aprovechando la autofluorescencia del extracto de *Phleum pratense* debido a sus pigmentos. Se valoraron dos parámetros: a) cantidad de alérgeno captado por las DC (índice de captación); b) porcentaje de células con capacidad de internalización.

20 Resultados

- Como se puede observar en la Figura 24, la cantidad de polímero manosilado de *Phleum pratense* captado por las DC es más de 7 veces superior al captado por el polímero convencional (no manosilado) según el MFI (índice de fluorescencia media) que refleja el índice de captación. En la parte superior izquierda de la misma figura se representa el
- 25 número de células con capacidad de captar ambos preparados (polímero de *Phleum pratense* manosilado y sin manosilar). Como se puede apreciar, el porcentaje de células positivas con una mayor fluorescencia corresponden a aquellas incubadas con el polímero manosilado. La conclusión de estos experimentos es que el polímero manosilado es captado por un mayor número de DC y que éstas lo captan, además, en
- 30 mayor cantidad.

Ejemplo 7

Los polímeros manosilados con glutaraldehído inducen una mayor producción de IL-10 e IL-6 por células dendríticas humanas en comparación con los polímeros no manosilados.

5

7.1 Ensayos de producción de citocinas por células dendríticas

Material y Métodos

Monocitos aislados de sangre periférica de donantes sanos fueron diferenciados a células dendríticas (DC) con IL-4 y GM-CSF. Estas DC (inmaduras) fueron incubadas con alérgenos (*Phleum pratense*) polimerizados manosilados (PM) y sin manosilar (P) a 50 µg/mL. Se determinó la concentración de citocinas en los sobrenadantes de cultivo de estas células a las 24 horas tras su estimulación con los diferentes preparados. La tecnología empleada para cuantificar las citocinas fue Multiplex para citometría de flujo.

15

Resultados

En la Figura 25 se muestra la media de 3 experimentos independientes.

Como se puede observar, las células dendríticas (DC) incubadas con el polímero manosilado de *Phleum pratense* producen una mayor cantidad de IL-6 e IL-10 que el alérgeno polimerizado sin manosilar o que el alérgeno nativo (sin polimerizar). Por el contrario, los tres preparados inducen una producción de IL-8 similar. Estos resultados indican que las DC mieloides humanas responden de forma diferencial al polímero manosilado. El hecho de que se observe un aumento de IL-10 con el polímero manosilado es muy positivo para las propiedades inmunomoduladoras que se persiguen con este tipo de preparados.

Ejemplo 8

Los polímeros manosilados con glutaraldehído son comparables con los polímeros no manosilados en cuanto a su capacidad de maduración de células dendríticas humanas

8.1.- Ensayos de maduración de células dendríticas

Material y Métodos

Las células dendríticas (DC) se indujeron a partir de monocitos de sangre periférica (buffy coat) de donantes sanos, cultivados durante 5 días con GM-CSF e IL-4. Las DC así
 5 obtenidas (inmaduras) se expusieron a los distintos preparados alergénicos (nativo, polímero y polímero-manano) para valorar la maduración de las DC en respuesta a los mismos. El ensayo de maduración se analizó a las 48 horas de cultivo mediante citometría de flujo, valorando la expresión de moléculas asociadas a la maduración de DC (HLA-II (DR), CD80, CD83 y CD86).

10

Procedimiento de marcaje de células: se usaron 5×10^5 células por marcaje. Las células se resuspendieron en PBS y se les añadió 1 µg de anticuerpo directo (1:100) (conjugado con fluorocromo) o indirecto (no conjugado). Se incubaron 20 minutos a 4 °C en oscuridad y seguidamente se lavaron con PBS. En el caso del anticuerpo indirecto se
 15 añadió 1 µg (dilución 1:100) de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con el fluorocromo de interés. Tras 2 lavados con PBS las células se resuspendieron en un volumen de 300-400 µL de PBS y finalmente se procedió al análisis por citometría de flujo (FC 500 Beckman Coultek).

20 Resultados

8.1.1 Maduración de las células dendríticas (DC) derivadas de monocitos humanos por alérgenos de *Phleum pratense* en función de su estado de polimerización y/ manosilación.

25

Como se observa en la Figura 26, los alérgenos polimerizados inducen una maduración de las DC mieloides inmaduras tras ser incubadas con ellos. El grado de maduración se valora según la expresión en la superficie de las DC de los marcadores reflejados en la figura. Todos los marcadores asociados a maduración se incrementan en las DC
 30 incubadas con los alérgenos polimerizados frente al alérgeno sin polimerizar, no existiendo diferencias significativas dependiendo de si el polímero está o no manosilado. Estos resultados indican que desde el punto de vista de maduración de las DC, el polímero manosilado de *Phleum pratense* se comporta de forma similar al polímero

convencional (no polimerizado), y por tanto con un índice de maduración superior al alérgeno convencional (no polimerizado)

8.1.2 Maduración de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos por alérgenos de *D. farinae* en función de su estado de polimerización y/ manosiación.

Como se observa en la Figura 27, los alérgenos polimerizados inducen una maduración de las DC mieloides inmaduras tras ser incubadas con ellos. El grado de maduración se valora según la expresión en la superficie de las DC de los marcadores reflejados en la figura. Todos los marcadores asociados a maduración se incrementan en las DC incubadas con los alérgenos polimerizados frente al alérgeno sin polimerizar, no existiendo diferencias significativas dependiendo de si el polímero está o no manosiado. Estos resultados indican que desde el punto de vista de maduración de las DC, el polímero manosiado de *D. farinae* se comporta de forma similar al polímero convencional (no polimerizado), y por tanto con un índice de maduración superior al alérgeno convencional (no polimerizado)

Ejemplo 9

Los polímeros manosilados con glutaraldehído mejoran la inducción de células T productoras de INFgamma e IL-10 en ensayos de inmunización ex vivo en comparación con los polímeros no manosilados

Material y Métodos

Ensayos de inmunización ex vivo con células humanas de sangre periférica

Protocolo de inmunización

Los linfocitos T efectores específicos de alérgenos se obtuvieron a partir de PBMC de individuos sanos tras tres rondas de estimulación con DC maduras autólogas cargadas con los extractos alérgénicos correspondientes. Brevemente, las iDCs (10^6 /mL) se incubaron durante 8 horas en medio DMEM completo con los extractos correspondientes (100 mg/mL) y a continuación se maduraron incubando con peptidoglicano (1 μ l/mL). Las células dendríticas maduras (mDC), previamente lavadas, se volvieron a incubar durante 6 horas (10^6 células en 1 mL) con los extractos correspondientes en medio DMEM

completo y seguidamente se irradiaron (3000 rad). Las mDC irradiadas y cargadas con los alérgenos se distribuyeron a continuación en placas de 48 pocillos (10^6 /mL) y se co-cultivaron junto con las PBMCs (10^7 células/ml) en presencia de IL-7 ($1 \mu\text{l/mL}$). Los cultivos se suplementaron con IL-2 (10 U/mL) 5 días después de la primera estimulación.

- 5 Este mismo proceso de estimulación y expansión de las PBMCs con DC cargadas con los extractos de alérgenos se repitió en tres ocasiones. La producción alérgeno específica de IFN γ , IL-10 e IL-4 de las células se midió mediante el ensayo de ELISPOT.

Resultados

10

9.1.1 Los polímeros de *Phleum pratense* manosilados con glutaraldehído mejoran la respuesta de IFN- γ e IL-10 de los polímeros no manosilados sin incrementar la respuesta de IL-4.

- 15 Como se observa en la Figura 28 el número de células productoras de IFN- γ e IL-10 se incrementa en los cultivos inmunizados con el alérgeno polimerizado y manosilado en respuesta específica, en comparación con aquellos cultivos inmunizados en el polímero convencional (no manosilado). Este incremento no se acompaña de un mayor número de células productoras de IL-4, lo que indica que no ha habido una polarización hacia un fenotipo TH2. El hecho de que se observe un aumento de IFN- γ e IL-10, sin aumento de

20 IL-4, con el polímero manosilado es muy positivo para las propiedades inmunomoduladoras que se persiguen con este tipo de preparados.

9.1.2 Los alérgenos de *D. farinae* manosilados con glutaraldehído mejoran la respuesta de IFN- γ e IL-10 de los polímeros no manosilados sin incrementar la respuesta de IL-4.

25

- Como se observa en la Figura 29 el número de células productoras de IFN- γ e IL-10 se incrementa en los cultivos inmunizados con el alérgeno polimerizado y manosilado en respuesta específica, en comparación con aquellos cultivos inmunizados en el polímero convencional (no manosilado). Este incremento no se acompaña de un mayor número de

30 células productoras de IL-4, lo que indica que no ha habido una polarización hacia un fenotipo TH2. El hecho de que se observe un aumento de IFN- γ e IL-10, sin aumento de IL-4, con el polímero manosilado es muy positivo para las propiedades inmunomoduladoras que se persiguen con este tipo de preparados.

Ejemplo 10

Los polímeros manosilados con glutaraldehído mejoran la respuesta inmune *in vivo* en comparación con los polímeros no manosilados.

5 Ensayos de inmunización *in vivo* en ratones

Material y Métodos

Se realizaron inmunizaciones con alérgenos de *Phleum pratense* y *D. farinae* con polímeros manosilados y no manosilados para valorar su capacidad inmunogénica *in vivo*. Las inmunizaciones fueron hechas en ratones Balb/c con el protocolo mostrado en la Figura 30.

La respuesta a la inmunización fue valorada en bazo realizando pruebas de linfoproliferación específica mediante marcaje con CFSE en respuesta al alérgeno en su forma nativa. Como control positivo de proliferación se utilizó fitohemaglutinina (PHA). La proliferación se determinó a día 6 y día 7 de cultivo. También se realizó la cuantificación de citocinas en el sobrenadante de los cultivos tras 48 horas de estimulación empleando la tecnología Multiplex para citometría de flujo (Figura 31). Como control positivo se utilizó fitohemaglutinina (PHA). También se valoraron los niveles de IgE específica (*P. pratense* o *D. farinae*) y los niveles de IgG1 (como marcador de una respuesta TH2) y de IgG2a (marcador de respuesta TH1) mediante ELISA.

Resultados

25 10.1 La inmunización con polímeros manosilados de *Phleum pratense* producen mayor respuesta proliferativa al estímulo antigénico que con los polímeros no manosilados.

Como se observa en la Figura 32 el porcentaje de proliferación, que refleja el número de linfocitos T que responden al antígeno, es significativamente mayor cuando las células respondedoras se toman del bazo de ratones inmunizados con el alérgeno polimerizado y manosilado en comparación con las células tomadas del bazo de ratones inmunizados con el alérgeno polimerizado convencional (no polimerizado). Ello indica que las propiedades inmunogénicas del alérgeno de *Phleum pratense* polimerizado y manosilado son significativamente superiores al polímero sin manosilar.

10.2 La inmunización con polímeros manosilados de *D. farinae* producen mayor respuesta proliferativa al estímulo antigénico que con los polímeros no manosilados.

- 5 Como se observa en la Figura 33 el porcentaje de proliferación, que refleja el número de linfocitos T que responden al antígeno, es significativamente mayor cuando las células respondedoras se toman del bazo de ratones inmunizados con el alérgeno polimerizado y manosilado en comparación con las células tomadas del bazo de ratones inmunizados con el alérgeno polimerizado convencional (no polimerizado). Ello indica que las propiedades inmunogénicas del alérgeno de *D. farinae* polimerizado y manosilado son
10 significativamente superiores al polímero sin manosilar.

- 10.3 Los esplenocitos de ratones inmunizados con polímeros de *Phleum pratense*
15 manosilados modifican el patrón de citocinas frente a los polímeros no manosilados.

En la Figura 34 se representa la producción de las diferentes citocinas obtenidas en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos, estimulados con alérgeno de *P. pratense*, procedentes de ratones inmunizados con alérgeno polimerizado manosilado y sin
20 manosilar. Como se observa, el patrón de citocinas producidas difiere para muchas de ellas según la procedencia de los esplenocitos. Las variaciones de aquellas producidas por células linfoides se muestran en forma cuantitativa en la Tabla 6.

- 10.4 Los linfocitos de ratones inmunizados con polímeros de *Phleum* manosilados
25 incrementan la producción de IL-10 en comparación con la producida con polímeros no manosilados.

Tabla 6. Producción relativa de citocinas *in vitro* por linfocitos de ratones inmunizados con polímeros de *Phleum*

30

Citocina	Variación (nº veces) del Phleum-Manano vs. Phleum
IL-13	0,6
IL-22	1,2

IL-2	4,0
IL-5	5,7
IL-21	2,8
IL-10	361,8**
IL-27	0,7
IFN- γ	1,7
IL-4	1,1
IL-17	1,0
TNF- α	3,1

**Aumentos relativos superiores a 100 veces sobre los valores obtenidos en ratones inmunizados con polímeros no manosilados

- 5 Como se puede observar en la Tabla 6, la mayor variación que se obtiene con respecto a la producción de citocinas de origen linfoide que se muestran en la Figura 34 es la IL-10, que aumenta más de 300 veces en los ratones inmunizados con el alérgeno polimerizado y manosilado con respecto a la producción que se obtiene en los inmunizados con el polímero sin manosilar. Este aumento en IL-10 es muy positivo para las propiedades
- 10 inmunomoduladoras que se persiguen con este tipo de preparados.

10.5 Los esplenocitos de ratones inmunizados con polímeros de *D. farinae* manosilados modifican el patrón de citocinas frente a los polímeros no manosilados.

- 15 En la Figura 35 se representa la producción de las diferentes citocinas obtenidas en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos, estimulados con alérgeno de *D. farinae*, procedentes de ratones inmunizados con alérgeno polimerizado manosilado y sin manosilar. Como se observa, el patrón de citocinas producidas difiere para muchas de ellas según la procedencia de los esplenocitos. Las variaciones de aquellas producidas
- 20 por células linfoides se muestran en forma cuantitativa en la Tabla 7.

10.6 Los linfocitos de ratones inmunizados con polímeros de *D. farinae* manosilados incrementan la producción de IL-10, IFN γ e IL-2 en respuesta al estímulo antigénico en comparación con la producida con polímeros no manosilados

Tabla 7. Producción relativa de citocinas *in vitro* por linfocitos de ratones inmunizados con polímeros de *D. farinae*

Citocina	Variación (nº veces) del Phleum-Manano vs. Phleum
IL-13	0,8
IL-22	0,2
IL-2	328,1**
IL-5	1,3
IL-21	61,9*
IL-10	147,1**
IL-27	1,0
IFN- γ	128,7**
IL-4	1,0
IL-17	5,7
TNF- α	1,7

**Aumentos relativos superiores a 100 veces sobre los valores obtenidos en ratones
inmunizados con Polímeros sin Manano

Como se puede observar en la Tabla 7, las mayores variaciones que se obtienen con respecto a la producción de citocinas de origen linfoide que se muestran en la Figura 35 son la IL-2, IL-10 e IFN- γ que aumentan más de 300, 145 y 125 veces en los ratones inmunizados con el alérgeno polimerizado y manosilado con respecto a la producción que se obtiene en los inmunizados con el polímero sin manosilar. Estos aumentos, sobretudo en IL-10 e IFN- γ , son muy positivos para las propiedades inmunomoduladoras que se persiguen con este tipo de preparados.

10.7 La respuesta de anticuerpos específicos en ratones inmunizados con altas dosis de polímeros de *Phleum pratense* polimerizados y manosilados favorece el ratio IgG/IgE frente a los polímeros no manosilados.

Como se observa en la Figura 36, la respuesta de anticuerpos IgG específicos frente al alérgeno de *Phleum pratense* es superior en el suero de los ratones inmunizados con el

alérgeno polimerizado y manosilado que en el alérgeno polimerizado convencional (sin manosilar). Por el contrario, la respuesta de anticuerpos IgE específicos es inferior al del polímero convencional. Ello indica que el ratio IgG/IgE es mayor cuando las inmunizaciones se hacen con el alérgeno de *Phleum pratense* polimerizado y
 5 manosilado. Un aumento en este ratio es muy positivo para las propiedades inmunomoduladoras que se persiguen con este tipo de preparados.

10.8 La respuesta de anticuerpos específicos en ratones inmunizados con altas dosis de polímeros de *D. farinae* manosilados favorece el ratio IgG/IgE frente a los polímeros no
 10 manosilados

Como se observa en la Figura 37, la respuesta de anticuerpos IgG específicos frente al alérgeno de *D. farinae* es superior en el suero de los ratones inmunizados con el alérgeno polimerizado y manosilado que en el alérgeno polimerizado convencional (sin manosilar).
 15 Por el contrario, la respuesta de anticuerpos IgE específicos es inferior al del polímero convencional. Ello indica que el ratio IgG/IgE es mayor cuando las inmunizaciones se hacen con el alérgeno de *D. farinae* polimerizado y manosilado. Un aumento en este ratio es muy positivo para las propiedades inmunomoduladoras que se persiguen con este tipo de preparados.

REIVINDICACIONES

1. Un complejo inmunogénico que comprende un antígeno polimerizado, manano y un dialdehído.
5
2. Complejo inmunogénico según la reivindicación 1, en el que el manano procede de un vegetal, de un hongo o de una levadura.
3. Complejo inmunogénico según la reivindicación 2, en el que la levadura es seleccionada del grupo que consiste en *Saccharomyces* ssp., *Pichia* ssp. y *Cándida* ssp.
10
4. Complejo inmunogénico según la reivindicación 3, en el que *Saccharomyces* ssp. es *S. cerevisiae*.
15
5. Complejo inmunogénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el manano comprende grupos amino.
6. Complejo inmunogénico según la reivindicación 5, en el que los grupos amino se encuentran en el aminoácido lisina.
20
7. Complejo inmunogénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el antígeno polimerizado comprende al menos dos antígenos iguales o distintos entre sí.
25
8. Complejo inmunogénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el dialdehído se selecciona del grupo que consiste en glutaraldehído, glioxal, malonaldehído, succinaldehído y adipaldehído.
9. Complejo inmunogénico según la reivindicación 8, en el que el dialdehído es glutaraldehído.
30
10. Complejo inmunogénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el antígeno polimerizado está unido al manano a través del dialdehído.

11. Complejo inmunogénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el antígeno está unido al manano mediante atrapamiento físico por el antígeno polimerizado.
- 5 12. Complejo inmunogénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el antígeno es un alérgeno.
13. Complejo inmunogénico según la reivindicación 12, en el que el alérgeno se
10 selecciona del grupo que consiste en pólenes, ácaros, epitelios, esporas de hongos y combinaciones de ellos.
14. Complejo inmunogénico según la reivindicación 13, en el que el polen procede de la especie *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata*, *Cynodon dactylon*, *Lolium perenne*,
15 *Trisetum spp.*, *Olea europaea*, *Cuppressus spp.*, *Ambrosia spp.*, *Betula spp.*, *Platanus spp.*, *Corylus avellana* o *Alnus glutinosa*.
15. Complejo inmunogénico según la reivindicación 13 ó 14, en el que el ácaro pertenece a la especie *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* o *Blomia tropicalis*.
20
16. Complejo inmunogénico según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el epitelio pertenece a la especie *Felis domesticus* o *Canis familiaris*.
- 25 17. Complejo inmunogénico según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que la espora del hongo pertenece a la especie *Alternaria alternata* o *Alternaria tenuis*.
18. Complejo inmunogénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la proporción antígeno:manano es de entre 1:10 y 1:0,1, preferiblemente 1:0,3 ó 1:0,5.
30
19. Método para obtener un complejo inmunogénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que comprende (i) preparar una disolución que comprende un antígeno y manano, y (ii) añadir un dialdehído a dicha disolución.

20. Método según la reivindicación 19, que además comprende una etapa (iii) que comprende la adición de un agente neutralizante, preferiblemente glicina, para detener la reacción de polimerización.
- 5 21. Método según la reivindicación 19 ó 20, que además comprende una etapa (iv) de aislamiento del complejo inmunogénico.
22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que el manano procede de un vegetal, de un hongo o de una levadura.
- 10 23. Método según la reivindicación 22, en el que la levadura se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces* ssp., *Pichia* ssp. y *Cándida* ssp.
24. Método según la reivindicación 23, en el que *Saccharomyces* ssp. es *S. cerevisiae*.
- 15 25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, en el que el manano comprende grupos amino.
26. Método según la reivindicación 25, en el que los grupos amino se encuentran en el aminoácido lisina.
- 20 27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 26, en el que el antígeno polimerizado comprende al menos dos antígenos iguales o distintos entre sí.
- 25 28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 27, en el que el dialdehído se selecciona del grupo que consiste en glutaraldehído, glioxal, malonaldehído, succinaldehído y adipaldehído.
29. Método según la reivindicación 28, en el que el dialdehído es glutaraldehído.
- 30 30. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 29, en el que el antígeno es un alérgeno.

31. Método según la reivindicación 30, en el que el alérgeno se selecciona del grupo que consiste en pólenes, ácaros, epitelios, esporas de hongos y combinaciones de ellos.
- 5 32. Método según la reivindicación 31, en el que el polen procede de la especie *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata*, *Cynodon dactylon*, *Lolium perenne*, *Trisetum spp.*, *Olea europaea*, *Cuppressus spp.*, *Ambrosia spp.*, *Betula spp.*, *Platanus spp.*, *Corylus avellana* o *Alnus glutinosa*.
- 10 33. Método según la reivindicación 31 ó 32, en el que el ácaro pertenece a la especie *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* o *Blomia tropicalis*.
34. Método según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33, en el que el epitelio pertenece a la especie *Felis domesticus* o *Canis familiaris*.
- 15 35. Método según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, la espora del hongo pertenece a la especie *Alternaria alternata* o *Alternaria tenuis*.
36. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 35, en el que la proporción antígeno:manano es de entre 1:10 y 1:0,15, preferiblemente, 1:0,3 ó 1:0,5.
- 20 37. Composición farmacéutica que comprende un complejo inmunogénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 38. Composición farmacéutica según la reivindicación 37, que comprende, además, un adyuvante.
39. Composición farmacéutica según la reivindicación 38, en el que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de aluminio, fosfato cálcico, tirosina, 30 monofosforil lípido A y chitosan.

40. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39, que comprende, además, una sustancia activa adicional.
- 5 41. Composición según la reivindicación 40, en la que dicha sustancia activa adicional comprende un agente antihistamínico, una hormona esteroidea, un antagonista de receptores de histamina, leucotrienos o mezclas de los mismos.
42. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 41, en el que la composición está formulada en micropartículas, nanopartículas o liposomas.
- 10 43. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 42, en el que la composición está en una forma farmacéutica de administración sólida, en una forma farmacéutica de administración líquida, o en una forma farmacéutica de administración que comprende un sistema disperso.
- 15 44. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 43, en el que la composición farmacéutica está en una forma farmacéutica adecuada para su administración por vía parenteral, intranasal, perioral, sublingual, oral, transdérmica o tópica.
- 20 45. Uso de un complejo inmunogénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en la elaboración de una composición farmacéutica.
46. Uso según la reivindicación 45, para estimular y/o inducir la respuesta inmune en un
- 25 sujeto.
47. Uso según la reivindicación 45, como vacuna.
48. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 45 a 47, para el tratamiento de una
- 30 enfermedad infecciosa, una neoplasia o de la alergia en un sujeto.

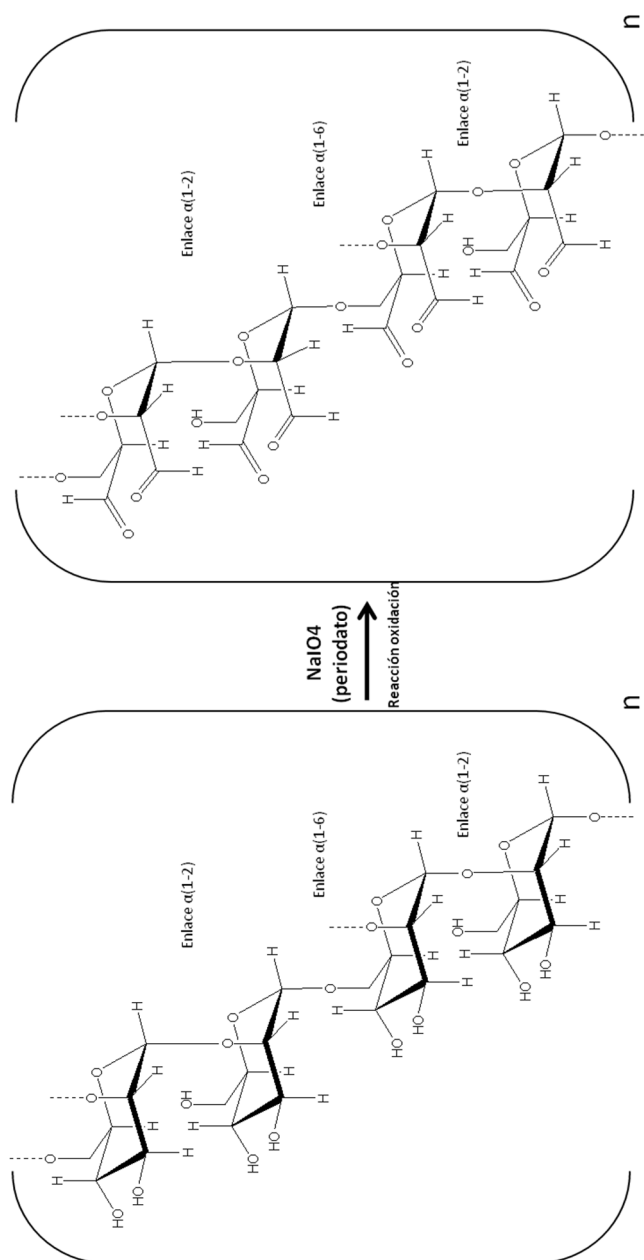


FIG. 1

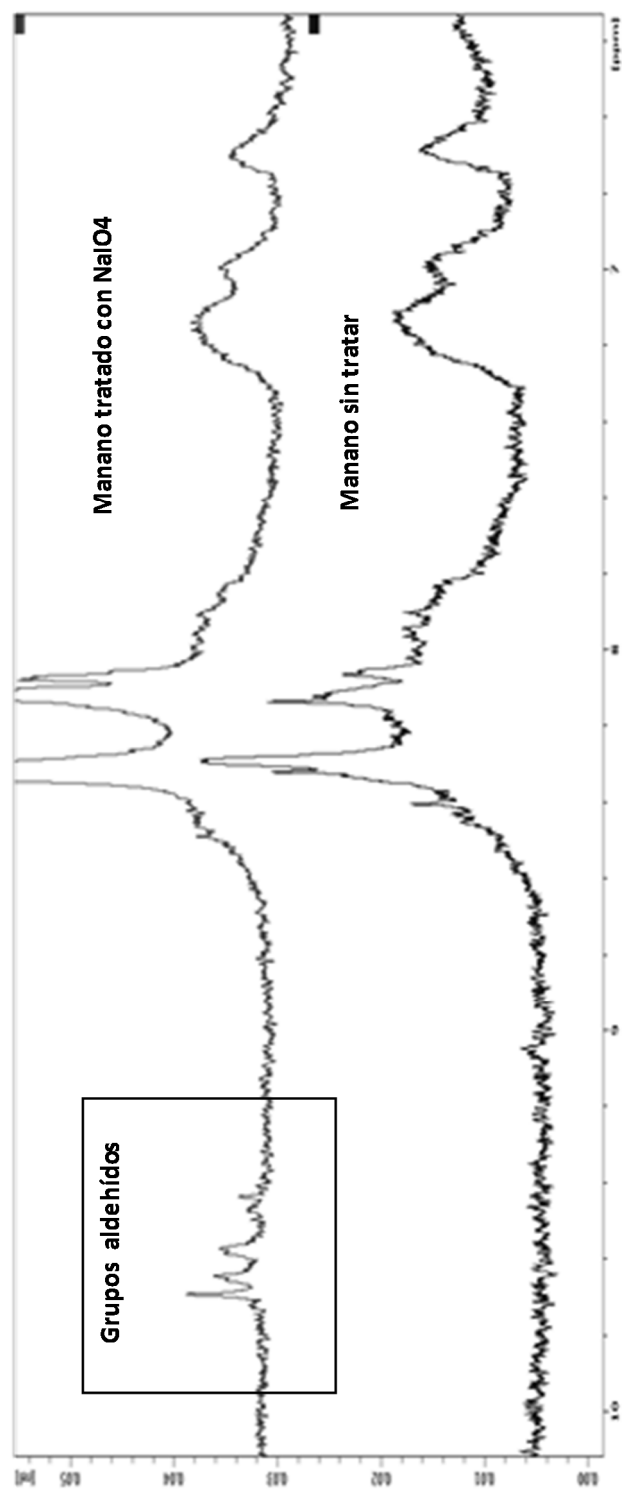


FIG. 2

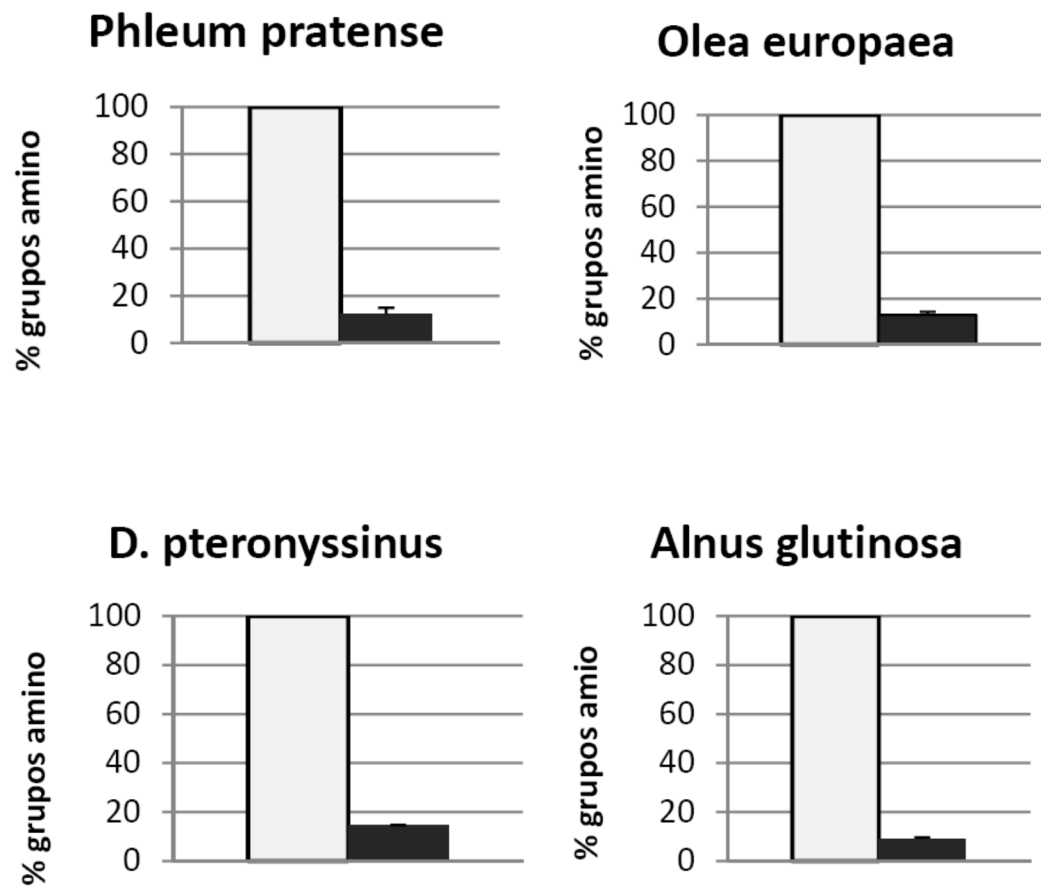


FIG. 3



FIG.4

Análisis de aminoácidos

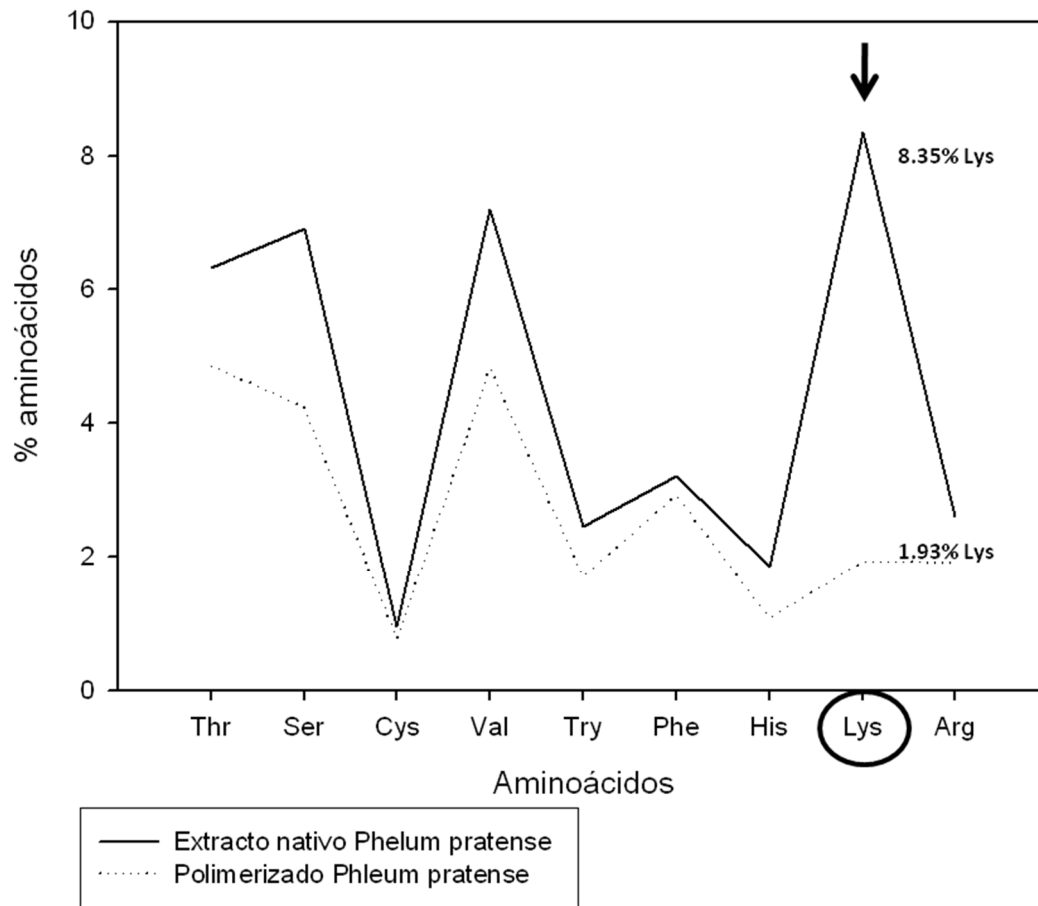


FIG. 5

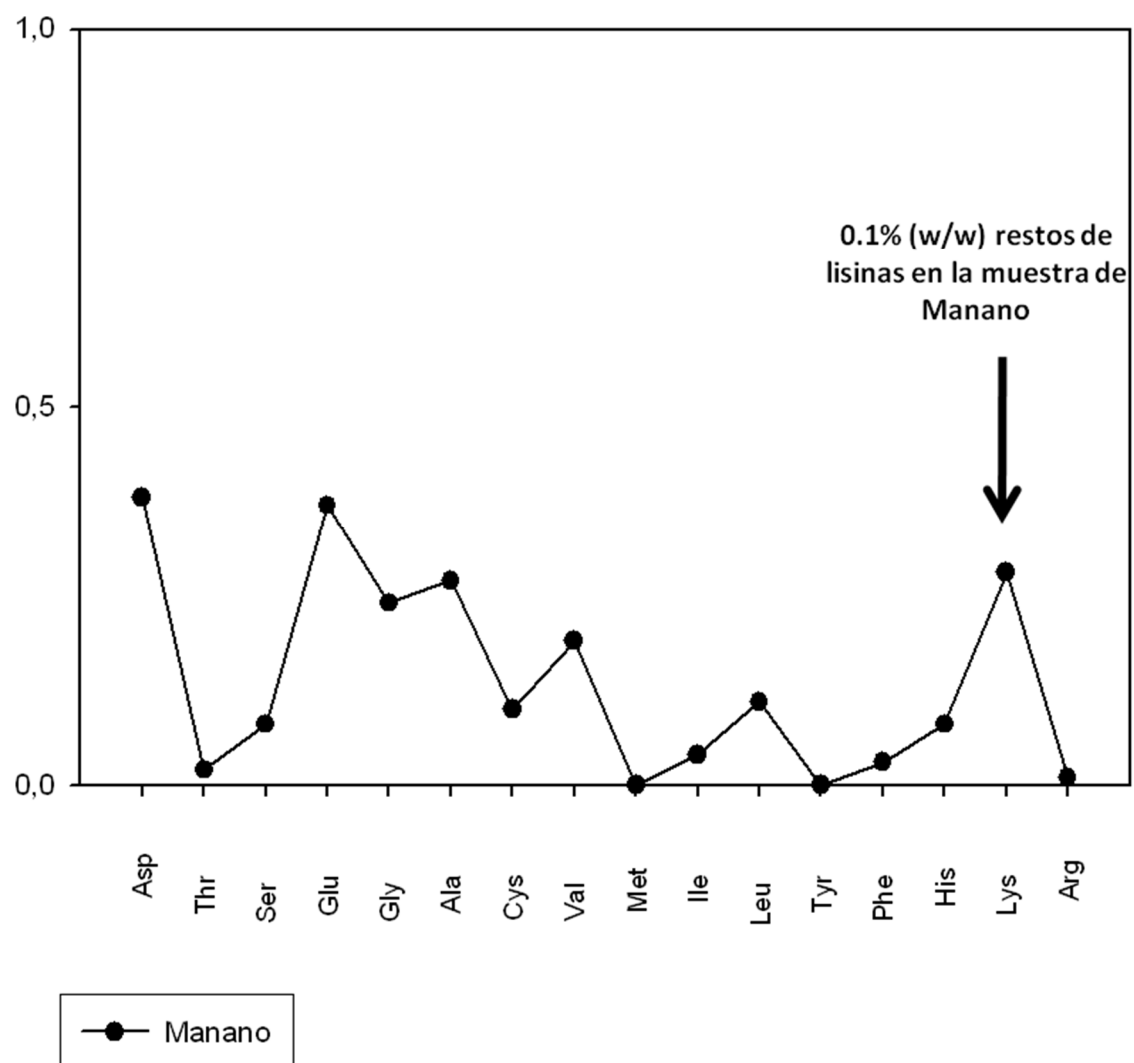


FIG. 6

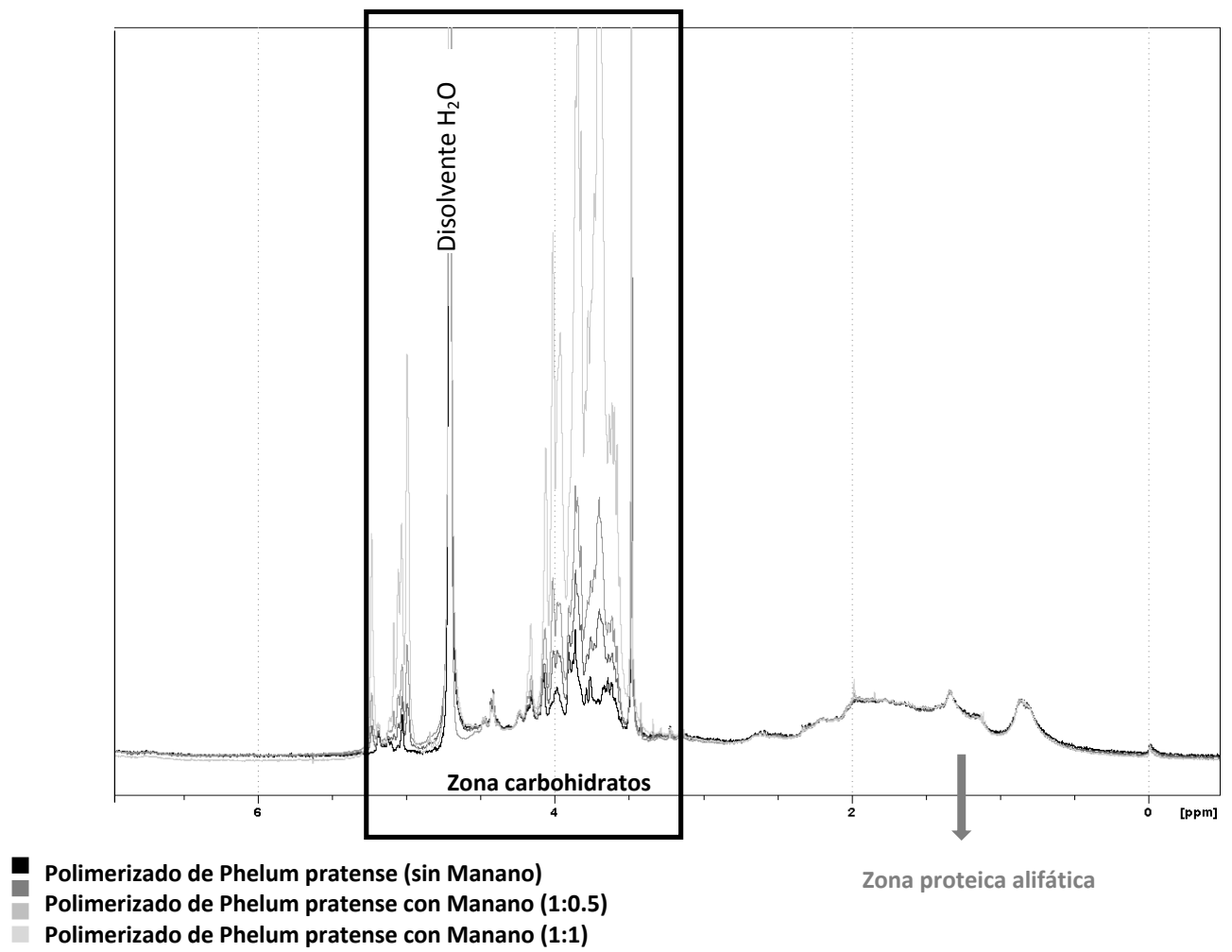


FIG. 7

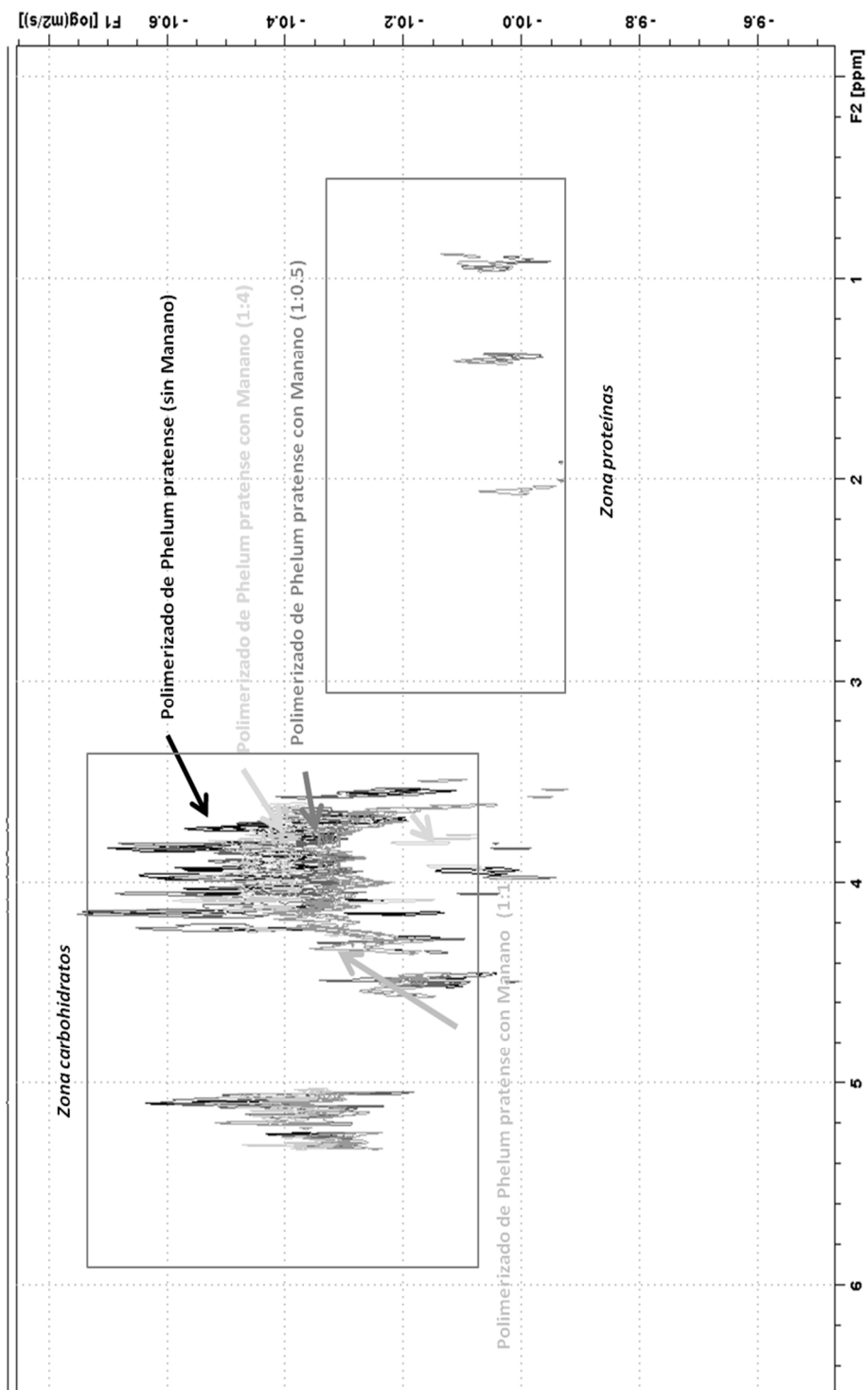


FIG. 8

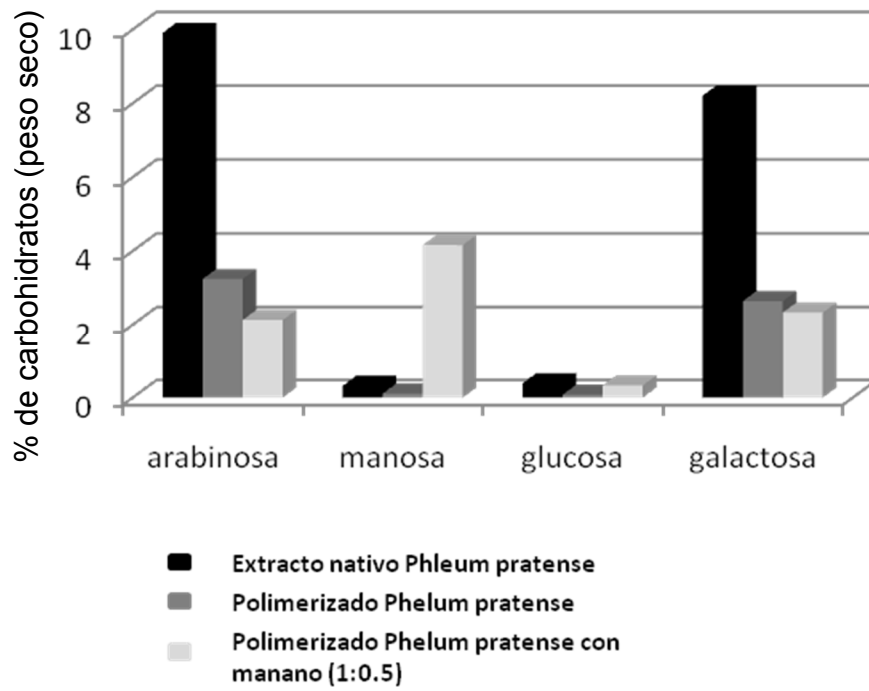


FIG. 9

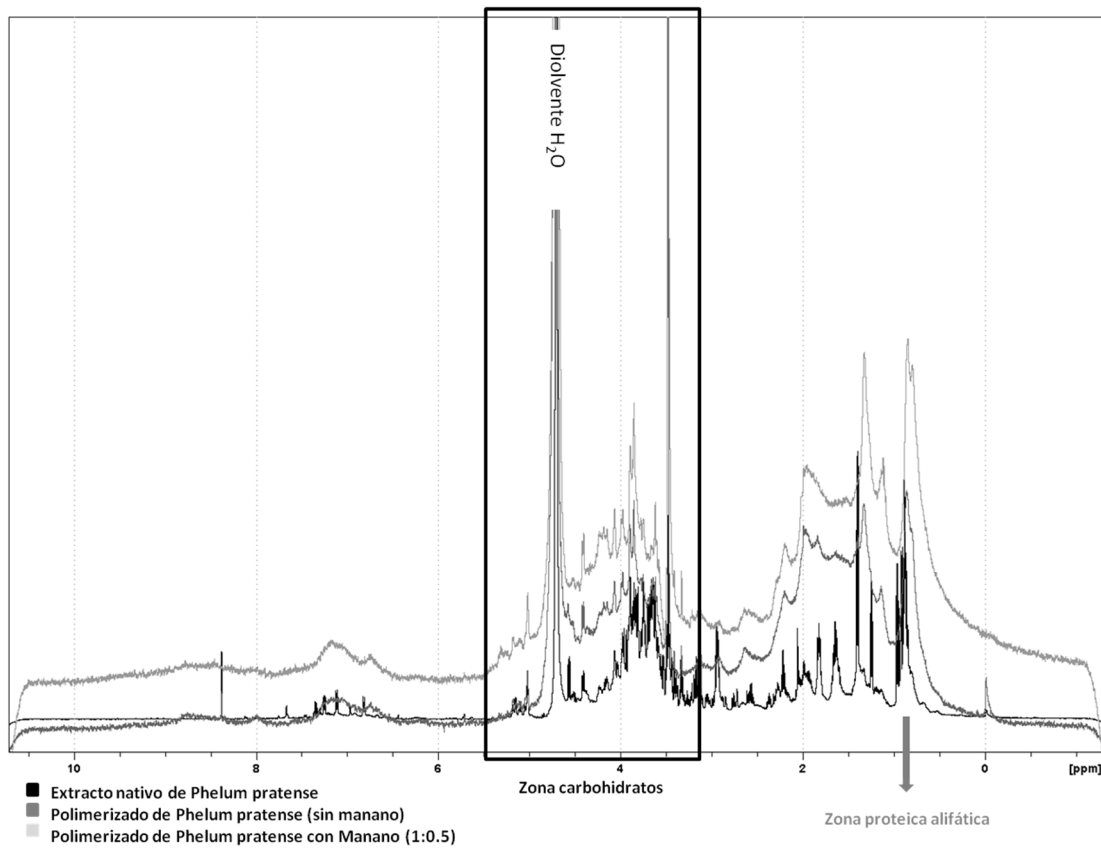


FIG. 10

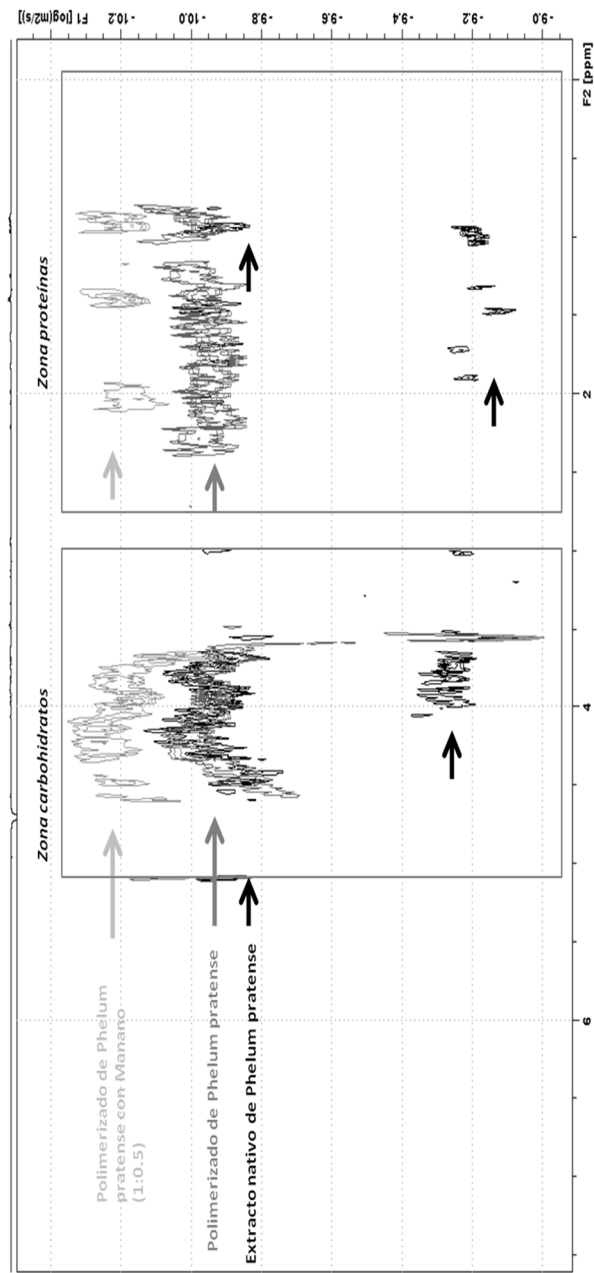


FIG. 11

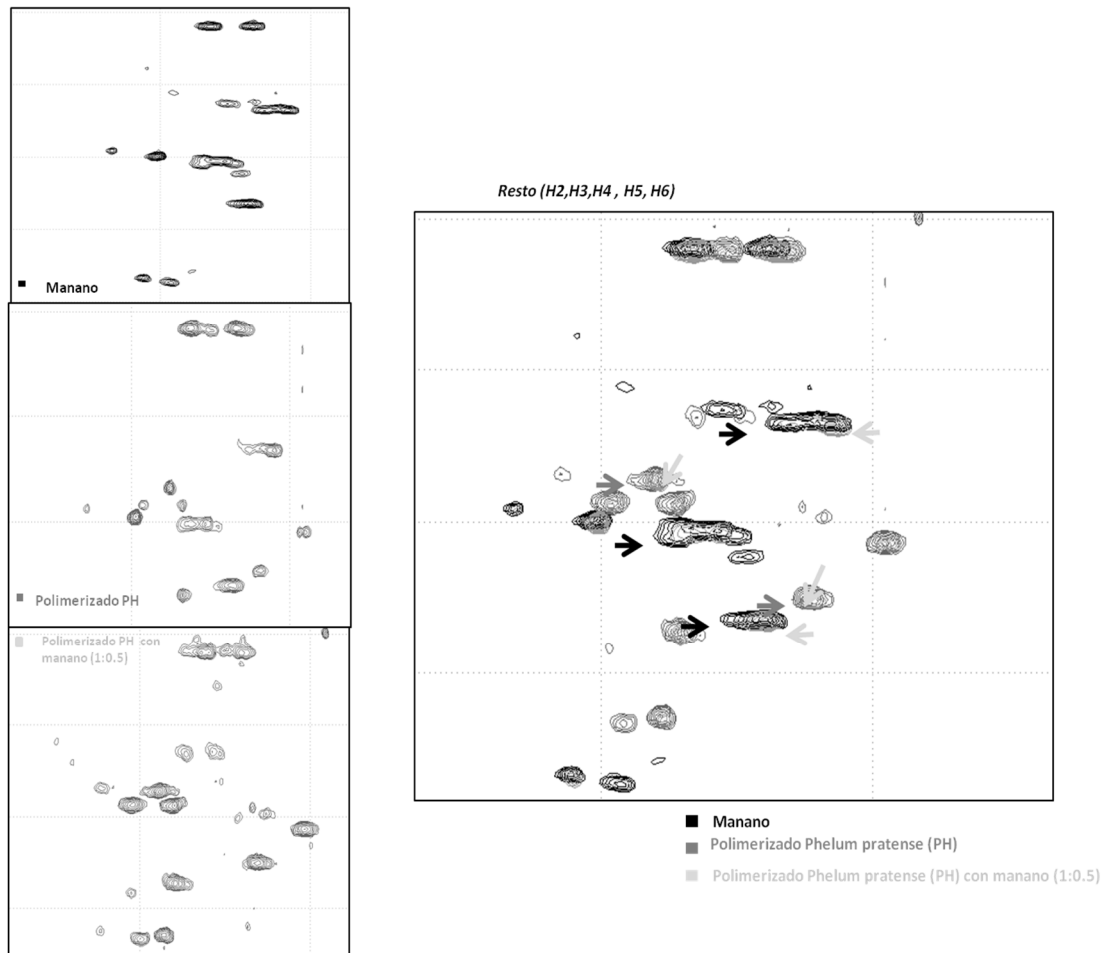


FIG. 12

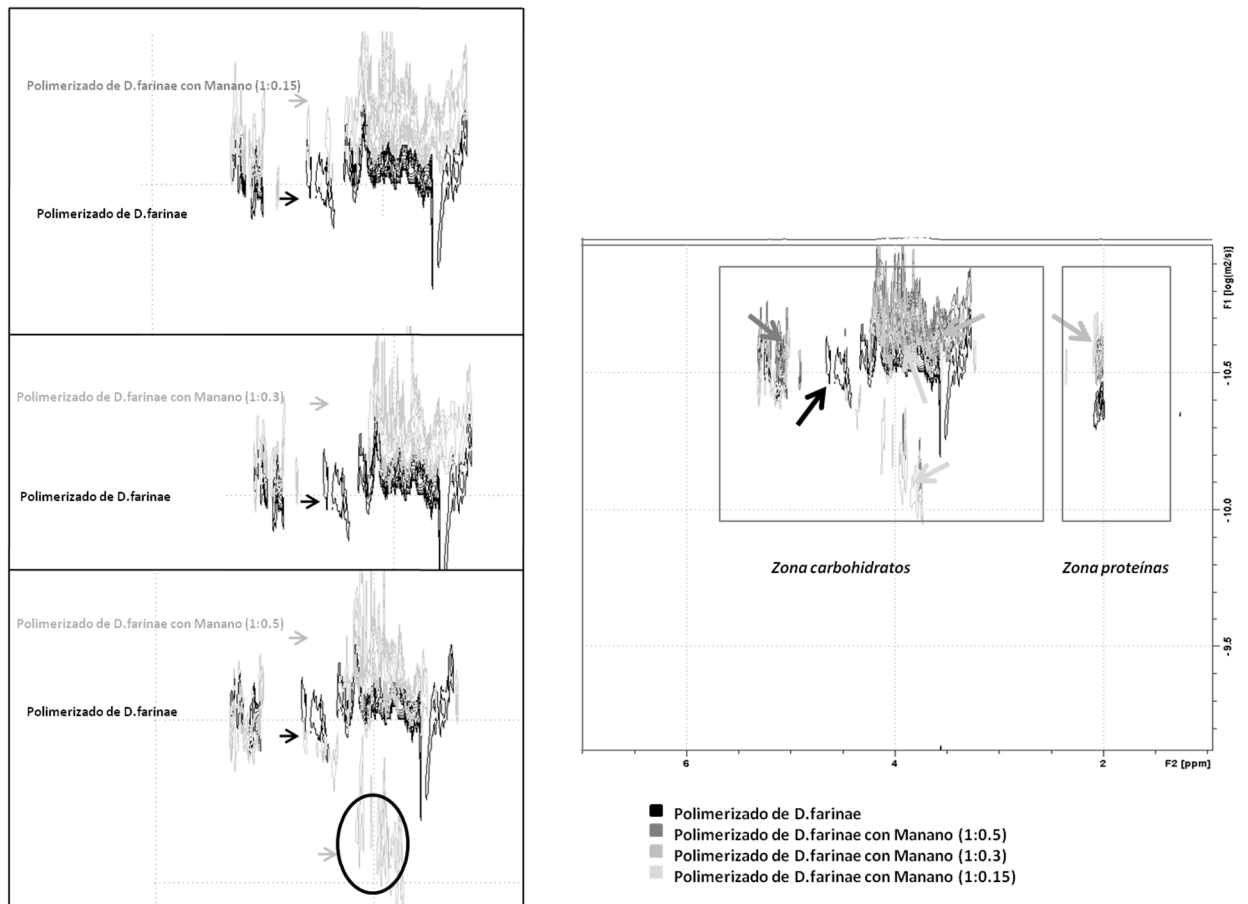


FIG. 13

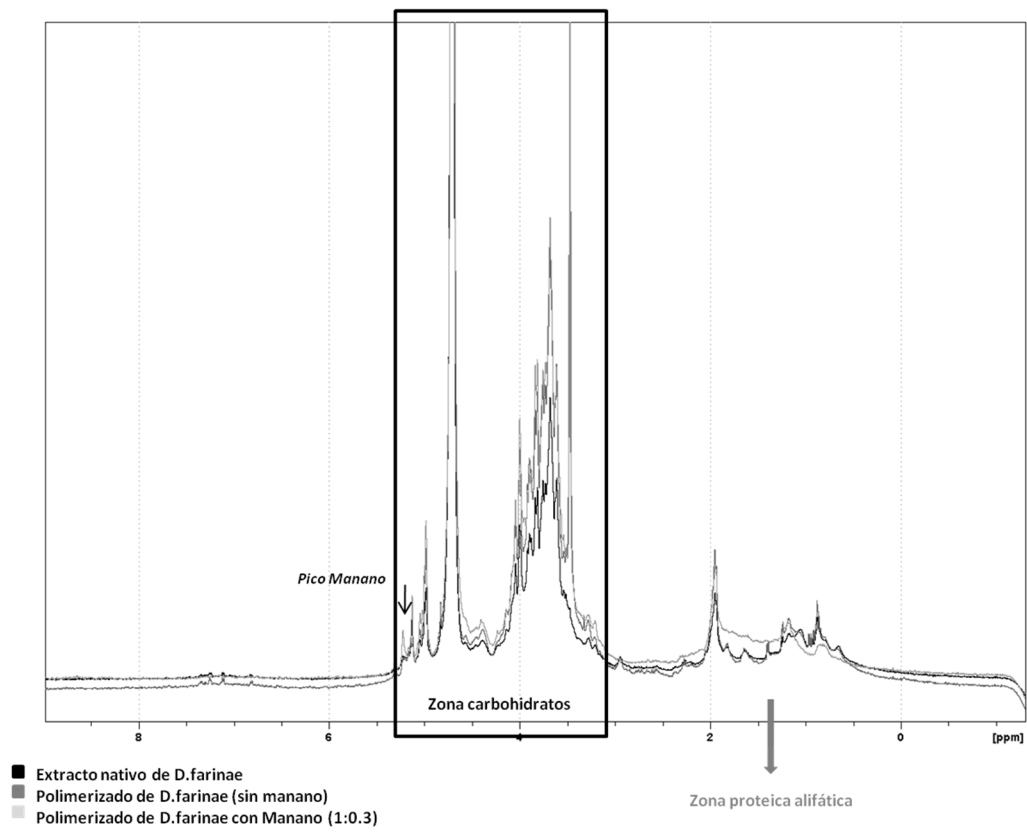


FIG. 14

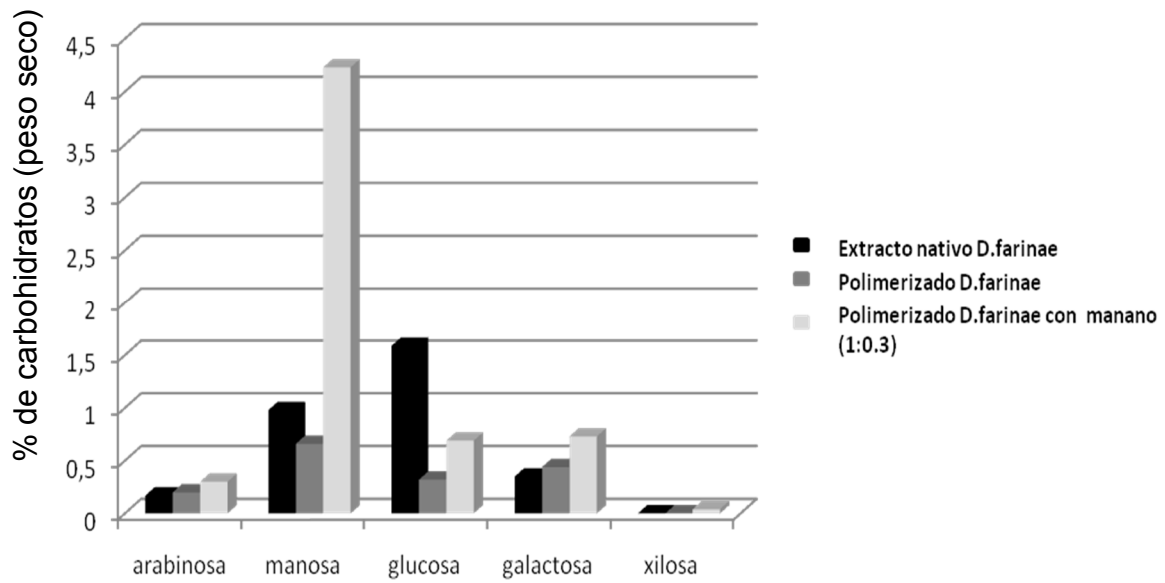


FIG. 15

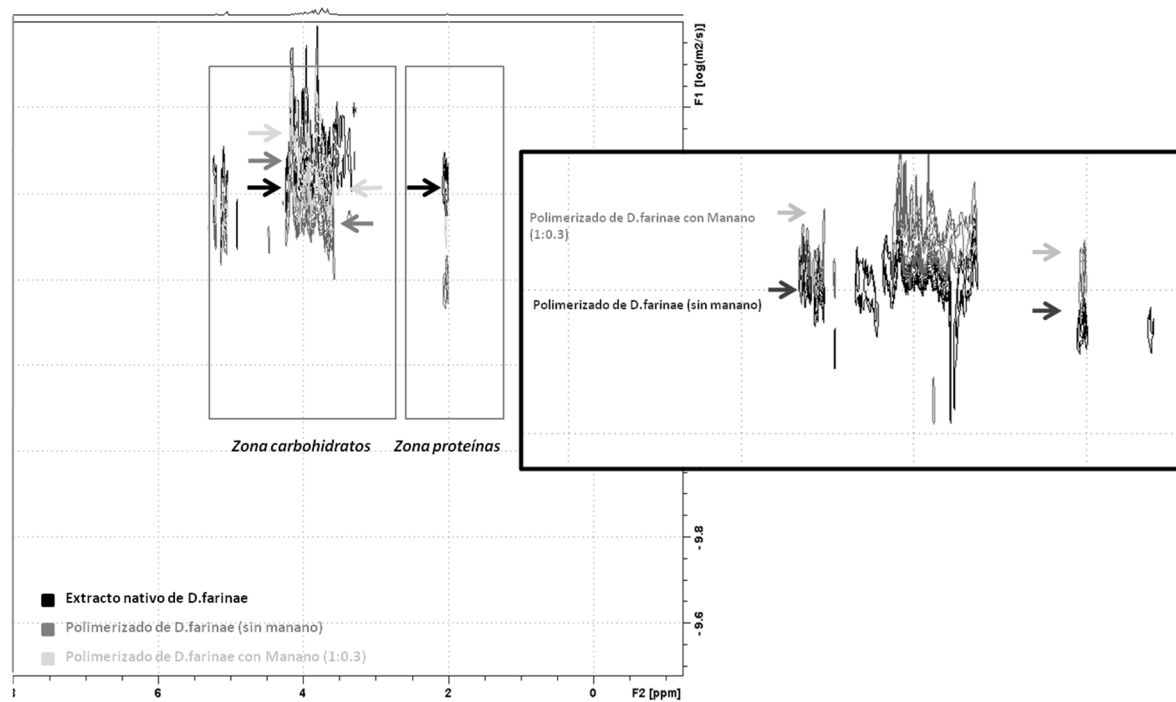


FIG. 16

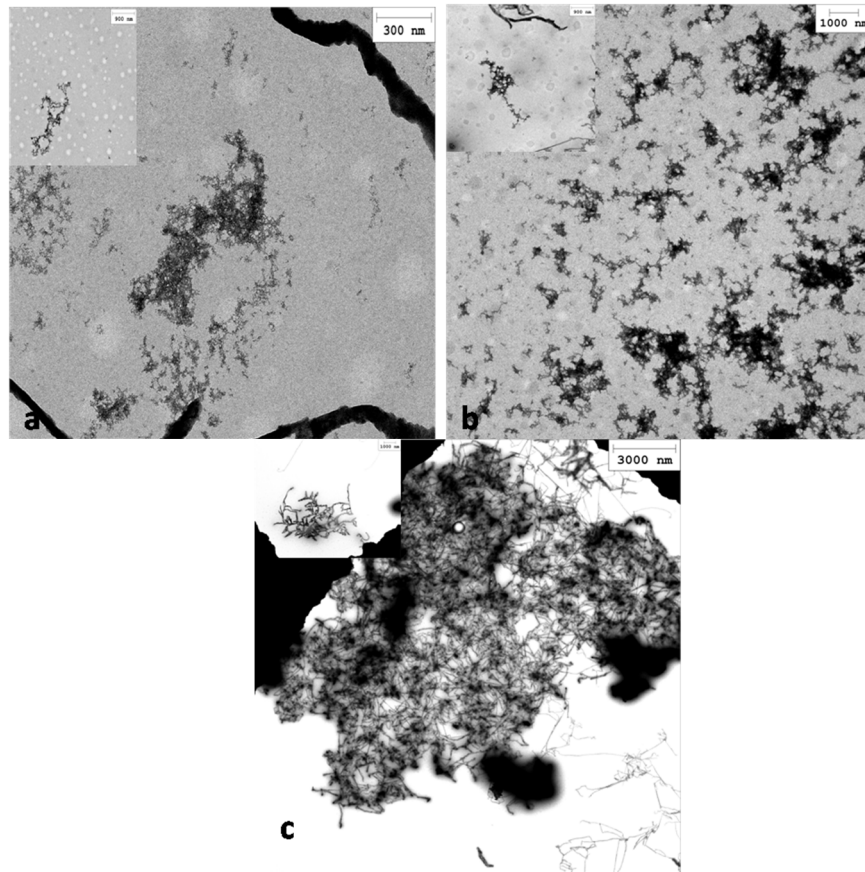


FIG. 17

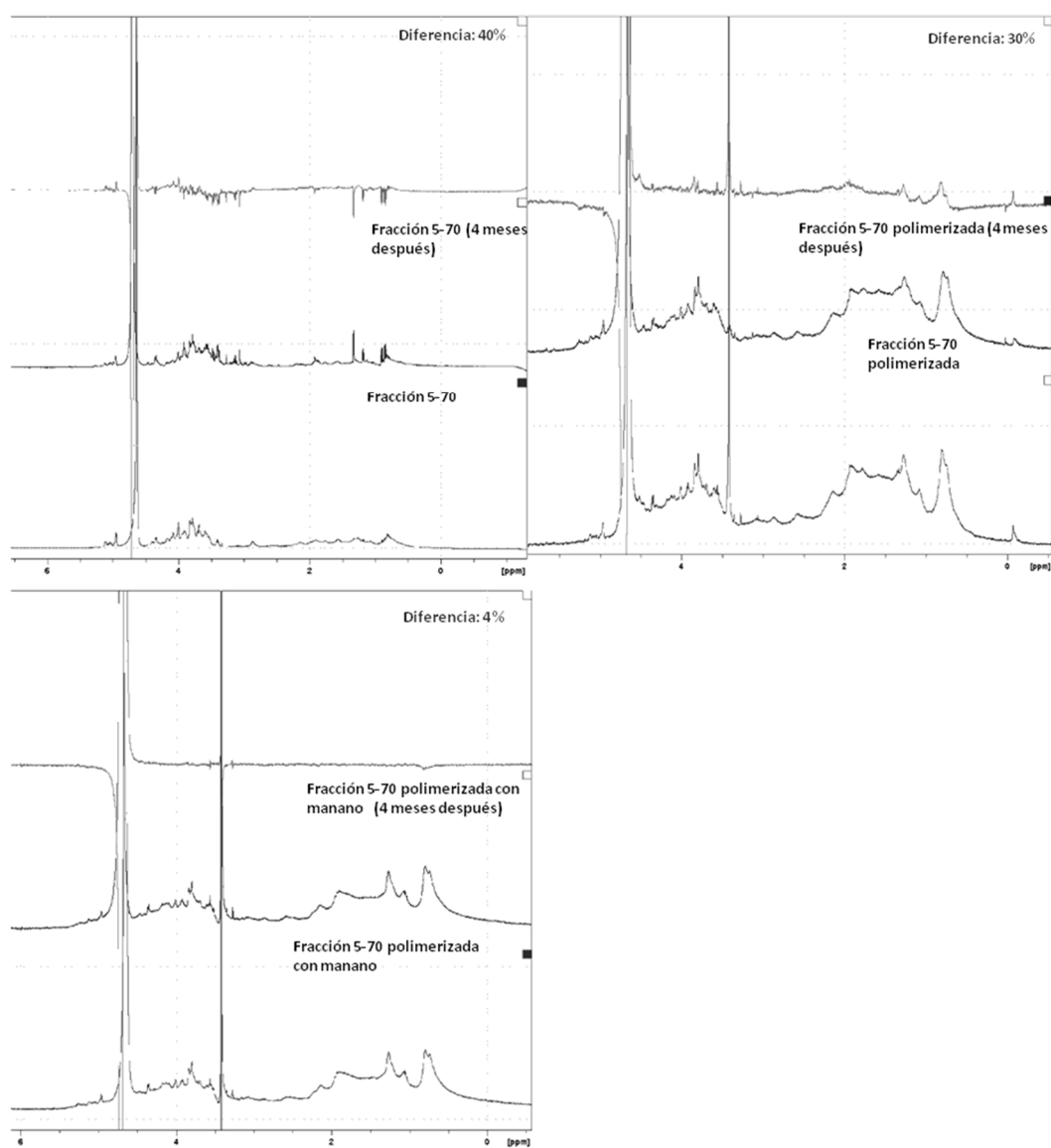
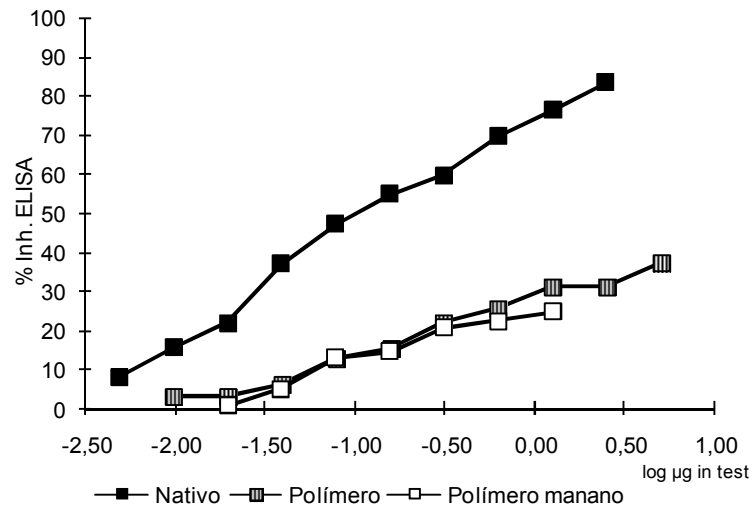


FIG. 18

P. pratense



50% INHIBICIÓN	Nativo	Polímero	Polímero manano
<i>P. pratense</i>	0,14	43,54	67,65

FIG. 19A

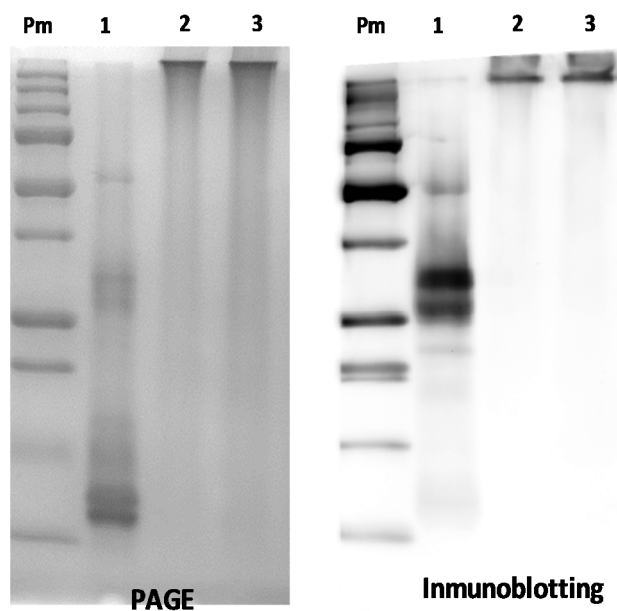


FIG. 19B

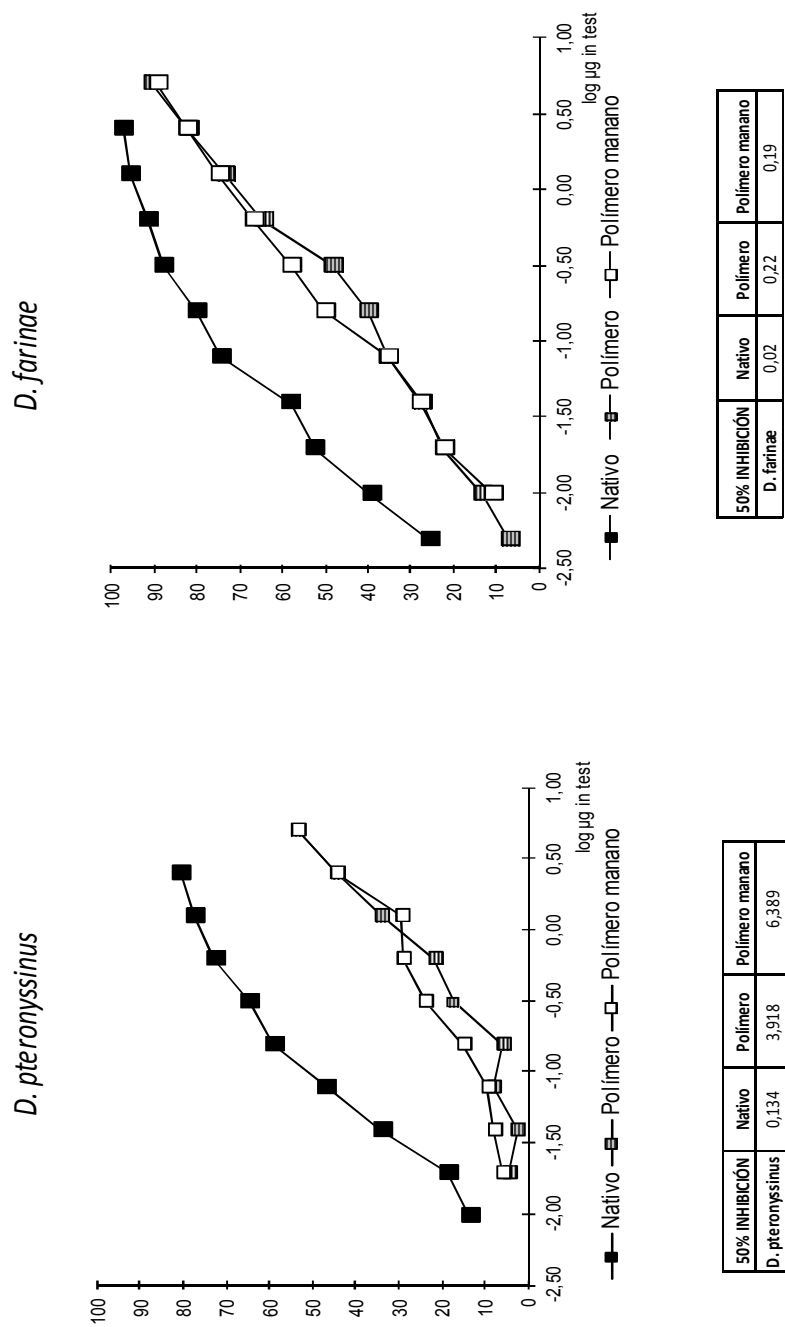


FIG. 20A

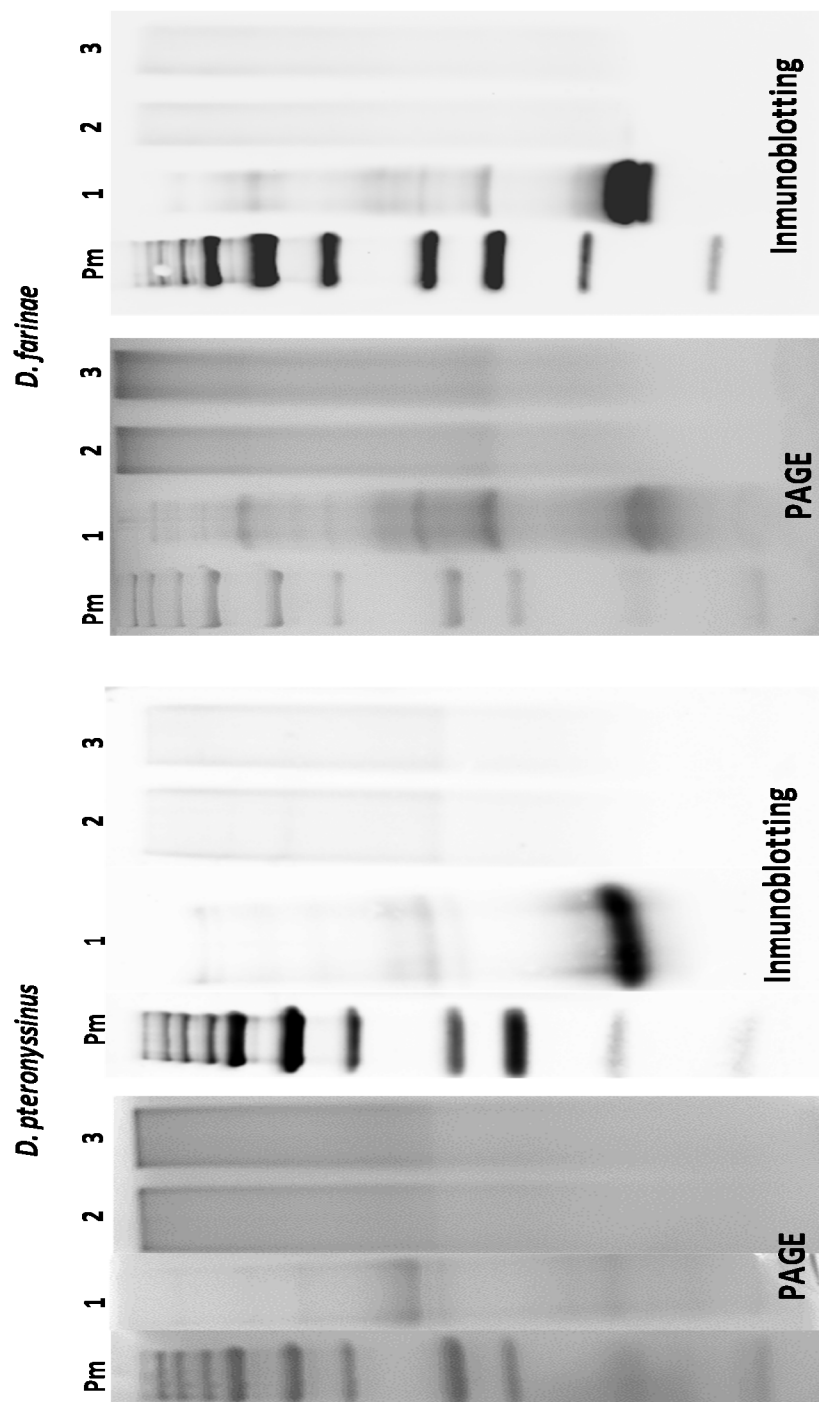


FIG. 20B

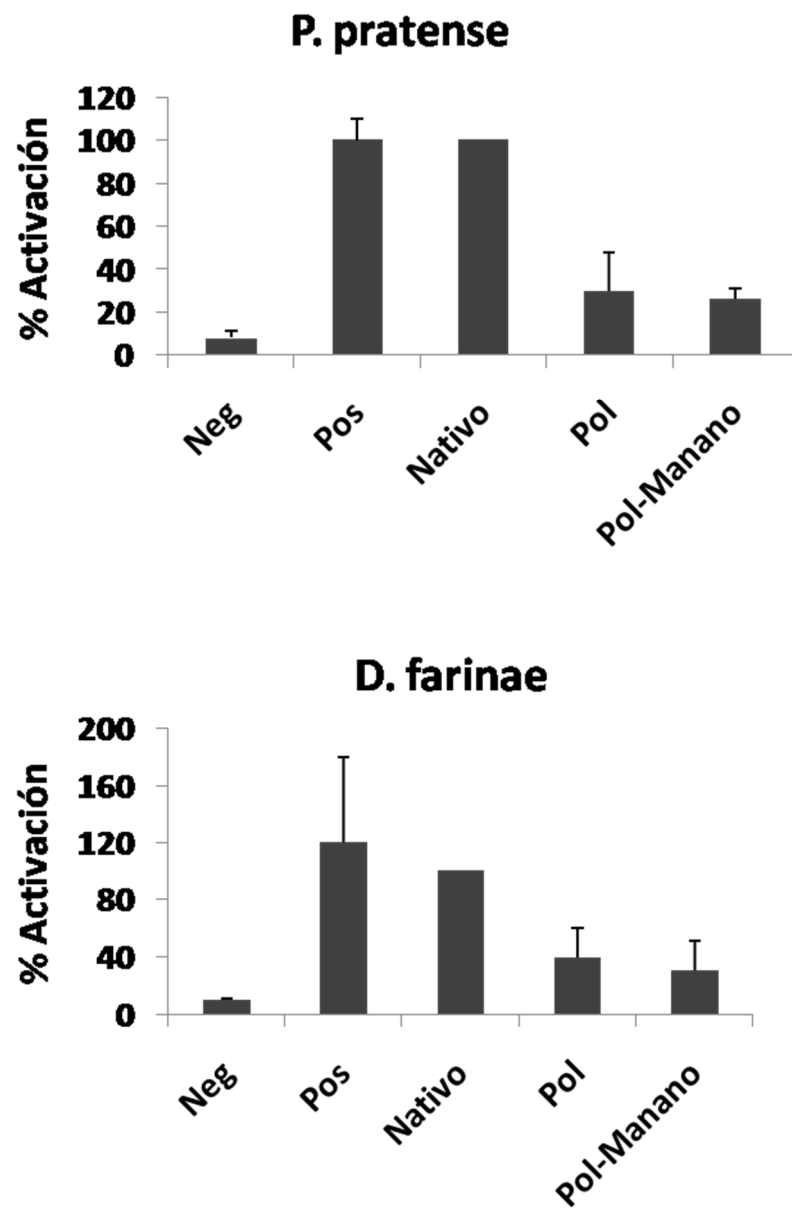


FIG. 21

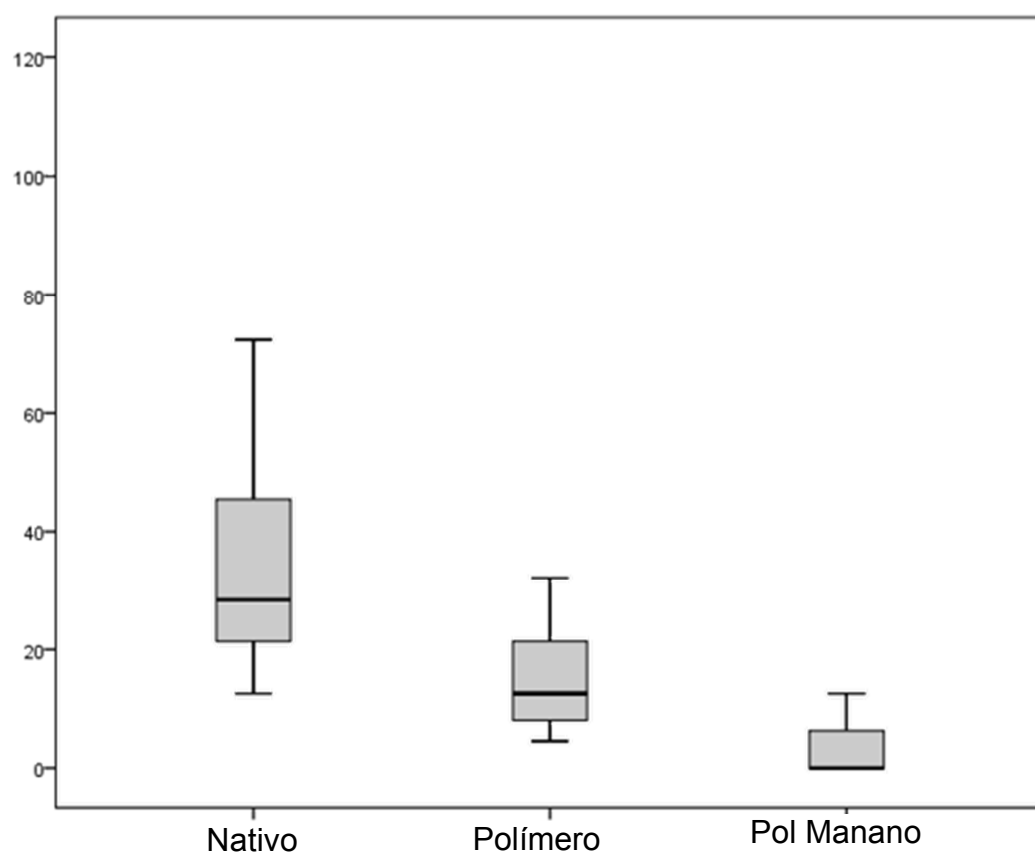


FIG. 22

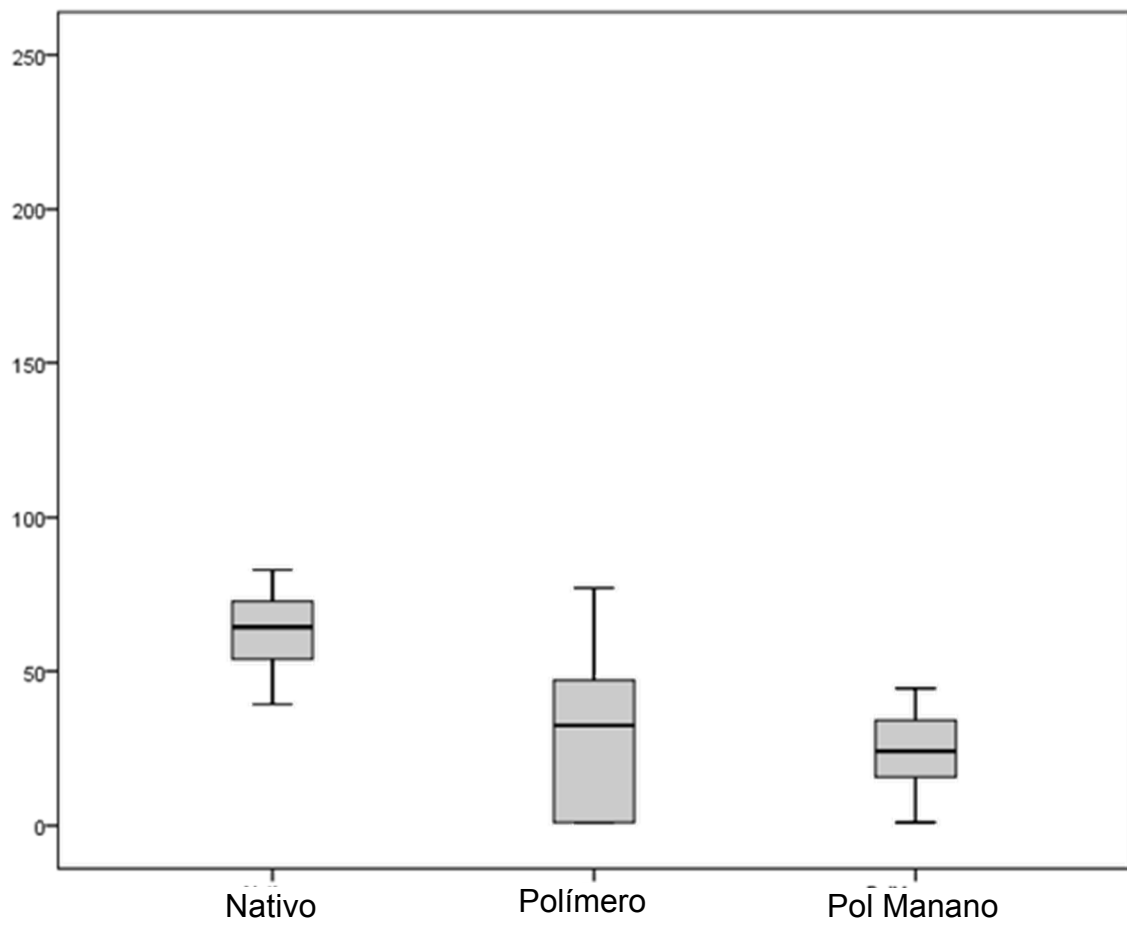


FIG. 23

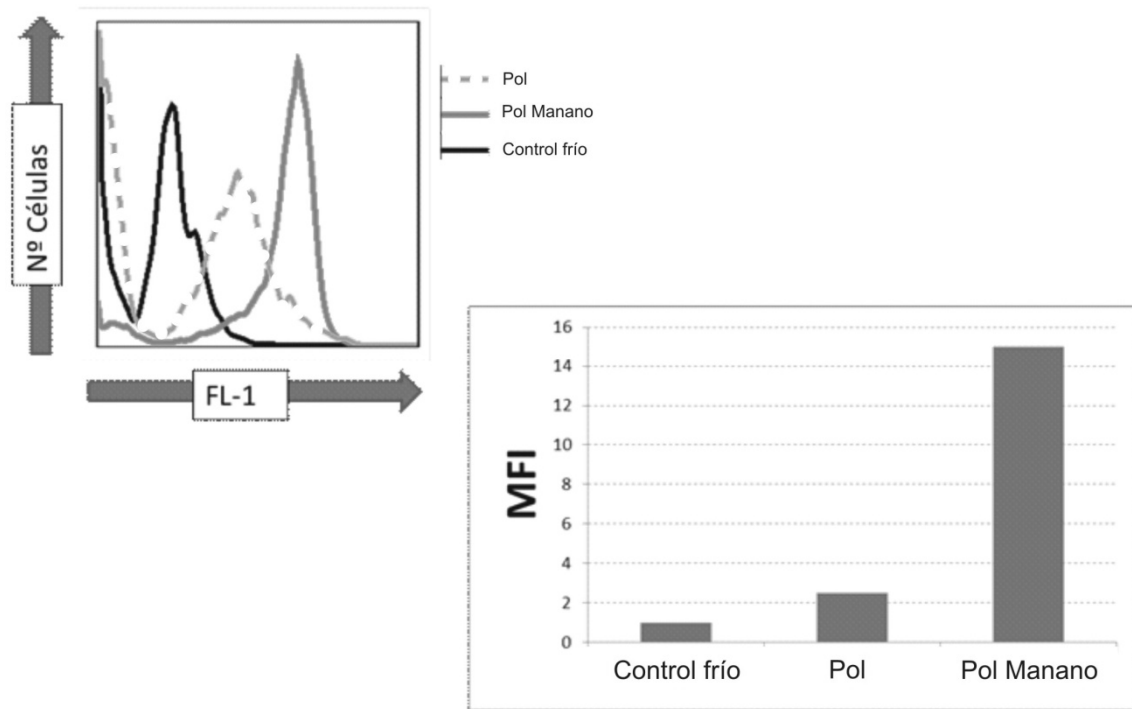


FIG. 24

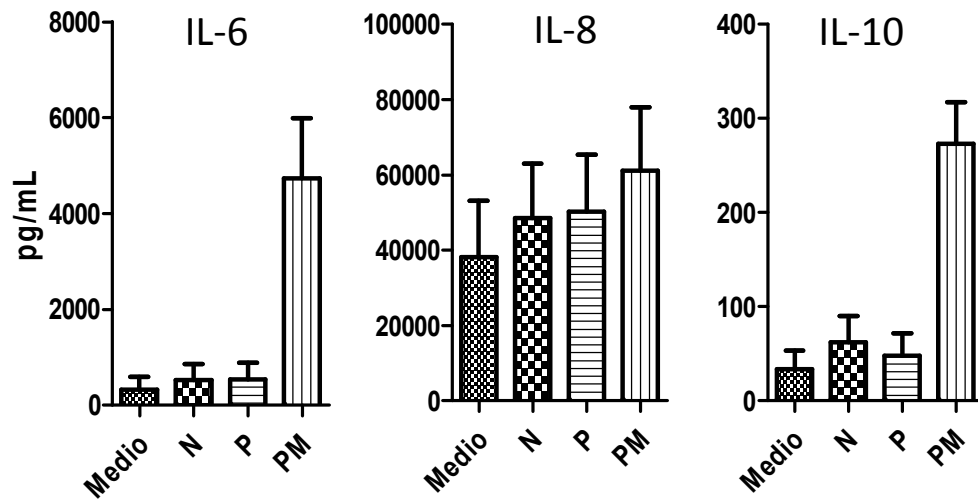


FIG. 25

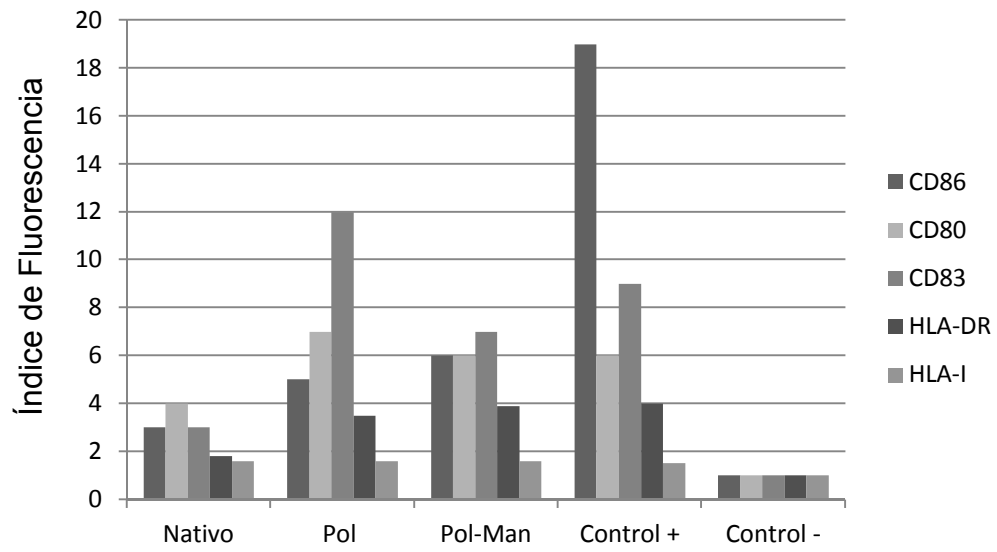


FIG. 26

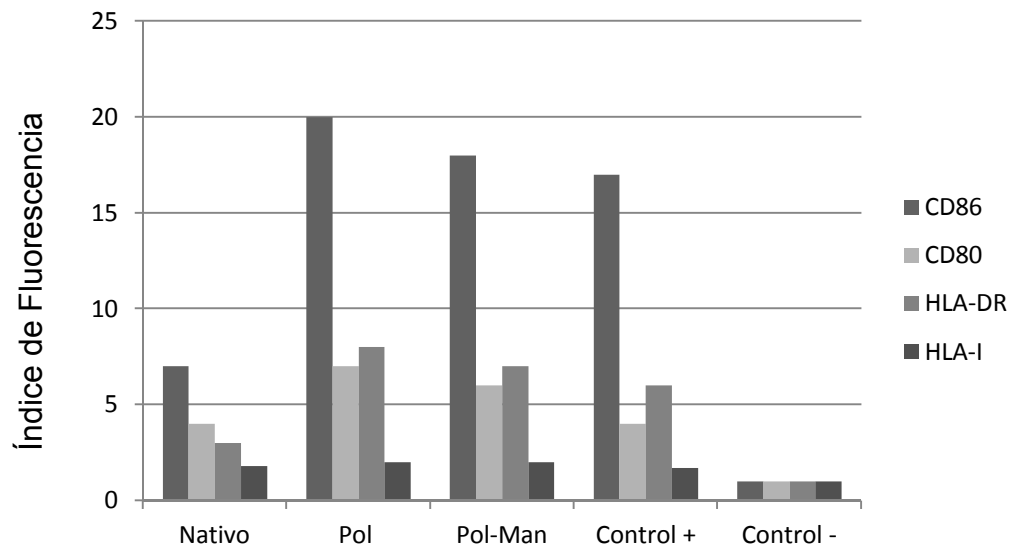


FIG. 27

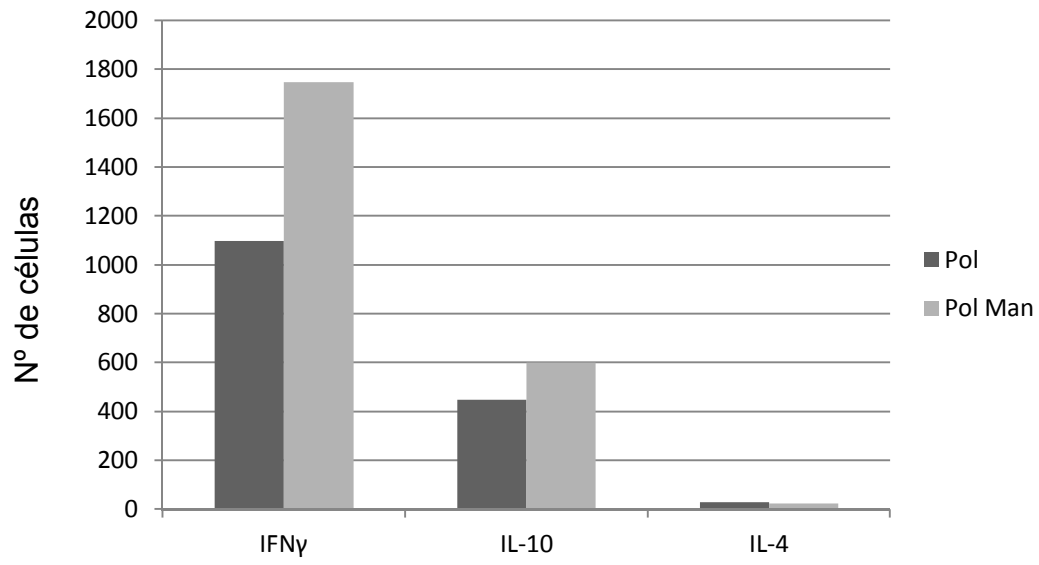


FIG. 28

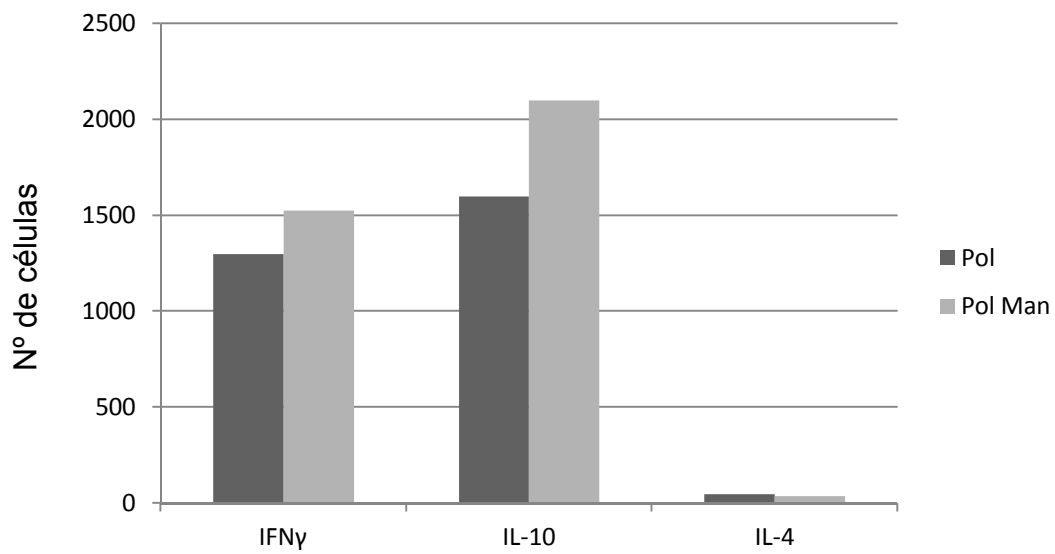
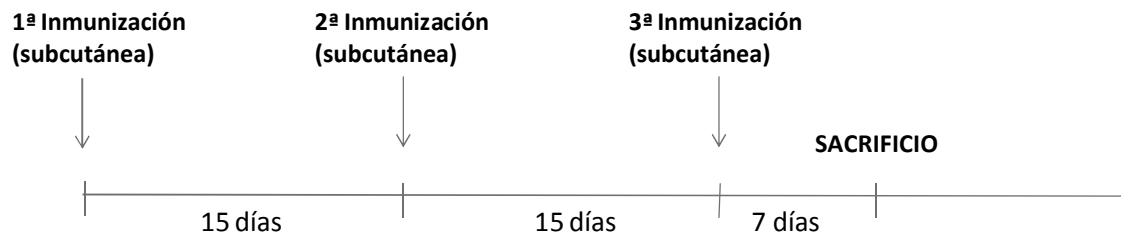


FIG. 29



inmunógenos

- Polímero *Phleum/D.farinae*
- Polímero *Phleum/D. farinae*-MANANO

FIG. 30

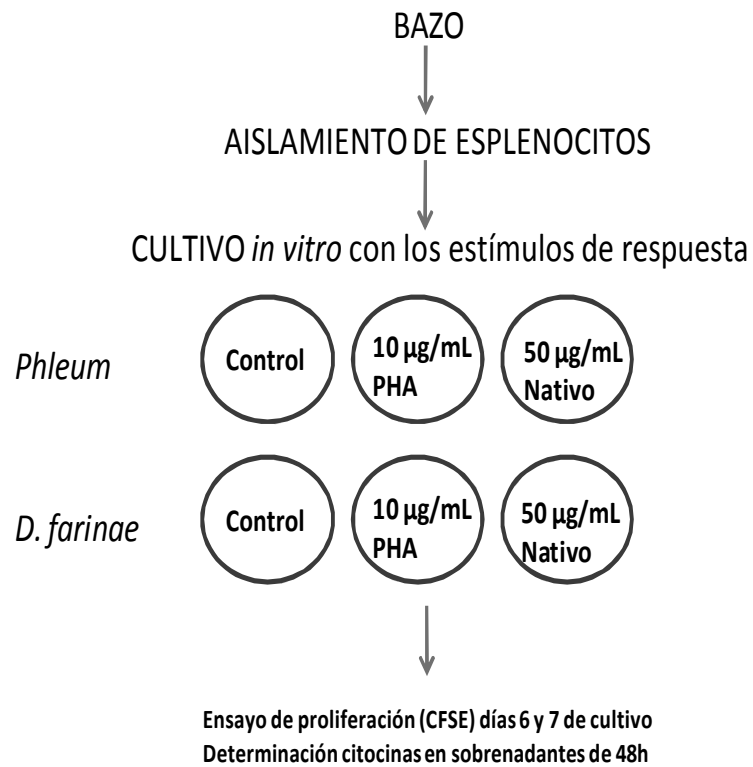


FIG. 31

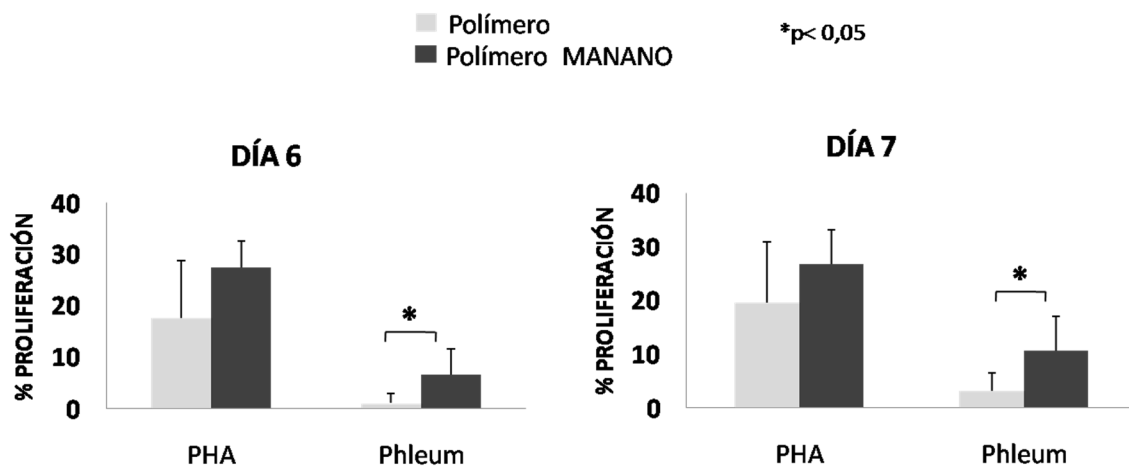


FIG. 32

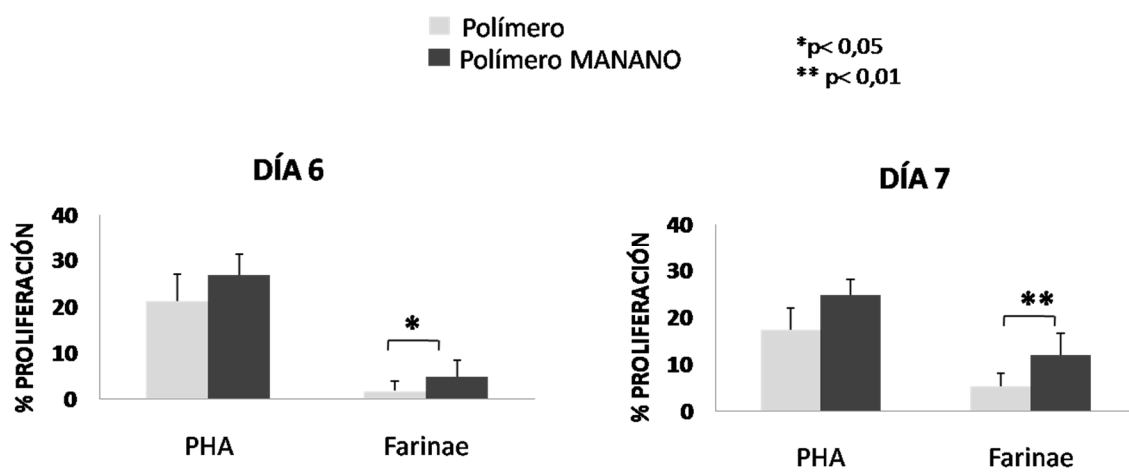


FIG. 33

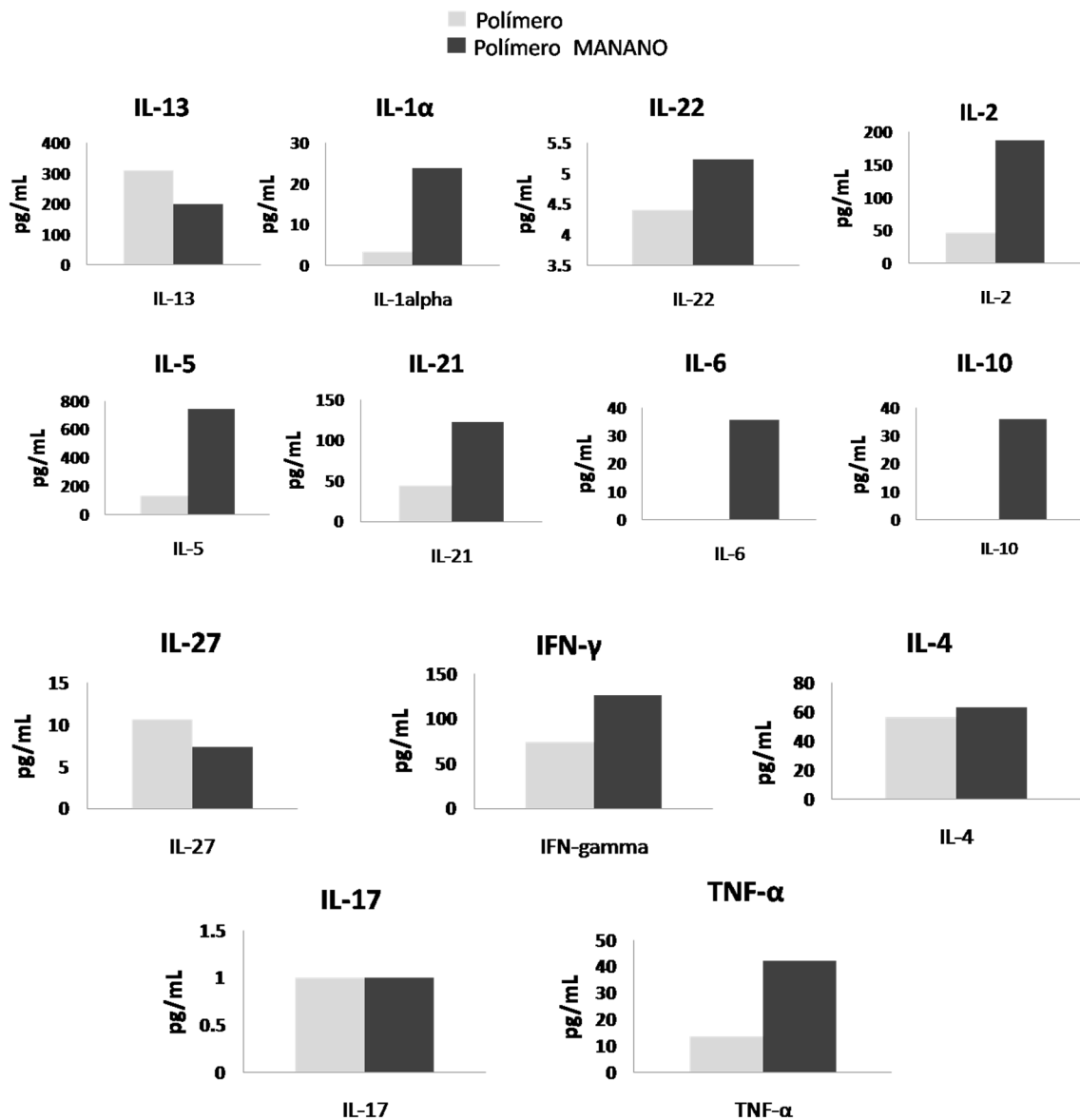


FIG. 34

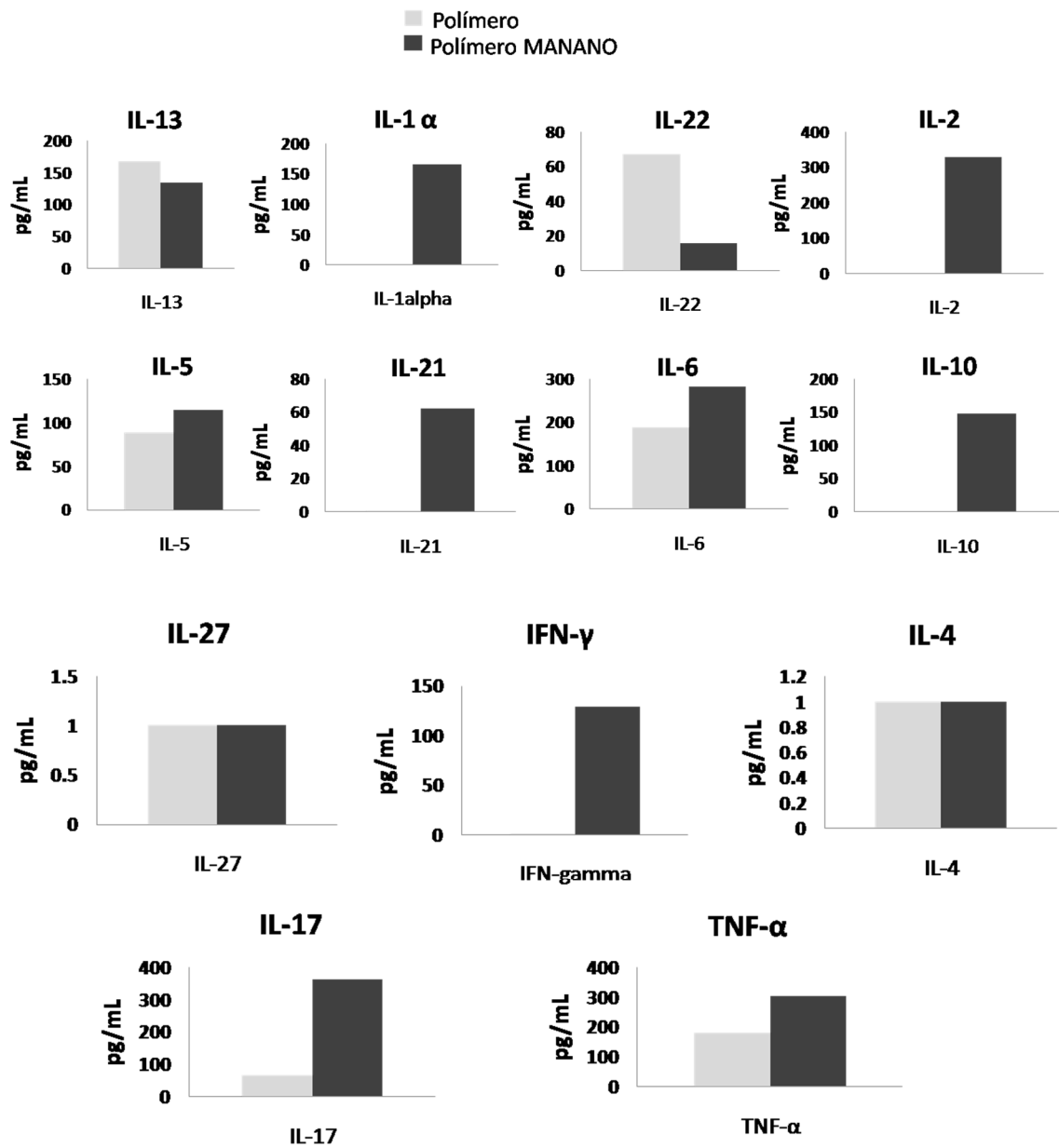


FIG. 35

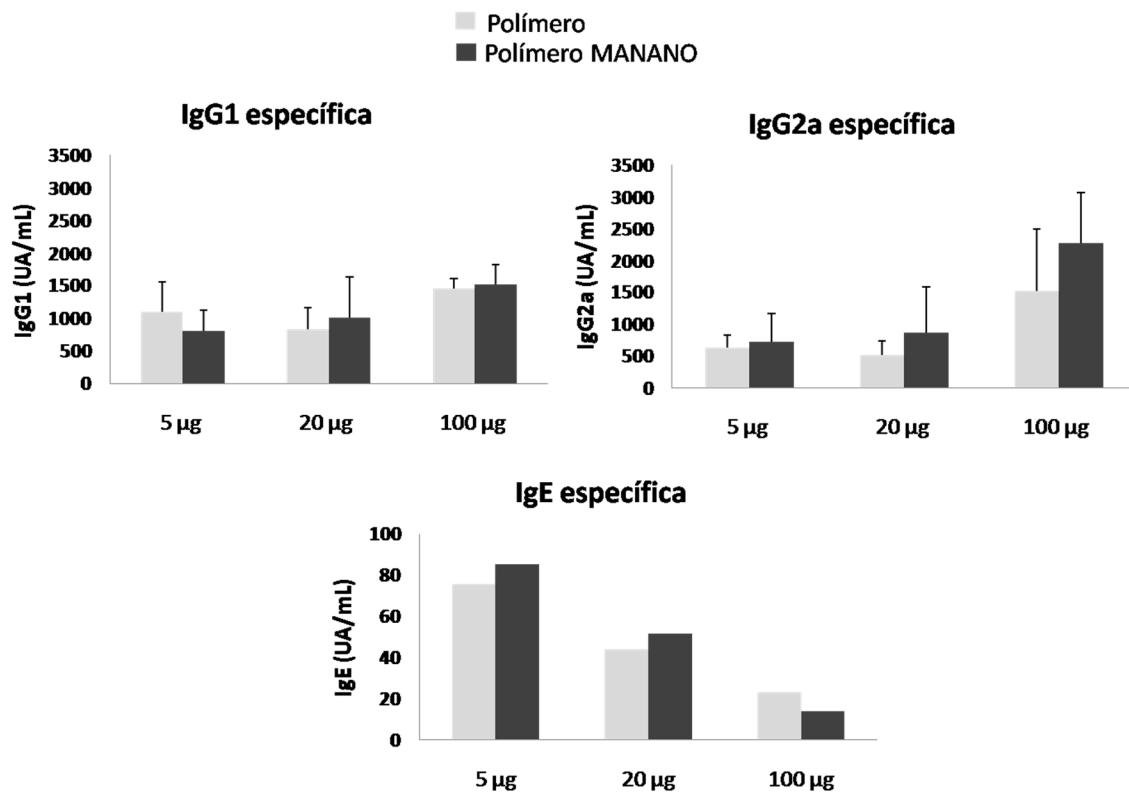


FIG. 36

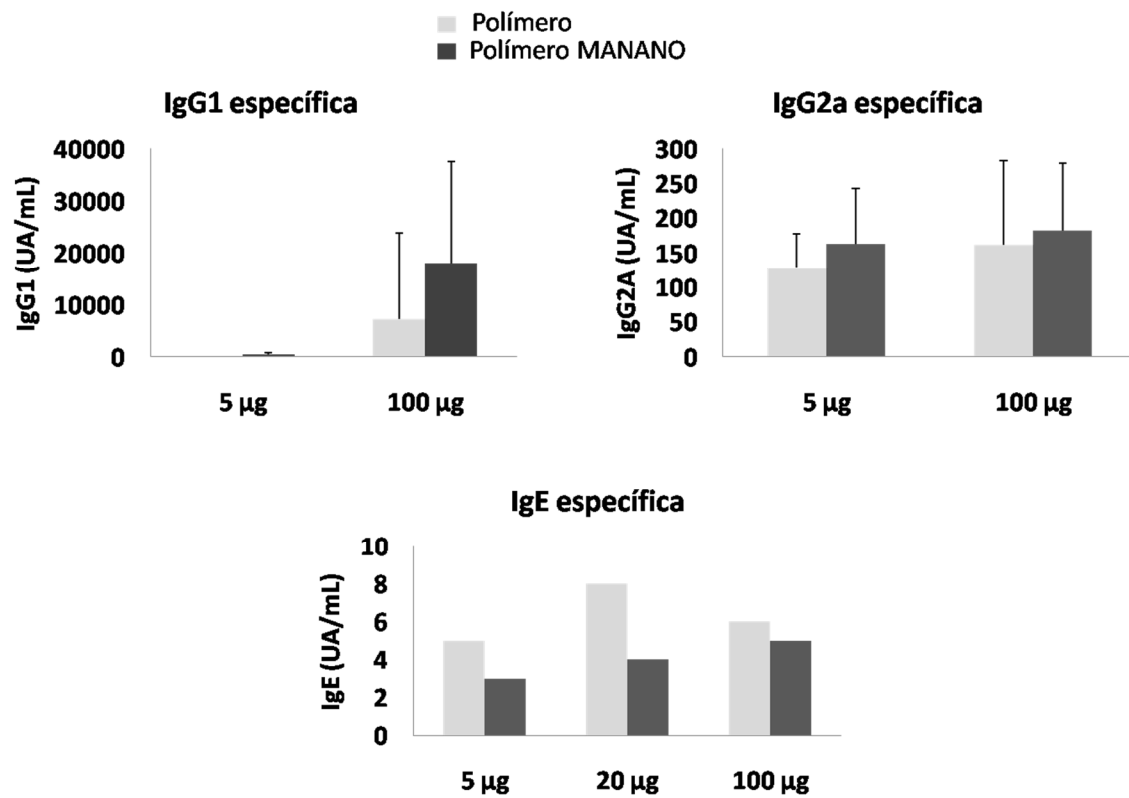


FIG. 37