

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 474**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2014 PCT/EP2014/064339**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15001092**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2014 E 14735964 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 3016673**

54 Título: **Osteopontina láctea de origen mamífero para potenciar la capacidad de respuesta inmune**

30 Prioridad:

05.07.2013 EP 13175267

05.07.2013 US 201361843185 P

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

27.02.2018

73 Titular/es:

ARLA FOODS AMBA (100.0%)

Sønderhøj 14

8260 Viby J, DK

72 Inventor/es:

KVISTGAARD, ANNE STAUDT;

WEJSE, PETER LANGBORG;

DONOVAN, SHARON;

SIEGEL, MARCIA H. MONACO y

COMSTOCK, SARAH S.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 656 474 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Osteopontina láctea de origen mamífero para potenciar la capacidad de respuesta inmune

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la mejora de la capacidad de respuesta inmune frente a una enfermedad infecciosa en un mamífero, por ejemplo un sujeto humano, así como a potenciar la eficacia de la vacunación para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad infecciosa en mamíferos, tal como humanos. Se ha descubierto que la administración de osteopontina (OPN) láctea de origen mamífero, o de una porción truncada activa de la misma, potencia la capacidad de respuesta inmune en un mamífero, potenciando con ello la eficacia profiláctica o terapéutica de la vacunación.

10 Antecedentes de la invención

El sistema inmune proporciona el mecanismo primario de defensa contra las enfermedades en organismos vivos, mediante el cual los patógenos y los organismos extraños son detectados y eliminados por los componentes del sistema inmunitario. La respuesta inmune innata actúa como la primera línea de defensa contra la infección, comprendiendo diversos componentes celulares que incluyen granulocitos (basófilos, eosinófilos y neutrófilos), mastocitos, células asesinas naturales (NKC, del inglés "Natural Killer Cell") y células presentadoras de antígenos (APC, del inglés "Antigen Presenting Cell"), tales como los macrófagos y las células dendríticas (DC) y factores solubles, como las proteínas de complemento. La respuesta inmune adaptativa como segunda línea de defensa tarda más en desarrollarse, e incluye la selección de respuesta celulares frente a humorales para la eliminación de patógenos. La inmunidad celular está inducida principalmente por Th1, lo que conduce a la diferenciación de células-T citotóxicas, células asesinas naturales (NKC) y macrófagos activados que sirven para destruir células hospedantes comprometidas (p.ej., células infectadas por virus o patógeno). La inmunidad humoral se manifiesta como una especificidad antigénica incrementada y una memoria de antígeno aumentada, por lo que la activación de Th2 y la producción de citocinas conduce a la generación de células B que producen anticuerpos, y de células de memoria que facilitan el reconocimiento de antígenos derivados de patógeno y la eliminación de patógeno.

25 La inmunidad innata en el mamífero recién nacido está sin desarrollar, de tal modo que la resistencia a la enfermedad del neonato depende fuertemente de la adquisición pasiva de anticuerpos maternos recibidos a través de la leche materna, en particular del calostro. Paralelamente, el desarrollo del sistema inmune infantil es inducido por los componentes inmuno-estimulantes presentes en la leche materna. El desarrollo del sistema inmune en mamíferos neonatos alimentados con leche de fórmula en lugar de leche materna se ve retrasado debido a una deficiencia de los componentes principales inductores y generadores de la inmunidad que por otra parte proporciona la leche materna.

El mantenimiento del sistema inmune es esencial para la salud a lo largo de la vida, y por tanto los individuos con inmuno-comprometidos de cualquier edad, así como los individuos de edad avanzada con una inmunidad en continuo declive, representan grupos de pacientes con mayor riesgo de mortalidad relacionada con la enfermedad.

35 La vacunación para generar una resistencia inmune frente a enfermedades infecciosas es el método más efectivo para mejorar la salud pública. El abanico de enfermedades para las que se dispone de vacunas está aumentando continuamente, y el uso de dichas vacunas para proteger a la población adulta, en particular la creciente población de edad avanzada, se está incrementando. La vacunación, tanto profiláctica como terapéutica, estimula el sistema inmune del organismo para reconocer un agente antigénico que se asemeja a un agente dado causante de enfermedad; para destruirlo; y lo "recuerda", de tal modo que el sistema inmune puede reconocer y destruir más fácilmente al agente causante de la enfermedad en una re-exposición. Habitualmente, dichos agentes se preparan a partir de formas debilitadas o muertas del microbio patógeno, de sus toxinas o de una de sus proteínas superficiales.

Puesto que la eficacia de la vacunación depende de la capacidad del sujeto vacunado para generar una respuesta inmune eficaz, los beneficios de la vacunación son reducidos en aquellos individuos en los que el sistema inmune no está desarrollado completamente, como en recién nacidos o en niños pequeños, o en individuos en los que el sistema inmune se ve reducido, comprometido o en declive, como sucede en algunos adultos y en las personas mayores. Por consiguiente, existe una necesidad de agentes que puedan potenciar la capacidad de respuesta inmune en estos grupos de pacientes, en particular su respuesta inmune a la vacunación. Los programas de salud pública para vacunar a estas grandes poblaciones de pacientes deben ser extremadamente seguras y, por tanto, tanto los agentes usados para potenciar la respuesta inmune a la vacunación como los medios usados para su administración deben cumplir dichos requisitos de seguridad.

La osteopontina (OPN) es una proteína de matriz extracelular expresada por una serie de tipos de células que incluyen osteoclastos, osteoblastos, macrófagos, células-T activadas, células de músculo liso y células epiteliales. Está presente en varios tejidos que incluyen el hueso, el riñón, la placenta, el músculo liso y los epitelios secretores. La OPN es capaz de mediar en la adhesión y migración celular, y está asociada a procesos normales de remodelación de tejido, tales como la resorción ósea, la angiogénesis, la curación de heridas y de lesiones de tejido. La OPN también es expresada en determinados estados de enfermedad, p.ej., restenosis, aterosclerosis, enfermedades renales y tumorigénesis. Se ha observado la transcripción modificada del gen que codifica OPN, en

donde transcritos de división alternativa conducen a la expresión de diferentes formas de OPN en determinados estados de enfermedad (Bissonnette et al 2012). La OPN ejerce muchos de sus efectos biológicos interactuando con integrinas, que comprenden una familia grande de receptores transmembrana heterodiméricos que median en las interacciones célula-célula y célula-matriz, y que desempeñan una función en las enfermedades inflamatorias.

- 5 La patente WO 98/56405 A1 se refiere a un método para modular (aumentar o reducir) la respuesta inmune de un individuo alterando (aumentando o disminuyendo) la actividad de osteopontina; pero carece de evidencias que apoyen un efecto terapéutico de la administración de OPN (p.ej., OPN recombinante) a un sujeto.

La patente WO 00/63241 A2 se refiere a Eta-1/osteopontina como regulador de respuestas inmunes; pero no consigue demostrar que la administración de OPN potencia la resistencia inmune frente a enfermedades infecciosas.

- 10 Khajooe V et al., 2006 CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, 143(2): 260-268; se refiere al papel de la osteopontina en la defensa frente a una infección micobacteriana; en base a estudios llevados a cabo con cultivos celulares de macrófagos derivados de monocitos.

Breve descripción de las figuras

- 15 **Figura 1:** Población de ensayo con animales y diseño del estudio. Los lechones fueron divididos en tres grupos de dieta que recibieron una fórmula sustitutiva de leche de cerda (FF; n=10) o una fórmula suplementada con 140 mg/L de osteopontina (OPN; n=12), o criados por cerda (SR; n=7).

Figura 2: Peso corporal diario medio post-parto de lechones que pertenecen a los grupos de dieta que recibieron la fórmula sustitutiva (FF; n=10) o la fórmula suplementada con 140 mg/L de osteopontina (OPN; n=12), y en el cuadro interior se muestran los lechones criados por cerda (SR; n=7).

- 20 **Figura 3:** Título de IgG específico de Fluzone™ en el suero derivado de lechones de 7, 14 y 21 días de edad medido mediante ELISA. Los niveles de IgG específicos de Fluzone en lechones no vacunados se muestran en el cuadro interior. Los datos se expresan como media \pm SD. Los diferentes subíndices se refieren a la significancia estadística a $p < 0,05$. Los superíndices en el grupo no vacunado se refieren a diferencias en el tiempo estadísticamente significativas; los superíndices en el gráfico de vacunados indican diferencias entre los grupos de tratamiento de dieta en el día 21.

- 25 **Figura 4:** Concentraciones totales de IgG en el suero de lechones vacunados y no vacunados medidas mediante ELISA. El suero fue derivado de muestras sanguíneas de lechón tomadas a 7, 14 y 21 días de edad. Los niveles de IgG totales medidos en las muestras tomadas en el día 21 se muestran en el cuadro interior. Los datos están expresados como media \pm SD. Los superíndices se refieren a diferencias estadísticamente significativas con el tiempo.

- 30 **Figura 5:** Concentraciones totales de IgM en suero derivado de lechones de 7, 14 y 21 días de edad medidas mediante ELISA. Los datos se expresan como media \pm SD. Los superíndices se refieren a diferencias estadísticamente significativas con el tiempo.

- 35 **Figura 6:** Gráfico de puntos de citometría de flujo de poblaciones de linfocitos-T de PBMC teñidas para CD4 (clon 74-12-4) y CD8 (clon 76-2-11). Los 4 cuadrantes muestran los linfocitos CD8+ (células T citotóxicas con un perfil CD3+CD4-CD8+); linfocitos CD4+ (células T colaboradoras con un perfil CD3+CD4+CD8-), linfocitos CD4+CD8+ (células T de memoria con un perfil CD3+CD4+CD8+).

- 40 **Figura 7:** Efecto de la dieta sobre la abundancia de células T colaboradoras CD4+ (Panel A), células T citotóxicas CD8+ (Panel B) y sobre la relación CD4+/CD8+ (Panel C) en PBMC en el día 21. Las poblaciones celulares están expresadas como un % del total de células T CD3+. Los datos están expresados como la media \pm SD y los diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas a $p < 0,05$. * indica una tendencia estadística a $p > 0,1$.

- 45 **Figura 8:** Efecto de la dieta sobre la abundancia de células T citotóxicas CD8+ (Panel A) y sobre la relación CD4+/CD8+ (Panel B) en MLN en el día 21. Las poblaciones celulares están expresadas como un % del total de células T CD3+. Los datos están expresados como la media \pm SD y los diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas a $p < 0,05$. * indica una tendencia estadística a $p > 0,1$.

- 50 **Figura 9:** Efecto de la dieta sobre la abundancia de células T de memoria (CD4+CD8+) en el bazo el día 21. Las poblaciones celulares están expresadas como un % del total de células T CD3+. Los datos están expresados como la media \pm SD y los diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas a $p < 0,05$ para el efecto de la dieta dentro del grupo de vacunación; * indica una significancia estadística a $p < 0,05$ para el efecto de vacunación.

Figura 10: Secreción de IL-12 en células PBMC. Las células PBMC fueron cultivadas *ex vivo* durante 72 horas, se recolectó el medio acondicionado y se analizó la IL-12 mediante ELISA. Los datos están expresados como la media

± SD y los diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas a $p < 0,05$ para el efecto de la dieta entre los grupos de tratamiento; * indica una significancia estadística a $p < 0,05$ para el efecto de vacunación.

5 **Figura 11:** Efectos de la estimulación de fitohemaglutinina (PHA) sobre la secreción en PBMC de IL-12 (A) e IL-10 (B). Las células PBMC fueron cultivadas *ex vivo* durante 72 horas en presencia de PHA, se recolectó el medio acondicionado y se analizó la IL-10 y la IL-12 mediante ELISA. Los datos están expresados como la media ± SD y los diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas a $p < 0,05$ para el efecto de la dieta entre los grupos de tratamiento; * indica una tendencia estadística a $p < 0,1$ para el efecto de la dieta.

10 **Figura 12:** Efectos de la estimulación de lipopolisacáridos (LPS) sobre la secreción en PBMC de IL-12 (A), IL-6 (B) e IL-10 (C). Las células PBMC fueron cultivadas *ex vivo* durante 72 horas en presencia de LPS, se recolectó el medio acondicionado y se analizó la IL-6, la IL-10 y la IL-12 mediante ELISA. Los datos están expresados como la media ± SD y los diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas a $p < 0,05$ para el efecto de la dieta entre los grupos de tratamiento; * indica una significancia estadística a $p < 0,05$ para el efecto de vacunación.

15 **Figura 13:** Efectos de la estimulación de Fluzone sobre la secreción en PBMC de IL-12 (A) e IL-10 (B). Las células PBMC fueron cultivadas *ex vivo* durante 72 horas en presencia de Fluzone, se recolectó el medio acondicionado y se analizó la IL-10 y la IL-12 mediante ELISA. Los datos están expresados como la media ± SD y los diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas a $p < 0,05$ para el efecto de la dieta entre los grupos de tratamiento; * indica una significancia estadística a $p < 0,05$ para el efecto de la vacunación.

20 **Figura 14:** Secreción de IL-12 (A) e IL-10 (B) en células de bazo. Las células de bazo fueron cultivadas *ex vivo* durante 72 horas, se recolectó el medio acondicionado y se analizó la IL-6, la IL-10 y la IL-12 mediante ELISA. Los datos están expresados como la media ± SD y los diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas a $p < 0,05$ para el efecto de la dieta entre los grupos de tratamiento; * indica una tendencia a $p = 0,07$ para el efecto de la vacunación.

25 **Figura 15:** Efectos de la estimulación de fitohemaglutinina (PHA) sobre la secreción de bazo de IL-12 (A) e IL-10 (B). Las células de bazo fueron cultivadas *ex vivo* durante 72 horas en presencia de PHA, se recolectó el medio acondicionado y se analizó la IL-10 y la IL-12 mediante ELISA. Los datos están expresados como la media ± SD y los diferentes superíndices indican tendencia estadística a $p = 0,07$ entre los grupos de tratamiento; * indica una significancia estadística a $p < 0,05$ para el efecto de la vacunación.

30 **Figura 16:** Efectos de la estimulación de lipopolisacáridos (LPS) sobre la secreción en bazo de IL-12 (A) e IL-10 (B). Las células de bazo fueron cultivadas *ex vivo* durante 72 horas en presencia de LPS, se recolectó el medio acondicionado y se analizó la IL-10 y la IL-12 mediante ELISA. Los datos están expresados como la media ± SD y los diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas a $p < 0,05$ para el efecto de la dieta entre los grupos de tratamiento; * indica estadísticamente significativo a $p < 0,05$ para el efecto de vacunación.

35 **Figura 17:** Efectos de la estimulación de Fluzone sobre la secreción en bazo de IL-12 (A) e IL-10 (B). Las células de bazo fueron cultivadas *ex vivo* durante 72 horas en presencia de Fluzone, se recolectó el medio acondicionado y se analizó la IL-10 y la IL-12 mediante ELISA. Los datos están expresados como la media ± SD y los diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas a $p < 0,05$ para el efecto de la dieta entre los grupos de tratamiento; * indica estadísticamente significativo a $p < 0,05$ para el efecto de la vacunación.

40 **Figura 18:** Incidencia de pirexia en niños con edades de 1 a 6 meses alimentados con 1) pecho materno; 2) fórmula regular (RF) sin OPN añadida (F0); 3) RF con OPN bovina añadida a ~65 mg de OPN/L (F65), y 4) RF con OPN bovina añadida a ~130 mg de OPN/L (F130). La incidencia se da como el porcentaje de tiempo que los niños que pertenecen a cada grupo de tratamiento fueron registrados con fiebre durante un periodo de un mes de calendario, (los valores de tiempo registrado por mes de calendario son promedios de los valores registrados a lo largo de periodo del ensayo clínico).

Sumario de la invención

45 De forma inesperada, se ha descubierto que la osteopontina (OPN) láctea de origen mamífero y/o un truncamiento activo de la misma, cuando se administra oralmente, potencia la capacidad de respuesta inmune específica en un sujeto mamífero, y de este modo mejora su respuesta inmune específica a la vacunación. La invención está basada en el primer estudio en documentar que la administración oral de OPN puede usarse para potenciar la capacidad de respuesta inmune específica en un sujeto mamífero mediante vacunación.

50 La invención proporciona OPN láctea de origen mamífero y/o un truncamiento activo de la misma para uso como medicamento para potenciar la resistencia inmune a una enfermedad infecciosa en un mamífero, por ejemplo potenciando la resistencia inmune inducida mediante vacunación contra la enfermedad, en donde la OPN y/o el truncamiento activo de la misma son para administración oral. Según una realización, la OPN truncada activa comprende al menos un péptido de OPN activo derivable de OPN láctea de origen mamífero mediante ruptura proteolítica. La OPN o un truncamiento activo de la misma pueden usarse para administración oral antes, simultáneamente o con posterioridad a la vacunación del mamífero, o una combinación de las mismas.

La OPN láctea de origen mamífero y/o un truncamiento activo de la misma son capaces de fortalecer la inmunidad humoral del mamífero.

La OPN láctea de origen mamífero y/o un truncamiento activo de la misma pueden derivarse de uno cualquiera de bovino, cabra, oveja, camello, búfalo, dromedario, llama y cualquier combinación de los mismos.

5 Según una realización, la OPN láctea de origen mamífero y/o un truncamiento activo de la misma se usa para potenciar la resistencia inmune frente a una enfermedad infecciosa en un mamífero, donde el mamífero es un humano. Según una realización, el humano pertenece a un grupo de edad seleccionado entre 0-5, 6-11, 12-18, 19-34, 35-44, 45-54, 55-64, 65-74, 75-84, y mayores de 84 años de edad.

10 Según una realización, la enfermedad infecciosa se selecciona entre gripe; difteria; tétanos, tos ferina, polio, sarampión, paperas y rubeola, tuberculosis, hepatitis B, meningitis C; virus de papiloma humano; rotavirus; gripe de tipo a, gripe de tipo b, infección de neumococos y herpes.

15 La invención proporciona además un sistema de vacuna que comprende una vacuna y una OPN láctea de origen mamífero y/o un truncamiento activo de la misma para uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad infecciosa en un mamífero, en donde la OPN láctea de origen mamífero y/o un truncamiento activo de la misma es para administración oral, por ejemplo antes; simultáneamente o con posterioridad a la vacunación del mamífero, o una combinación de las mismas. La administración oral de la OPN láctea de origen mamífero y/o un truncamiento activo de la misma potencia la resistencia inmune frente a una enfermedad infecciosa en un mamífero inducida mediante vacunación. La osteopontina láctea de origen mamífero y/o un truncamiento activo de la misma son capaces de fortalecer la inmunidad humoral en el vacunado.

20 Según una realización, el sistema de vacuna comprende OPN y/o el truncamiento activo de la misma derivados de bovino, cabra, oveja, camello, búfalo, dromedario, llama o cualquier combinación de los mismos.

Según una realización del sistema de vacuna, el mamífero es un humano.

25 Según una realización del sistema de vacuna, la enfermedad infecciosa se selecciona entre gripe, difteria, tétanos, tos ferina, polio, sarampión, paperas y rubeola, tuberculosis, hepatitis B, meningitis C, rotavirus, virus de papiloma humano, gripe de tipo a, gripe de tipo b, infección de neumococos y herpes.

Según una realización del sistema de vacuna, el mamífero es un humano.

Según una realización del sistema de vacuna, la enfermedad infecciosa se selecciona entre gripe, difteria, tétanos, tos ferina, polio, sarampión, paperas y rubeola, tuberculosis, hepatitis B, meningitis C, rotavirus, virus de papiloma humano, gripe de tipo a, gripe de tipo b, infección de neumococos y herpes.

30 Según una realización del sistema de vacuna, la vacuna se selecciona entre vacuna de la difteria, vacuna del tétanos, vacuna de la tos ferina, vacuna de la polio, o una vacuna combinada (p.ej., vacuna TaP/IPV); una vacuna combinada de sarampión, paperas y rubeola (p.ej., vacuna MMR); vacuna de la tuberculosis (p.ej., vacuna BCG); vacuna de la hepatitis B; vacuna de la meningitis C; rotavirus (vacuna de rotavirus); vacuna del Virus de Papiloma Humano (HPV); vacuna de la gripe de tipo a y tipo b (p.ej., vacuna Flu); vacuna de neumococos; y vacuna del Herpes zoster.

35 Según una realización del sistema de vacuna, el humano pertenece a un grupo de edad seleccionado entre 0-5, 6-11, 12-18, 19-34, 35-44, 45-54, 55-64, 65-74, 75-84, y mayores de 84 años de edad.

40 La invención proporciona además un método para potenciar la resistencia inmune frente a una enfermedad infecciosa en un mamífero, el uso de una vacuna y OPN láctea de origen mamífero y/o uno o más truncamientos activos de la misma al mamífero, en donde la OPN y/o el truncamiento activo de la misma debe administrarse oralmente. La OPN láctea de origen mamífero y/o el truncamiento activo de la misma son capaces de fortalecer la inmunidad humoral en el mamífero vacunado.

Según una realización del método para potenciar la resistencia inmune a una enfermedad infecciosa en un mamífero, el mamífero es un humano.

45 Según una realización del método, la OPN o un truncamiento activo de la misma se administran antes, simultáneamente o con posterioridad a la vacunación del mamífero, o una combinación de las mismas.

Según una realización del método, la OPN o un truncamiento activo de la misma se administran con una dosis oral en el rango de aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 5 g/kg de peso corporal del sujeto tratado.

50 Según una realización del método para potenciar la resistencia inmune a una enfermedad infecciosa en un humano, el humano pertenece a un grupo de edad seleccionado entre 0-5, 6-11, 12-18, 19-34, 35-44, 45-54, 55-64, 65-74, 75-84, y mayores de 84 años de edad.

Según una realización del método, la OPN o un truncamiento activo de la misma es de origen mamífero, seleccionado entre bovino, cabra, oveja, camello, búfalo, dromedario, llama y cualquier combinación de los mismos.

5 Según una realización del método, la enfermedad infecciosa se selecciona entre gripe, difteria, tétanos, tos ferina, polio, sarampión, paperas y rubeola, tuberculosis, hepatitis B, meningitis C, rotavirus, virus de papiloma humano, gripe de tipo a, gripe de tipo b, infección de neumococos y herpes.

10 Según una realización del método, la vacuna se selecciona entre vacuna de la difteria, vacuna del tétanos, vacuna de la tos ferina, vacuna de la polio, o una vacuna combinada (p.ej., vacuna TaP/IPV); una vacuna combinada de sarampión, paperas y rubeola (p.ej., vacuna MMR); vacuna de la tuberculosis (p.ej., vacuna BCG); vacuna de la hepatitis B; vacuna de la meningitis C; rotavirus (vacuna de rotavirus); vacuna del Virus de Papiloma Humano (HPV); vacuna de la gripe de tipo a y tipo b (p.ej., vacuna Flu); vacuna de neumococos; y vacuna del Herpes zoster.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención aborda la necesidad de potenciar la respuesta inmune en sujetos mamíferos, en particular en bebés y niños alimentados con fórmulas preparadas; adultos con una capacidad inmune reducida (p.ej., sujetos inmuno-comprometidos); y personas mayores. Los inventores han descubierto que la OPN láctea de origen mamífero y/o un truncamiento activo de la misma, cuando se administran oralmente a un sujeto, potencian la capacidad de respuesta inmune en el mamífero, mejorando con ello la eficacia de la vacunación del mamífero.

I. Osteopontina (OPN) láctea de origen mamífero y/o un truncamiento activo de la misma

I. i *Estructura de la OPN láctea de origen mamífero*

20 Según una primera realización, la invención proporciona OPN láctea de origen mamífero y/o un truncamiento activo de la misma para uso en potenciar la capacidad de respuesta inmune frente a enfermedades infecciosas, y en particular la resistencia inmune inducida por vacuna frente a una enfermedad infecciosa en un mamífero.

25 La OPN láctea de origen mamífero es una proteína láctea soluble producida por secreción en la glándula mamaria. Aunque la OPN láctea de origen mamífero es secretada como un polipéptido que tiene una masa molecular de aproximadamente 60 kDa (determinado mediante SDS-PAGE), habitualmente se observa que co-existe en la leche con formas truncadas de OPN. Al contrario que la alternativa (transcripción), isoformas de OPN divididas expresadas en otros tejidos, la OPN láctea de origen mamífero está presente solo en una isoforma dividida; mientras que las formas truncadas de OPN láctea son el resultado de una ruptura proteolítica de dicha isoforma de polipéptido secretado. La OPN láctea, tanto el polipéptido de longitud completa como las formas truncadas del mismo, son polipéptidos altamente fosforilados y glicosilados. Se sabe que la estructura post-traducciona de fosforilación y glicosilación de la OPN es específica de tejido y que regula sus propiedades fisiológicas. El alto nivel y la estructura de fosforilación y glicosilación de las isoformas del polipéptido de OPN láctea son características distintivas importantes para sus propiedades funcionales (Bissonnette et al 2012).

30 La OPN láctea según la invención es de origen mamífero, y puede derivarse, por ejemplo, de leche de bovino, cabra, oveja, camello, búfalo, dromedario o llama. El polipéptido de OPN láctea comprende una serie de estructuras de secuencia altamente conservadas, en particular una estructura RGD, que se caracteriza por propiedades de unión a alfa-integrina. La localización de estas estructuras, conservadas a lo largo de los polipéptidos de OPN láctea de origen mamífero, se identifica con respecto a la OPN bovina, cuyo producto de traducción primario tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la Tabla 1.

Tabla 1: Secuencia de aminoácidos de OPN bovina [SEQ ID NO 1]					
10	20	30	40	50	60
MRIAVICFCL	LGIASALPVK	PTSSGSSEEK	QLNNKYPDAV	ATWLKPDPSQ	KQTFLAPQNS
70	80	90	100	110	120
VSSEETDDNK	QNTLPSK_SNE	SPEQTDDLDD	DDDN_SQDVNS	ND_SDDAETTD	DPDH_SDESHH
130	140	150	160	*	170
SDE_SDEVDFP	TDIPTIAVFT	PFIP TES AND	GRGDSVAYGL	KSRSKKFRRS	NVQSPDA_TEE
190	200	210	220	230	240
DFTSHIESEE	MHDAPKKT SQ	LTDH_SKETNS	SELSKELTPK	AKDKNKHSNL	IESQENSKLS
250	260	270			
QEFH_SLEDKL	DLDHK_SEEDK	HLKIRI_SHEL	DSASSEVN		

UniProtKB: P31096
 Péptido señal: aminoácidos 1-16
 OPN de longitud completa madura: aminoácidos 17-278
 *= R¹⁶³/S¹⁶⁴ sitio de ruptura de trombina predicho y sitio de ruptura de truncamiento in vivo putativo
 Estructuras FPTDIPT y RGDSVAYGLK (secuencia subrayada): sitios de unión de integrina predichos
 Sitios de fosforilación*: residuos T o S subrayados y en cursiva
 Sitios de O-glicosilación*: residuos T en negrita
 *Sørensen et al 1995

5 Cuando la OPN láctea de origen mamífero derivad de leche bovina, la OPN típicamente comprende al menos un polipéptido de OPN truncado activo además del polipéptido de OPN maduro de longitud completa. Habitualmente, el uno o más polipéptidos de OPN truncados activos presenta una masa molecular de aproximadamente 40 kDa (determinado mediante SDS-PAGE). Habitualmente, el uno o más polipéptidos de OPN truncados activos deriva del polipéptido de OPN de longitud completa por ruptura de enlace peptídico *in vivo* en una posición que es C-terminal respecto a la estructura RGD. Habitualmente, la al menos una o más OPN láctea bovina truncada deriva de un polipéptido maduro de OPN de longitud completa, en donde la OPN madura presenta una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia determinada con los residuos 17 – 278 de la SEQ ID NO: 1. La OPN láctea bovina es un polipéptido secretado, que tiene un péptido señal (correspondiente a los residuos de aminoácido 1-16 de la SEQ ID NO: 1) que es eliminada co-traduccionalmente para producir un polipéptido de longitud completa. Cuando la OPN láctea bovina comprende un polipéptido de OPN de longitud completa, típicamente presenta una secuencia de aminoácidos de los residuos 17 – 278 de la SEQ ID NO: 1. Se predice una OPN láctea bovina truncada activa derivada del polipéptido de OPN bovina (SEQ ID NO: 1) mediante ruptura peptídica en el sitio de ruptura de trombina o en sus proximidades (Tabla 1), dando lugar a un polipéptido de OPN truncado C-terminalmente que presenta una masa molecular de aproximadamente 40 kDa (determinado mediante SDS-PAGE) que retiene la estructura RGD.

20 Según una realización, la OPN láctea de mamífero comprende un polipéptido de OPN maduro de longitud completa que tiene al menos un 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100% de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 1; y/o uno o más polipéptidos de OPN truncados activos que tienen al menos un 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100% de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a un polipéptido que tiene la secuencia seleccionada entre una cualquiera con los residuos de aminoácido 17-161; 17-162; 17-163; 17-164 y 17-165 de la SEQ ID NO: 1.

25 En el contexto de la presente invención, el término “identidad de secuencia” se refiere a una medida cuantitativa del grado de identidad entre dos secuencias de aminoácido o entre dos secuencias de ácido nucleico, preferiblemente de igual longitud. Si las dos secuencias que se van a comparar no tienen la misma longitud, deben estar alineadas para el mejor ajuste posible. La identidad de secuencia se puede calcular como $(Nref - Ndif) * 100 / (Nref)$, en donde Ndif es el número total de residuos no idénticos en las dos secuencias cuando están alineadas, y en donde Nref es el número de residuos de las secuencias de referencia. Por tanto, la secuencia de ADN AGTCAGTC tendrá una identidad de secuencia del 75% con respecto a la secuencia AATCAATC (Ndif=2 y Nref=8). Un hueco se contabiliza como no identidad de el(los) residuo(s) específico(s), es decir, la secuencia de ADN AGTGTC tendrá una identidad de secuencia del 75% con respecto a la secuencia de ADN AGTCAGTC (Ndif=2 y Nref=8). La identidad de

secuencia se puede calcular, por ejemplo, usando los programas BLAST apropiados, tal como el algoritmo BLASTp proporcionado por el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), EE.UU.

5 La OPN láctea de origen mamífero puede comprender polipéptido de OPN truncado activo (tOPN) o polipéptido de OPN de longitud completa (fOPN), o las dos formas pueden estar presentes en diferentes proporciones. Por ejemplo, la proporción de tOPN/fOPN puede oscilar entre 0:100 y 100:0; más preferiblemente la proporción es una cualquiera de 5:95; 10:90; 15:85; 20:80; 25:75; 30:70; 35:65; 40:60; 45:55; 50:50; 55:45; 60:40; 65:35; 70:30; 75:35; 80:20; 85:15; 90:10; y 95:5. Típicamente, la proporción en la leche bovina es de 75% de tOPN y 25% de fOPN, en donde la tOPN tiene una masa molecular de aproximadamente 40 kDa (determinada mediante SDS-PAGE).

10 Según una realización adicional, la OPN láctea de origen mamífero es una OPN truncada, en donde la OPN truncada comprende al menos un péptido de OPN activo derivable de OPN láctea de origen mamífero (por ejemplo, una OPN láctea bovina que tenga la SEQ ID NO: 1) mediante ruptura proteolítica. La OPN de origen mamífero, durante el paso por el tracto digestivo de un sujeto mamífero, es expuesta a enzimas proteolíticas, en particular a las endoproteasas pepsina, tripsina y quimotripsina. Los péptidos de OPN activos según la presente invención son péptidos que retienen la actividad después de exposición a las proteasas presentes típicamente en el tracto digestivo de un mamífero. Los péptidos de OPN activos pueden incluir típicamente péptidos que comprenden parte o todas las estructuras de unión a integrina, que típicamente tienen una longitud de entre 5 y 16 residuos de aminoácido.

15 I. ii *La OPN láctea de origen mamífero potencia las respuestas inmunes específicas inducidas en un mamífero por vacunación*

20 La OPN láctea de origen mamífero según la invención comprende el polipéptido de OPN de longitud completa (fOPN) y/o al menos un polipéptido o péptido activo de OPN truncada (tOPN) que es capaz de potenciar la capacidad de respuesta inmune de un mamífero, y aumentar de este modo la respuesta inmune específica inducida en un mamífero por exposición a (y opcionalmente infectado con) una enfermedad infecciosa o por vacunación. Una respuesta inmune específica en un mamífero expuesto a (o infectado por) una enfermedad infecciosa o en un mamífero vacunado comprende la producción de una población de moléculas de anticuerpo que reaccionan selectivamente con el antígeno presente en el agente de la enfermedad infecciosa (los ejemplos de enfermedades infecciosas y sus agentes se detallan en II i) o en la vacuna. El término "activo" en relación a un polipéptido o péptido de OPN truncada de la presente invención se define como la capacidad de potenciar la respuesta inmune específica de un mamífero a una enfermedad infecciosa o a vacunación.

30 El título de anticuerpos específicos inducidos mediante vacunación se usa habitualmente como indicador *in vivo* de la respuesta inmune integrada tras la vacunación; además de ser un indicador de la protección clínica que puede ser conferida que es específica para una vacuna dada (Albers et al. 2013).

35 El efecto de administrar OPN láctea bovina en la respuesta inmune específica inducida en un mamífero mediante vacunación se muestra en el Ejemplo 1. En este ejemplo, los lechones alimentados con una dieta de fórmula suplementada con OPN láctea bovina, respondieron a la vacuna de Fluzone, produciendo IgGs específicos de Fluzone a lo largo de un periodo de 21 días, cuyo título en las muestras de suero de lechón fue significativamente mayor que en el suero procedente de los lechones alimentados con fórmula de control, mientras que coincidía con los niveles de IgG observados en lechones que recibieron leche de cerda que contiene OPN porcina nativa.

40 Una respuesta inmune específica en un mamífero vacunado puede ser determinada detectando directa o indirectamente y cuantificando los anticuerpos presentes en una muestra de fluido corporal derivada del mamífero que puede formar un complejo con el(los) antígeno(s) de vacuna. Cuando la vacuna es particulada, por ejemplo una vacuna inactivada de célula entera, se puede usar un test de aglutinación cuantitativo (grupo de células) para determinar la dilución en serie de la muestra de fluido corporal que contiene suficientes anticuerpos específicos para inducir la agrupación de células de la vacuna de células enteras. Cuando la vacuna es soluble, por ejemplo una vacuna de subunidad proteínica o de péptido, un método adecuado para la detección de anticuerpos específicos es el Ensayo Inmunsorbente Ligado a Enzima (ELISA). El uso del método ELISA para la detección de anticuerpos se ilustra en el Ejemplo 1.3, donde se detectan anticuerpos de IgG específicos de vacuna de Fluzone usando un ensayo ELISA específico para cerdos.

45 I. iii *La OPN láctea de origen mamífero potencia la capacidad de respuesta inmune humoral de un mamífero*

50 Sorprendentemente, la administración oral de OPN, por ejemplo en la forma de un suplemento de OPN a la dieta, induce una fuerte estimulación de inmunidad humoral, tal como para proporcionar niveles potenciados de IgGs específicos de antígeno en mamíferos vacunados y un nivel generalmente más alto de IgG. Esto se muestra en el Ejemplo 1, en el que lechones que recibieron una dieta de fórmula suplementada con OPN se comparan con lechones alimentados con dieta de fórmula o amamantados por cerda. Se cree que la causa de esta respuesta subyace en una serie de modificaciones del sistema inmune observadas en los lechones que recibieron una dieta de fórmula-OPN. En primer lugar, los lechones que recibieron una dieta suplementada con OPN presentan niveles elevados de IL-10 cuando se comparan con los lechones alimentados con fórmula de control o con los amamantados por cerda, lo cual contribuye a la inducción de una respuesta Th2 y estimula la diferenciación de

células B en células secretoras de anticuerpos, lo que conduce a niveles de IgG más altos. La producción inducida por OPN de IL-10 también desempeña un papel en la inhibición de las respuestas de Th1 en procesos posteriores, tal como la activación de macrófagos y en las respuestas pro-inflamatorias.

5 En segundo lugar, los niveles elevados de IL-12 observados en el suero de lechones alimentados con fórmula de OPN estimularía la diferenciación de células Th1, lo que a su vez conduciría a la activación de las células B diferenciadas, induciéndolas a secretar anticuerpos (IgGs). La inducción de esta respuesta humoral en los lechones que recibieron una dieta suplementada con OPN se refleja en los niveles significativamente elevados de células T colaboradoras que secretan CD4 y en los niveles relativamente menores de células T citotóxicas que secretan CD8, cuando se compara con el perfil de linfocitos de células derivadas de lechones alimentados con fórmula o amamantados por cerda. La población de células T colaboradoras, a través de los sistemas Th1 y Th2, contribuye a la respuesta humoral observada y, de forma destacada, a los niveles potenciados de IgG específicos de antígeno después de vacunación. En el caso de lechones criados con dieta de fórmula, la adición de OPN a la dieta mejora la respuesta a la vacunación a los niveles observados en los lechones alimentados por cerda. Estos estudios proporcionan la evidencia de que la adición de OPN a la dieta tiene la capacidad de potenciar y elevar la respuesta inmune a la vacunación, y con ello mejorar la inmunidad al antígeno en la vacuna administrada. Esta conclusión viene soportada por el hecho de que el título de anticuerpos inducidos con la vacunación es al menos una correlación relativa de protección frente a la enfermedad conferida por la vacunación (Plotkin, SA., 2008).

I. iv *La OPN láctea de origen mamífero potencia la resistencia inmune a una enfermedad infecciosa en un mamífero*

20 La administración oral de OPN láctea de origen mamífero, según la invención, a mamíferos, en particular a niños humanos, potencia su resistencia inmune a enfermedades infecciosas. Esto se demuestra claramente en el ensayo clínico descrito en el Ejemplo 2, en el que se ha monitorizado la frecuencia de los eventos infecciosos midiendo y detectando una temperatura corporal elevada (pirexia) en un niño como síntoma diagnóstico de una enfermedad infecciosa contraída por el niño que está causada por agente infeccioso (p.ej., infección vírica, bacteriana, fúngica o de agente patógeno eucariótico tal como un protozoo).

25 I. v *Preparación de OPN láctea de origen mamífero adecuada para administración*

30 La OPN láctea de origen mamífero, que está presente en la leche de un mamífero lactante, puede purificarse para proporcionar una fuente enriquecida de OPN, que puede tener una pureza de al menos aproximadamente 50% a aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 60% a aproximadamente 70%, o al menos aproximadamente 70% a aproximadamente 80%. En algunas realizaciones, tiene una pureza de al menos aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, mientras que en otras realizaciones, la fuente de OPN láctea tiene una pureza de al menos aproximadamente 90% a aproximadamente 95%, o más. En determinadas realizaciones, la fuente purificada de OPN láctea tiene una pureza de al menos aproximadamente 95%, tal como 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, o más.

35 En realizaciones específicas, la fuente de la OPN es una preparación de OPN láctea bovina purificada, tal como por ejemplo Lacprodan OPN-10® (Arla Foods Ingredients, Viby, Dinamarca) (ver también la Patente de EE.UU. N° 7.259.243). Lacprodan OPN-10® comprende aproximadamente un 22% (p/p) de OPN láctea bovina de longitud completa y aproximadamente un 65% (p/p) de una isoforma de OPN láctea bovina (una OPN truncada).

I. vi *Formulación y posología de OPN láctea de origen mamífero*

40 La OPN láctea de origen mamífero según la invención, por ejemplo OPN láctea bovina, puede administrarse en una dosis diaria en el rango de aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 5 g/kg de peso corporal del sujeto tratado. Para niños, la dosis de OPN diaria típicamente está en el rango de aproximadamente 5 – 50 mg/kg de peso corporal, preferiblemente 25 – 50 mg/kg de peso corporal para niños que tienen un peso corporal en el rango de peso de 3 a 10 kg. Típicamente, se recomienda administrar 0,5 – 5 g de OPN al día para un adulto, por ejemplo en un volumen de dosis diaria de 100-250 mL. La forma de dosis puede contener OPN láctea de mamíferos en el rango de 0,1 mg – 10 g por forma de dosis. Por ejemplo, la forma de dosis oral puede contener una cantidad de la OPN en el rango de 1 mg – 1 g por forma de dosis. Alternativamente, la forma de dosis oral puede contener una cantidad de la OPN en el rango de 10 mg – 800 mg por forma de dosis. La forma de dosis oral puede contener, p.ej., una cantidad de la OPN en el rango de 25 mg – 500 mg por forma de dosis.

50 La OPN láctea de origen mamífero puede administrarse en la forma de un suplemento nutricional, donde el suplemento comprende la OPN láctea en una cantidad en el rango de 0,01-90% (p/p). Por ejemplo, el suplemento nutricional puede comprender la OPN láctea en una cantidad en el rango de 0,1-80% (p/p). Alternativamente, el suplemento nutricional puede comprender la OPN láctea en una cantidad en el rango de 1-70% (p/p).

55 En algunas realizaciones de la invención, el suplemento nutricional comprende la OPN láctea en una cantidad en el rango de 5-60% (p/p). Por ejemplo, el suplemento nutricional puede comprender la OPN láctea en una cantidad en el rango de 10-50% (p/p). Alternativamente, el suplemento nutricional puede comprender la OPN láctea en una cantidad en el rango de 0,1-20% (p/p).

En otras realizaciones de la invención el suplemento nutricional comprende la OPN láctea en una cantidad en el rango de 0,001-5% (p/p). Por ejemplo, el suplemento nutricional puede comprender la OPN láctea en una cantidad en el rango de 0,005-2% (p/p). Alternativamente, el suplemento nutricional puede comprender la OPN láctea en una cantidad en el rango de 0,01-1% (p/p). El suplemento nutricional puede comprender, p.ej., la OPN láctea en una cantidad en el rango de 0,05-0,5% (p/p). Típicamente, una bebida nutricional lista-para-beber comprende OPN láctea en una cantidad en el rango de 0,005% a 0,05% (p/p).

Los suplementos nutricionales que comprenden la OPN láctea se pueden pre-empaquetar en forma líquida o en polvo (por ejemplo, bebida líquida enlatada o embotellada). En algunas realizaciones, la forma en polvo se añade a un alimento o bebida para proporcionar nutrientes adicionales. En determinadas realizaciones, las bebidas nutricionales se formulan, por ejemplo, con fruta, verduras, yogur, leche y/o helado. En algunas realizaciones, los suplementos nutricionales se mezclan hasta obtener una consistencia de batido. En realizaciones particulares, las bebidas nutricionales se refuerzan, por ejemplo, con proteína, vitaminas, minerales, antioxidantes, probióticos, y/o prebióticos. En determinadas realizaciones, las bebidas nutricionales están libres de lactosa y/o de gluten. En algunas realizaciones, los suplementos nutricionales son orgánicos. Los ejemplos de bebidas nutricionales pediátricas incluyen PEDIASURE®, PEDIASMART® y RESOURCE® *Just For Kids*. Los ejemplos de bebidas nutricionales para adultos incluyen ENSURE®, BOOST®, NESTLE®, CARNATION® INSTANT BREAKFAST®, GLUCERNA®, GLYTROL®, NUTREN® y PEPTAMEN®. Los suplementos nutricionales también incluyen leche, tanto leche de soja como leche de vaca (por ejemplo, entera, semi-desnatada o baja en grasa, desnatada o sin grasa (por ejemplo Cravendale), sin lactosa (por ejemplo, LACTOFREE®).

I. vii *Administración de OPN láctea de origen mamífero*

La OPN láctea de origen mamífero, formulada para administración oral a un mamífero (que incluye suplementos o bebidas nutricionales que comprenden OPN láctea de origen mamífero), tal como se describe en I v, puede administrarse a un mamífero antes, simultáneamente o con posterioridad a la vacunación, o una combinación de las mismas. Preferiblemente, la administración oral de la OPN láctea se inicia antes de la vacunación y la administración continúa al menos hasta que se administra la vacunación. Cuando la administración de OPN láctea se inicia antes de la vacunación, es preferible que la administración se inicie al menos 1 – 21 días antes de la vacunación, típicamente al menos 1-7 días antes de la vacunación, y se continúa al menos hasta que la vacunación es administrada. De forma ventajosa, el periodo de administración de OPN láctea puede extenderse adicionalmente tras la vacunación durante al menos otras 1-4 semanas. Si la vacunación del mamífero incluye una vacunación de recuerdo, el periodo de administración de OPN láctea (o de las formulaciones de la misma) preferiblemente se extiende al menos hasta la administración de la vacuna de recuerdo.

II Vacunas

II. i *Vacunas para tratamiento profiláctico y terapéutico de mamíferos*

Las vacunas pueden tener una función tanto profiláctica como terapéutica, en donde el tratamiento profiláctico o terapéutico puede usarse para aumentar la resistencia inmune a una enfermedad infecciosa en un mamífero, reduciendo con ello el riesgo de infección o tratando una infección existente.

Según una realización la vacuna se usa para aumentar la resistencia inmune a una enfermedad infecciosa, donde la vacuna comprende un inmunógeno capaz de inducir una respuesta inmunogénica en un sujeto mamífero. El inmunógeno puede comprender una suspensión de un agente infeccioso vivo (preferiblemente atenuado) o de un agente infeccioso muerto (por ejemplo, un microorganismo tal como una bacteria o virus, un parásito, u otro patógeno) que cause una enfermedad infecciosa. Alternativamente, el inmunógeno puede comprender un polipéptido inmunogénico, por ejemplo un polipéptido derivado de un agente infeccioso que puede ser un antígeno y que por lo tanto activa una respuesta inmune en un animal. En otras realizaciones, el inmunógeno puede ser un ácido nucleico, tal como un vector recombinante (que incluye vectores o plásmidos de ADN, vectores retrovirales y vectores de lentivirus) que codifica un antígeno y puede administrarse, p.ej., como parte de una vacuna de ADN.

En una realización, el inmunógeno es derivado de un patógeno seleccionado entre patógenos víricos, bacterianos, fúngicos o protozoos de mamíferos (p.ej., humanos). Las enfermedades infecciosas que pueden ser tratadas con una vacuna según la invención incluyen difteria, tétanos, tos ferina y polio (habitualmente tratadas con una vacuna combinada, p.ej., vacuna TaP/IPV; MMR: sarampión, paperas y rubeola (p.ej., vacuna MMR); tuberculosis (p.ej., vacuna BCG); hepatitis B (p.ej., vacuna de hepatitis B); meningitis C (p.ej., vacuna de meningitis C); virus del papiloma humano (HPV) como agente causante de cáncer cervical/anal y verrugas genitales (p.ej., vacuna de HPV); gripe de tipo a y de tipo b (p.ej., vacuna Flu); infección de neumococos (vacuna de neumococos); rotavirus (vacuna de rotavirus) y herpes (vacuna del Herpes zoster). La vacunación contra herpes está muy limitada a personas mayores, mientras que la vacunación contra todas las demás enfermedades enumeradas es relevante para todos los grupos de edad, aunque la vacunación se administra principalmente durante la infancia temprana.

II. ii *Formulación de una vacuna para tratamiento profiláctico y terapéutico*

Una vacuna generalmente comprende una dosis terapéuticamente efectiva de un inmunógeno (p.ej., un antígeno de un agente infeccioso, antígeno tumoral, células tumorales fijas) y, preferiblemente, un adyuvante y/o un vehículo

farmacéuticamente aceptable. El término “adyuvante” se refiere a un compuesto o mezcla que potencia la respuesta inmune a un antígeno. Un adyuvante puede servir, p.ej., como un depósito de tejido que libera lentamente el antígeno, y también como un activador del sistema linfóide que potencia la respuesta inmune 10 (véase Hood et al., Immunology, Segunda Ed., 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, CA, p. 384). Los ejemplos de adyuvantes incluyen, aunque sin limitación, adyuvante de Freund (completo e incompleto), saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sustancias tensioactivas (por ejemplo, lisolectina), polioles Pluronic (p.ej., Carbopol), polianiones, polipéptidos (p.ej., albúmina de suero bovina, ovoalbúmina), aceite o emulsiones de hidrocarburos (p.ej., mono-oleato de manida (Aracel A)), hemocianinas de lapa de ojo de herradura, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (Bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

10 II. iii *Protocolo de inmunización y posología*

Las vacunas se administran de una manera compatible con la formulación de dosis, y en una frecuencia y cantidad tales que sean profiláctica y terapéuticamente efectivas e inmunogénicas. La vacuna se administrará típicamente como una vacuna pre-infección, pero puede administrarse como vacuna post-infección. Según una realización, un protocolo de inmunización estándar comprende una vacunación primaria que puede venir seguida de una o más vacunaciones de recuerdo administradas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más semanas después. La cantidad a administrar depende de la edad y del peso del sujeto a tratar, que incluye, p.ej., la capacidad del sistema inmune del individuo para montar una respuesta inmune, y del grado de protección deseado. Los rangos de dosis adecuados son del orden de varios cientos de microgramos de los polipéptidos de la vacuna de subunidad sencilla o multi-etapa por vacunación con un rango preferido de aproximadamente 0,1 µg a 1000 µg, tal como en el rango entre aproximadamente 1 µg y 300 µg, y especialmente en el rango de entre aproximadamente 4 µg y 100 µg.

20 II. iv *Administración de una vacuna*

Cualquiera de los métodos convencionales para administración de una vacuna es aplicable, incluyendo administración oral, nasal o mucosal, tanto en forma sólida que contenga los ingredientes activos (tal como una píldora, supositorio o cápsula) como en una dispersión fisiológicamente aceptable, tal como un spray, polvo o líquido, o parenteralmente, mediante inyección, por ejemplo, aplicada subcutáneamente, intradérmicamente o intramuscularmente o transdérmicamente.

Las formulaciones de vacuna adecuadas para administración como supositorios incluyen aglomerantes y vehículos tradicionales (p.ej., almidón de maíz pregelatinizado, polialcalen glicoles o triglicéridos); dichos supositorios pueden conformarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el rango de 0,5% a 10%, preferiblemente 1-2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes empleados normalmente tales como, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico, de grado farmacéutico, y otros similares. Estas composiciones adoptan la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos, y de forma ventajosa contienen 10-95% de ingrediente activo, preferiblemente 25-70%.

35 III *Grupos de población que responden a la administración oral de OPN láctea de origen mamífero*

La presente invención está dirigida a la administración oral de OPN láctea de origen mamífero para potenciar la respuesta inmune específica inducida en un mamífero por exposición a (y opcionalmente infectado con) una enfermedad infecciosa o por vacunación. El mamífero puede seleccionarse entre porcino, rumiante, equino, felino, canino y un primate. Preferiblemente, el mamífero es un sujeto humano. Los grupos de población para los cuales la administración oral de OPN láctea de origen mamífero es particularmente beneficiosa son los recién nacidos o los niños pequeños, particularmente durante el periodo de vacunación de enfermedades infantiles (ver I ii); así como individuos que tienen un sistema inmune que se ha visto reducido, comprometido o en declive, como en el caso de algunos adultos y en las personas mayores. El sujeto humano pertenece a estos grupos de población y puede ser seleccionado entre individuos que pertenecen a los grupos de edad 0-5, 6-11, 12-18, 19-34, 35-44, 45-54, 55-64, 65-74, 75-84, y mayores de 84 años de edad.

EJEMPLO 1

1. Protocolo

1.1 *Población animal de ensayo y diseño del estudio*

Se adquirieron cerdas preñadas (~ día 84 de gestación; n=3) que no habían sido vacunadas previamente en *Midwest Research Swine* (Gibson, MN). Se tomaron muestras de sangre de las cerdas para evaluar el IgG específico de FZ mediante ensayo ELISA (FZ es la vacuna de la gripe humana Fluzone™). Las cerdas con los títulos más bajos de IgG específico de FZ fueron seleccionadas para el estudio. Tras la recepción, las cerdas seleccionadas fueron vacunadas con LitterGuard LT-C (Bacterina-Toxoide de *Clostridium perfringens* Tipo C y *Escherichia coli*; Pfizer Animal Health, Exton, PA), RespiSure1 One (Bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae*; Pfizer), y Rhinogen BPE (Bacterina-toxoide de *Bordetella bronchiseptica*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Pasteurella multocida*; Intervet Inc., Millsboro, DE), seguido de una vacunación de recuerdo 2 semanas antes del parto. Las cerdas no recibieron vacunación contra el virus de la gripe porcina (SIV). Las cerdas fueron alojadas en lechos de

cría y se les aplicó una dieta de gestación enriquecida con un antibiótico (BMD). Se permitió que las cerdas dieran a luz de forma natural y los lechones recibieron calostro durante 4 horas post-parto, periodo durante el cual los lechones captan los anticuerpos presentes en el calostro de la cerda y adquieren una inmunidad pasiva frente a infecciones comunes para las cuales las cerdas habían sido vacunadas.

5 1.2 Grupos dieta de animales y programa de vacunación

A continuación los lechones fueron divididos aleatoriamente en tres grupos de dieta, que recibieron una fórmula sustitutiva de leche de cerda (FF; n=10) o fórmula suplementada con 140 mg/L de OPN láctea bovina (Lacprodan OPN-10 suministrada por Arla Food Ingredients Group I/S, Sønderhøj 10 – 12, 8260 Viby J, Dinamarca) (OPN; n=12) (la fórmula sustitutiva de leche de cerda es LiquiWean obtenida de Milk Specialities, Dundee, IL), mientras que el
10 lechones FF y OPN fueron alojados individualmente en jaulas preparadas en cuartos controlados ambientalmente (25°C). La fórmula sustitutiva de leche de cerda (basada en proteína láctea de vaca) se preparó diariamente y se ofreció 22 veces con una tasa de 360 mL/kg/d.

En el día 7, la mitad de los lechones de cada grupo de dieta (SR, FF, OPN) fueron vacunados (SRV, FFV, OPNV) con una inyección intramuscular de 0,25 mL de vacuna de la gripe humana (Fluzone™, Sanofi Pasteur, Swiftwater, PA). Los lechones vacunados recibieron una vacunación de recuerdo (con una dosis igual a la primera vacunación) en el día 14.

1.3 Análisis de las concentraciones en suero de anticuerpos en sueros derivados de muestras sanguíneas

Se tomaron muestras de sangre en el día 7 (línea base, antes de la vacunación) y en el día 14 mediante punción yugular; y nuevamente en el día 21 mediante punción intra-cardíaca (justo antes de la eutanasia).
20

Se determinó la IgG específica de Fluzone en suero derivada de todas las muestras de sangre usando un ELISA desarrollado en nuestro laboratorio. Resumidamente, se recubrieron placas de fondo plano (Nunc, Rochester, NY) con vacuna Fluzone™ dializada con una dilución 1:80 en tampón de recubrimiento [tampón Carb/Bicarb 0,5 M, pH 9,6] y se incubaron durante una noche a 4°C. Después de la incubación, los pocillos fueron bloqueados con un Suero Bovino Fetal (FBS) al 10% en salino tamponado con fosfato (PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Los pocillos fueron lavados tres veces con PBS/0,05% Tween-20 antes de la adición de 50 µL de sueros diluidos en PBS/10% FBS e incubados durante 1h a 37°C. Las placas se volvieron a lavar con PBS/Tween seguido de la adición de IgG anti-cerdo de cabra conjugada a peroxidasa (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) con una dilución de 1:400 en PBS/10% FBS durante 1h a 37°C. TMB (BD Biosciences, San Jose, CA) e incubadas durante
25 20 minutos a RT, seguido de la adición de 50 µL de ácido sulfúrico 2N. Se midió la absorbancia a 450 nm para cada pocillo con un SpectraMax M2e (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). En cada placa se incluyeron muestras de reserva de suero positivo, que comprendía cantidades conocidas de IgG específica de Fluzone, en diluciones que oscilaban entre 1:2.000 y 1:80.000 y se usaron para proporcionar una curva de calibrado para la concentración de IgG específica de Fluzone. La IgG específica de Fluzone se expresó en unidades arbitrarias calculadas a partir de la porción lineal de la curva de calibrado.
30 35

Se midieron las concentraciones totales de IgG e IgM en sueros derivados de las muestras sanguíneas extraídas usando kits ELISA disponibles comercialmente (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX).

1.4 Análisis estadístico de concentraciones de anticuerpos en suero

Los niveles en circulación de inmunoglobulina (IgG específica de FZ, IgG total e IgM total) fueron evaluados usando análisis de mediciones repetidas, con contrastes polinómicos para el tiempo en SAS (Versión 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC). El análisis se llevó a cabo en el conjunto de datos completo y de forma separada en los grupos vacunados y no vacunados. Las medidas llevadas a cabo en muestras de sangre tomadas en el día 21 fueron evaluadas usando análisis Proc Mixed con la camada de origen como variable aleatoria. Los principales efectos analizados fueron la dieta, la vacunación y la interacción de la dieta y la vacunación. La interacción se eliminó del modelo cuando no fue significativa. Los datos se presentaron como media ± SD. Las comparaciones con $p < 0,05$ fueron juzgadas significativas, y aquellas con $p < 0,1$ como una tendencia.
40 45

1.5 Recolección de muestras de tejido de la población animal de ensayo

Antes de la eutanasia en el día 21 post-parto, los lechones fueron sedados con Telazol (7 mg/kg de peso corporal, IM, Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA) y se recogió sangre periférica en tubos a vacío recubiertos de heparina mediante punción intra-cardíaca. A continuación los lechones fueron sometidos a eutanasia por inyección con pentobarbital sódico (72 mg/kg de peso corporal, Fatal Plus, Vortech Pharmaceuticals, Dearborn, MI). El intestino delgado fue seccionado desde el esfínter pilórico y la válvula ileocecal y se midió la longitud intestinal total, y el intestino se cortó a un 10% y un 85% desde el extremo proximal para generar 3 segmentos correspondientes al duodeno, el jejunio y el íleo, respectivamente. También se seccionaron extrajeron muestras de nodo linfático mesentérico (MLN) ileal y de bazo para aislamiento de células mononucleares.
50 55

1.6 Aislamiento de Células Mononucleares Sanguíneas Periféricas (PBMC)

La sangre periférica se diluyó inicialmente con RPMI-1640 (2:1; Life Technologies, Grand Island, NY), a continuación se recubrieron en Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Piscataway, NJ), y se giraron a 400 x g durante 40 minutos a 20°C. Las PBMCs fueron recolectadas de la interfaz de gradiente y lavadas tres veces en tampón de lavado (Disolución Salina Tamponada Hanks, sin Ca⁺⁺, sin Mg⁺⁺, Life Technologies) suplementado con un 2% de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), EDTA 0,01M (Sigma-Aldrich), 50 µg/mL de Gentamicina (Life Technologies) y 1000 U/mL de Penicilina (disolución de 10000 U/mL, Sigma-Aldrich) y 100 µg/mL de Estreptomina (disolución de 10 mg/mL, Sigma-Aldrich). Los glóbulos rojos restantes en la partícula fueron lisados con tampón de lisis (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 10mM y Na₂EDTA 0,1mM). Las PBMCs fueron suspendidas en RPMI-1640 suplementado con un 10% de FBS, Glutamina 2mM, 50 µg/mL de Gentamicina, Piruvato sódico 1mM (Life Technologies), HEPES 20mM (Life Technologies) y 20mM de 1000 U/mL Penicilina/100µg/mL Estreptomina. Se determinó el número de células viables con el Contador Celular Automatizado Countess® (Life Technologies). A continuación las células se usaron para identificación de células fenotípica mediante citometría de flujo o estimulación celular *ex vivo*.

1.6 Aislamiento de células inmunes totales procedentes de bazo y MLN

Las muestras de bazo y MLN se colocaron en tampón de recolección (Disolución Salina Equilibrada de Hank (HBSS), 50 µg/mL de gentamicina, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinaetanosulfónico 0,01M (HEPES), 1000 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina) y se lavaron tres veces con PBS (Life Technologies) + antibióticos (50 µg/mL de gentamicina, 1000 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina). A continuación los tejidos fueron homogeneizados en HBSS y troceados usando Gentle MACS (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). Los homogenatos de tejido fueron colados a través de un colador celular de 100 µm (BD Falcon, San Jose, CA) seguido de otro de 40 µm (BD Falcon). Las células aisladas fueron lavadas tres veces en tampón de lavado después de la lisis de los leucocitos y suspendidas en medio completo (RPMI-1640, 10% de FBS, Glutamina 2mM, 50 µg/mL de gentamicina, piruvato sódico 1mM, HEPES 20mM y 20mM de 1000 U/mL penicilina/100 µg/mL estreptomina). El número de células viables se determinó como se ha descrito anteriormente.

1.7 Identificación fenotípica de PBMC y células inmunes totales aisladas de MLN y bazo

Los fenotipos de sub-poblaciones mononucleares procedentes de sangre periférica, MLN y bazo fueron monitorizados mediante citometría de flujo (BD™ LSRII, Biosciences) usando un panel de mAbs marcados con fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE). Se identificaron los linfocitos T mediante anticuerpos de ratón anti CD4 de cerdo (FITC, Clon 74-12-4) y anti CD8 de cerdo (PE, Clon 76-2-11) (BD Biosciences). Se añadieron diez µL de cada anticuerpo a 1 x 10⁶ células de cada muestra. Los procedimientos de tinción tuvieron lugar en hielo y las muestras fueron retiradas de la luz siempre que fuera posible. En resumen, cada pocillo fue bloqueado con suero de ratón al 5% (Southern Biotec) y 200 µg/mL de IgG de ratón purificada (Invitrogen) durante 5 minutos cada uno. Tras centrifugar, se añadió CD3 a los pocillos y se incubó durante 20 minutos (50 µL: CD3:PE-Cy5) y se volvió a centrifugar. Se añadieron CD4:FITC y CD8:PE (10 µL de cada) y se incubó durante otros 15 minutos más hasta centrifugación. Las células fueron lavadas con PBS/1% BSA/0,1% azida sódica y después se fijaron con paraformaldehído al 2%. Las células fueron evaluadas usando un citómetro de flujo LSRII (BD™, Biosciences). El porcentaje de sub-poblaciones de células T se determinó usando el software FlowJo 7.9 (FlowJo, Ashland, OR). Los eventos CD3+ fueron considerados células T. Los eventos CD3+CD4+CD8- fueron considerados células T colaboradoras, CD3+CD4-CD8+ y CD3+CD4+CD8+ fueron considerados células T citotóxicas y células T de memoria, respectivamente. Los eventos CD3-CD4-CD8+ fueron marcados como células asesinas naturales.

1.7 Estimulación *ex vivo* de células mononucleares sanguíneas periféricas y de células de bazo:

Se llevó a cabo un ensayo de estimulación *ex vivo* como indicador de la capacidad funcional del sistema inmune. Se emplacaron un total de 2 x 10⁶/mL células mononucleares procedentes de sangre y células procedentes de bazo en placas de 96 pocillos en un volumen final de 200 µL de medio de cultivo (medio RPMI que incluye un 20% de suero de ternero fetal, L-glutamina 2 mM, 100 µg/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina) durante 72 h a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Se añadieron 50 µL de una disolución de 10 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA), o 50 µL de una disolución de 0,8 µg/mL de lipopolisacárido (LPS) o 18 µL de una disolución de 180 µg/mL de Fluzone™ a los pocillos en presencia o en ausencia de OPN (10 µL a una concentración de 10 µg/mL). Después de un período de incubación de 72 horas, las placas fueron centrifugadas y los sobrenadantes fueron recuperados para medir la secreción de citoquinas.

1.8 Medida de la secreción de citoquinas en células estimuladas *ex vivo*:

La secreción de citoquinas se midió usando kits disponibles comercialmente para IL-10, IL-6 e IL-12/IL-23 p40 (R&D Systems, Minneapolis, MN). Resumidamente, se recubrieron placas de 96 pocillos durante una noche a 4°C con anticuerpos de captura usando concentraciones recomendadas por el fabricante. Las placas fueron lavadas con Tween 0,05% en PBS y a continuación bloqueadas usando un 1% de BSA en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con Tween al 0,05% en PBS, se añadieron 100 µL de sobrenadante sin diluir a los pocillos y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos fueron lavados de nuevo antes de la

adición del anticuerpo de detección diluido 1:180 en BSA al 1% en PBS, y la placa se incubó durante 2 horas. SE añadió una disolución de conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano a los pocillos y se incubó durante 20 minutos, seguido de la adición de reacción de sustrato TMB (OptEIA, BD Biosciences). Después de una incubación de 20 minutos, la reacción se detuvo con 50 μ L de H₂SO₄ 2N. Se midió la absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda de 450 nm.

2. Resultados

2.1 El suplemento de OPN para lechones alimentados con fórmula no tiene efecto sobre la ganancia de peso corporal

Los lechones de todos los grupos demostraron una ganancia de peso corporal normal. La suplementación de fórmula con OPN o la vacunación no afectaron a la ganancia de peso corporal de los lechones (Figura 2). Los pesos corporales del grupo SR (cuadro interior de la Figura 2) fueron comparables a los alimentados con fórmula desde el nacimiento hasta el día 15, mientras que para el día 16 sus pesos corporales fueron mayores que para FF u OPN.

2.2 El nivel de IgG específica de Fluzone™ en lechones alimentados con fórmula es potenciado por un suplemento en dieta de OPN hasta los niveles de lechones amamantados por cerda.

El título de IgG específica de Fluzone en el suero derivado de lechones de 7, 14 y 21 días de edad se midió mediante ELISA. Se usó una muestra de control positivo como curva de calibración para el cálculo de las cantidades relativas de IgG específica de FZ, y los valores se presenta como unidades arbitrarias (Figura 3). La estadística de medidas repetidas globales demostró un efecto de la vacunación ($p=0,0005$) y del tiempo ($p=0,0001$), pero no un efecto del tratamiento de dieta. Un análisis adicional de la tendencia polinómica del efecto del tiempo demostró contrastes significativos lineales y cuadráticos ($p<0,05$). Los análisis estadísticos post-hoc del grupo no vacunado indicaron que la IgG específica de FZ en circulación generalmente fue baja y no se vio afectada por la dieta. Sin embargo, la concentración de IgG específica de FZ disminuyó significativamente ($p<0,05$) desde el día 7 hasta el día 14 y el 21. La vacunación no tuvo impacto en los niveles en suero de IgG específica de FZ tras la primera dosis de FZ. Para el día 21, tras una dosis de recuerdo administrada el día 14, los animales de los 3 grupos de tratamiento respondieron a la vacuna FZ. La concentración de IgG específica de FZ en lechones OPNV fue similar a la de lechones SRV, y ambas fueron significativamente mayores ($p<0,05$) que en lechones FFV (siendo los niveles medidos en los 3 grupos 371 ± 329 , 400 ± 171 y 137 ± 157 , respectivamente).

2.3 El título de IgG total e IgM total en suero de lechones vacunados y no vacunados decae con el tiempo.

El nivel total de IgG en suero medido mediante ELISA (Figura 4) no se vio afectado por la dieta o la vacunación. Sin embargo, un declive sostenido en los niveles de IgG totales medidos con el tiempo es estadísticamente significativo ($p<0,01$), con un cambio lineal significativo después de un análisis de medida repetida ($p<0,002$). El análisis Proc mixed en el día 21 indicó una estructura de tendencia ($p=0,09$) de niveles totales de IgG mayores en los lechones vacunados en comparación con los no vacunados ($7,5 \pm 2,5$ y $5,9 \pm 2,7$ mg/mL, respectivamente). Adicionalmente, la vacunación aumentó los niveles de IgG total en el grupo OPN aproximadamente al doble (96% de incremento), pero los cambios observados en los lechones FF y SR (0 y 10%, respectivamente) fueron bastante pequeños. Este aumento de los niveles de IgG total refleja una mejor capacidad para generar una respuesta inmune adaptativa en los lechones que reciben un suplemento de OPN en la dieta.

La concentración de IgM total no se vio afectada por la dieta o la vacunación, pero disminuyó inicialmente durante el periodo post-parto ($p<0,001$; con contrastes lineales y cuadráticos a $p<0,0001$). La Figura 5 indica los niveles de IgM total tras agrupar los datos de los grupos no vacunados y vacunados dentro de cada tratamiento de dieta.

2.4 La dieta y la vacunación afectaron al perfil fenotípico de linfocitos

Los fenotipos de sub-poblaciones mononucleares en muestras de bazo, PBMC y MLN tomadas en el día 21 fueron identificados mediante citometría de flujo usando un panel de mAbs marcados con fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE). Las células fueron identificadas como células T citotóxicas, células T colaboradoras, células T de memoria positiva doble o células asesinas naturales (NKC) (Figura 6) tal como se describe en el Ejemplo 1.7. El perfil fenotípico de linfocitos en PBMC y el análisis estadístico (eliminando la interacción dieta*vacunación cuando no es significativa) se presentan en la Tabla 1. Las células T colaboradoras (CD4+), que tiene un papel activo en las respuestas inmunes adaptativas, respondieron a la dieta, pero no a la vacunación. Las células T colaboradoras fueron significativamente mayores en los animales OPN que en los FF y SR (49,4% frente a 42,2% y 41,3%, respectivamente, Figura 7A). Las células T citotóxicas (CD8+), importantes en la defensa del hospedante contra patógenos citosólicos, tampoco se vieron afectadas por la vacunación, mientras que el efecto de la dieta mostró una tendencia a diferencia. El análisis de diferencias de mínimos cuadrados mostró que el % de células T citotóxicas del grupo SR fue significativamente mayor que en el OPN ($p=0,018$) y mayor que el FF a nivel de tendencia ($p=0,06$) (Figura 7B). Para entender mejor el efecto de la dieta sobre la población de células mononucleares, se calculó la proporción de células T colaboradoras a células T citotóxicas (Figura 7C). La ratio T colaboradora a T citotóxica en PBMCs de lechones OPN ($2,73 \pm 0,89$) y FF ($2,24 \pm 0,90$) fue significativamente mayor que la de los animales SR ($1,71 \pm 0,48$). Este aumento de la ratio T colaboradora a T citotóxica indica que el sistema inmune ha sido imprimado

para fabricar anticuerpos específicos de vacuna en los animales vacunados, en particular en aquellos lechones que recibieron una dieta de suplemento de OPN.

5 La población de células T de memoria (doble positivo para CD4+ y CD8+) se vio influida significativamente por la vacunación, mientras que la dieta solo mostró una tendencia ($p=0,052$). La vacunación dio como resultado un 21% de reducción en el % de células CD3+ como células de memoria CD4+CD8+. La población de células NK (CD4+CD3+CD8-) en PBMC cambió tras la vacunación con un aumento significativo ($p<0,05$) desde 14,8% en los animales no vacunados hasta 23,7% en los animales vacunados, pero no hubo efecto de la dieta.

Tabla 1. Distribución de linfocitos en PBMC como % de células CD3+ (células T) o células CD3- (Células Asesinas Naturales).

	Células T citotóxicas (CD3+CD4-CD8+)	Células T de memoria (CD3+CD4+CD8+)	Células T colaboradoras (CD3+CD4+CD8-)	Células NK (CD3-CD4-CD8+)
SR	23,4 ± 1,17	21,3 ± 2,58	41,0 ± 7,62	20,0 ± 19,4
FF	19,8 ± 5,77	15,1 ± 4,67	39,0 ± 4,77	10,3 ± 4,04
OPN	16,9 ± 3,59	14,5 ± 4,10	49,5 ± 8,47	15,2 ± 6,31
SRV	26,0 ± 8,89	12,6 ± 3,34	38,9 ± 3,29	32,4 ± 14,6
FFV	20,7 ± 6,46	12,2 ± 4,47	43,0 ± 7,14	24,2 ± 15,1
OPNV	21,1 ± 4,56	13,2 ± 3,92	48,0 ± 5,0	19,0 ± 7,66
Estadística	Dieta: $p=0,054$ Vacunación: N.S.	Dieta: $p=0,052$ Vacunación: $p<0,01$ Dieta*vac: $p<0,04$	Dieta: $p<0,01$ Vacunación: N.S.	Dieta: N.S. Vacunación: $p<0,03$

10 Los datos se expresan como media ± SD.

15 Las células inmunes fueron aisladas a partir de MLN como se ha descrito en el Ejemplo 1.7 y las poblaciones celulares se identificaron como % de CD3+ y % de CD3- (Tabla 2). La vacunación no tuvo impacto significativo en ninguna de las células inmunes MLN investigadas. El número de células T citotóxicas en el grupo OPN (13,7%) se asemejó estrechamente al del grupo SR (12,0%), y ambos fueron diferentes significativamente a los animales FF (16,6%, Figura 8A). La dieta no cambió el % de células CD3+ como T colaboradoras, pero alteró significativamente ($p<0,05$) la población de células T citotóxicas. De forma similar, los valores de ratio T colaboradora/T citotóxica de OPN y SR fueron comparables y significativamente mayores para el grupo FF (Figura 8B). El aumento de la ratio de células CD4+/CD8+ en PBMC refleja una respuesta humoral adaptativa potenciada a la vacunación en lechones que reciben dieta de OPN. La población de células NK en los lechones SR fue mayor que ambos grupos de fórmula, pero la significancia estadística alcanzó un nivel de tendencia ($p<0,06$).

Tabla 2. Distribución de linfocitos en MLN como % de células CD3⁺ (células T) o células CD3⁻ (Asesinas Naturales).

	Células T citotóxicas (CD3+CD4-CD8+)	Células T de memoria (CD3+CD4+CD8+)	Células T colaboradoras (CD3+CD4+CD8-)	Células NK (CD3-CD4-CD8+)
SR	13,6 ± 3,09	14,6 ± 2,71	55,3 ± 5,47	3,1 ± 1,59
FF	16,3 ± 1,51	15,5 ± 3,19	53,9 ± 2,46	2,0 ± 0,69
OPN	14,4 ± 2,33	13,3 ± 4,36	60,3 ± 5,12	2,1 ± 0,82
SRV	10,5 ± 3,89	15,6 ± 9,39	61,7 ± 13,9	3,1 ± 0,86
FFV	16,8 ± 2,92	15,3 ± 5,15	57,2 ± 3,75	1,9 ± 0,51
OPNV	12,9 ± 3,15	17,3 ± 4,68	57,9 ± 3,82	1,9 ± 1,62
Estadística	Dieta: $p<0,005$ Vacunación: N.S.	Dieta: N.S. Vacunación: N.S.	Dieta: N.S. Vacunación: N.S.	Dieta: $p=0,056$ Vacunación: N.S.

Los datos se expresan como media ± SD.

25 La distribución de células mononucleares aisladas de bazo se muestra en la Tabla 3. Las células T colaboradoras y T citotóxicas de bazo se vieron afectadas por la vacunación pero no por el tratamiento de dieta. El % de CD3+ como células de memoria se vio influido por la dieta y la vacunación. La vacunación aumentó la población de células de memoria, que son importantes para establecer la respuesta adaptativa (humoral). De forma notable, ambos grupos alimentados con fórmula (grupos OPN y FF) presentaron niveles significativamente mayores de células de memoria que el SR (Figura 9). Las células NK fueron significativamente mayores en los animales SR no vacunados en comparación con todos los demás grupos de tratamiento. La vacunación no afectó a los niveles de NK en el bazo.

30 La ratio T colaboradora (CD4+)/T citotóxica (CD8+) también parece aumentar en el bazo de los lechones vacunados, en particular de aquellos alimentados con SR o OPN, lo que refleja una inducción de una respuesta humoral adaptativa.

Tabla 3. Distribución de linfocitos en bazo como % de células CD3⁺ (células T) o células CD3⁻ (Asesinas Naturales).

	Células T citotóxicas (CD3+CD4-CD8+)	Células T de memoria (CD3+CD4+CD8+)	Células T colaboradoras (CD3+CD4+CD8-)	Células NK (CD3-CD4-CD8+)
SR	13,6 ± 3,09	4,7 ± 0,99	55,3 ± 6,98	10,7 ± 4,16 ^a
FF	13,0 ± 5,79	8,6 ± 4,02	46,0 ± 15,7	4,4 ± 1,10 ^b
OPN	13,9 ± 3,61	8,6 ± 3,52	44,9 ± 6,91	4,1 ± 2,70 ^b
SRV	10,5 ± 3,89	5,94 ± 0,58	61,7 ± 13,9	5,9 ± 0,89 ^b
FFV	12,5 ± 4,52	13,0 ± 2,97	48,2 ± 7,30	4,7 ± 1,47 ^b
OPNV	10,8 ± 2,43	10,6 ± 2,19	49,1 ± 5,87	5,8 ± 2,80 ^b
Estadística	Dieta: N.S. Vacunación: p<0,05	Dieta: p<0,01 Vacunación: p<0,01	Dieta: N.S. Vacunación: p<0,04	Dieta: p<0,005 Vacunación: N.S. Dieta*vac: p<0,02

¹ Los datos se expresan como media ± SD.

2.5 Estimulación *ex vivo* y secreción de citoquinas por células inmunes aisladas:

5 Para determinar las respuestas inmunes celulares de PBMC y células de bazo, las células aisladas fueron incubadas durante 72 horas con PHA, LPS o fluzone. La fitohemaglutinina (PHA), una lectina vegetal, y lipopolisacárido (LPS), un componente bacteriano de pared celular, son mitógenos que activan las células T y las células B, respectivamente. La activación de células inmunes conduce a la secreción de citoquinas. La interleucina 6 (IL-6), también conocida como interferón-beta 2, es una citocina pleyotrópica α -helicoidal que es esencial para la transición desde la inflamación aguda a una inmunidad adquirida o una enfermedad inflamatoria crónica. La interleucina 10 (IL-10) es una citocina Th2 anti-inflamatoria, mientras que la interleucina-12 (IL-12) es una citocina Th1 pro-inflamatoria también conocida como factor estimulador de célula asesina natural (NKSF) o factor de maduración de linfocito citotóxico. El cultivo celular *ex vivo* se llevó a cabo en presencia o en ausencia de 10 μ g/mL de OPN en el medio de cultivo. La adición de OPN no tuvo un impacto significativo sobre la secreción de las citoquinas evaluadas, por tanto, los datos de células tratadas con OPN y no tratadas se agruparon. Los datos con concentraciones de citocina (pg/mL) para todos los tratamientos para PBMC y bazo se resumen en las Tablas 4 y 5, respectivamente. Los datos estadísticamente significativos se agruparon entonces en base a las diferencias estadísticas y se muestran en las Figuras 10-17.

20 Células mononucleares sanguíneas periféricas: En PBMC no estimuladas la concentración de IL-6 e IL-10 estuvo por debajo del nivel de detección (Tabla 4). Se detectó IL-12 en el sobrenadante de células no estimuladas y los efectos de dieta y vacunación fueron ambos estadísticamente significativos (p<0,05) (Figura 10). La IL-12 presentó el valor más alto en las PBMC del grupo OPNV en relación al resto de grupos de tratamiento. La estimulación de PHA de citoquinas en PBMC no se vio afectada por la vacunación. Sin embargo, el impacto de la dieta en la secreción de IL-12 fue significativo estadísticamente observándose la mayor secreción en OPNV (Figura 11A). La secreción de IL-10 tendió a diferir entre los grupos de dieta, donde las células obtenidas del grupo OPN tendieron a valores mayores que las de los lechones SR y FF (Figura 11B).

30 Las concentraciones de IL-6 e IL-12 fueron significativamente mayores (p<0,05) en las PBMC estimuladas con LPS originadas a partir de lechones alimentados con OPN en comparación con los grupos SR y FF, independientemente de la vacunación (Figura 12A y B, respectivamente). Se observó una estructura similar en la estimulación con LPS de la secreción de IL-10, donde la exposición a OPN dio como resultado una mayor concentración de IL-10. Adicionalmente, la vacunación dio como resultado niveles de IL-10 mayores en los grupos OPN y SR (Figura 12C).

35 El efecto de la estimulación con Fluzone sobre la IL-12 fue dependiente de la vacunación, con una interacción estadísticamente significativa entre la dieta y la vacunación (Figura 13A). La vacunación dio como resultado una secreción reducida de IL-12 en SRV y FFV, mientras que el grupo OPN permaneció sin cambios. La secreción de IL-10 en células estimuladas con Fluzone fue superior en el grupo alimentado con OPN en comparación con SR y FF, mientras que los lechones vacunados presentaron una menor concentración de IL-10 (Figura 13B).

40 Células inmunes de bazo: las células aisladas procedentes de bazo fueron estimuladas con PHA, LPS y Fluzone y se midió la producción de citoquinas en el sobrenadante recogido después de 72 horas de incubación (Tabla 5). Las células de bazo no produjeron nada de IL-6 en respuesta al estímulo usado en el estudio. Por otro lado, se observó que IL-12 en el sobrenadante de células no estimuladas (Figura 14A). Las células procedentes de los grupos SR y FF secretaron cantidades mayores de IL-12, mientras que la dieta de OPN y la vacunación tendieron (p=0,07) a reducir la concentración de IL-12. La concentración de IL-10 en los sobrenadantes de células no estimuladas fue mayor en el grupo SRV (Figura 14B). La secreción de IL-12 e IL-10 por células de bazo en respuesta a la estimulación con PHA fue similar. La vacunación disminuyó la concentración de IL-12 (Figura 15A) e IL-10 (Figura 15B) cuando se compararon con los niveles observados en los grupos no vacunados. Adicionalmente, el grupo OPN presentó niveles significativamente menores de ambas citocinas que los grupos SR y FF. De forma similar, la secreción de IL-12 en respuesta a LPS fue significativamente mayor en el sobrenadante de células derivadas de

lechones no vacunados que de lechones vacunados ($p < 0,05$) (Figura 16A). Las células obtenidas del grupo OPN secretaron la cantidad más baja de IL-12 en comparación con los grupos SR y FF. La secreción de IL-10 es células estimuladas con LPS no se vio afectada por la vacunación, pero fue mayor en el grupo SR que en los grupos FF y OPN (Figura 16B). Tras la estimulación con Fluzone, la secreción de IL-12 e IL-10 fue la más baja en el grupo vacunado ($p < 0,05$), y las células aisladas de animales OPN secretaron menos IL-12 que los SR y FF (Figura 17).

En conclusión, cuando los lechones recibieron una dieta de fórmula suplementada con OPN, sus células gástricas se exponen a una concentración constante de OPN. Esto es lo contrario que ocurre con los lechones amamantados por cerda en los que el nivel de OPN que reciben disminuye al reemplazarse el suministro de calostro de cerda por leche de cerda, y será menor que los 140 mg/L proporcionados en la dieta de fórmula suplementada con OPN. Los lechones que recibieron la fórmula suplementada con OPN se caracterizan por células inmunes (PBMCs) que secretan más IL-12 e IL-10, cuando se incuban ex vivo ambas en ausencia y en presencia de estimulantes inmunes, en comparación con células derivadas de lechones alimentados con fórmula o amamantados por cerda. Esto proporciona la evidencia de que la OPN de dieta tiene el efecto de imprimir las células PBMC para secretar IL-12 e IL-10. La capacidad de las PBMCs procedentes de lechones alimentados con fórmula de OPN, para secretar IL-12 (pro-inflamatoria) e IL-10 (anti-inflamatoria) tras estimulación con PHA (activación de células T) y LPS (activación de células B) sugiere un mecanismo inmune que se dirige hacia el equilibrio inmune.

EJEMPLO 2

Ensayo clínico con OPN-10 Lacprodan® administrada a niños

2.1 Diseño de ensayo

Se llevó a cabo un ensayo clínico aleatorizado doblemente ciego en Shanghai, China, para evaluar los efectos de añadir OPN bovina a la fórmula. Las madres eligieron alimentar a sus niños con pecho o con fórmula entre 1 y 6 meses de edad. Los grupos fueron los siguientes ($n=60$ /grupo):

- 1) Niños alimentados con pecho
- 2) Niños alimentados con fórmula regular (RF) sin OPN añadida (F0)
- 3) RF con OPN bovina añadida a ~65 mg de OPN/L (F65)
- 4) RF con OPN bovina añadida a ~130 mg de OPN/L (F130)

* Los niveles basales de OPN observados en fórmula regular (no suplementada) son de ~ 15 mg de OPN/L.

Se registró mensualmente la antropometría y se tomaron muestras de sangre venosa por venipunción a los 1, 4 y 6 meses de edad. Se analizó la hematología, los parámetros inmunes, los aminoácidos en plasma y el nitrógeno de urea en sangre (BUN).

2.2. Resultados del ensayo

La incidencia de pirexia en niños en respuesta a la infección (tal como una infección vírica, bacteriana, fúngica o de ameba) aumentó significativamente en niños que recibieron la fórmula regular (F0) en comparación con los niños alimentados con pecho (Figura 18). La adición de OPN a la fórmula regular en una cantidad de 65 mg de OPN/L o de 130 mg de OPN/L redujo la elevada incidencia de pirexia observada cuando se alimenta con fórmula regular, hasta niveles que se aproximan estrechamente a los bajos niveles de incidencia observados en niños alimentados con pecho. El grupo de niños que recibieron la fórmula regular (F0) fue el único grupo en mostrar un aumento estadísticamente significativo en la incidencia de pirexia, en comparación con los niños alimentados con pecho.

Referencias:

- 40 **Albers et al. 2013** Monitoring immune modulation by nutrition in the general population: identifying and substantiating effects on human health. *British J Nutrition* 110(2): 1-22.
- Bissonnette et al 2012**; Proteomic analysis and immunodetection of the bovine milk osteopontin isoforms. *Journal of Dairy Science*, 95(2): 567-579
- Plotkin, SA, 2008**; Correlates of Vaccine-Induced Immunity. *Vaccines* 47: 401-409
- 45 **Sørensen et al 1995**. Posttranslational modifications of bovine osteopontin: Identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylation sites; *Protein Science* 4: 2040-2049

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Aria Foods amba
- 5 <120> Osteopontina láctea de origen mamífero para potenciar la capacidad de respuesta inmune
- <130> P1071EP00
- <160> 1
- 10 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 278
- 15 <212> PRT
- <213> Bos taurus
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- 20 <222> (152)..(161)
- <223> Motivo que comprende dominio de unión a integrina
- <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Arg | Ile | Ala | Val | Ile | Cys | Phe | Cys | Leu | Leu | Gly | Ile | Ala | Ser | Ala |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Pro | Val | Lys | Pro | Thr | Ser | Ser | Gly | Ser | Ser | Glu | Glu | Lys | Gln | Leu |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Asn | Asn | Lys | Tyr | Pro | Asp | Ala | Val | Ala | Thr | Trp | Leu | Lys | Pro | Asp | Pro |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ser | Gln | Lys | Gln | Thr | Phe | Leu | Ala | Pro | Gln | Asn | Ser | Val | Ser | Ser | Glu |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu | Thr | Asp | Asp | Asn | Lys | Gln | Asn | Thr | Leu | Pro | Ser | Lys | Ser | Asn | Glu |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ser | Pro | Glu | Gln | Thr | Asp | Asp | Leu | Asp | Asp | Asp | Asp | Asp | Asn | Ser | Gln |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Asp | Val | Asn | Ser | Asn | Asp | Ser | Asp | Asp | Ala | Glu | Thr | Thr | Asp | Asp | Pro |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | | 110 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Asp | His | Ser | Asp | Glu | Ser | His | His | Ser | Asp | Glu | Ser | Asp | Glu | Val | Asp |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | | 125 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Phe | Pro | Thr | Asp | Ile | Pro | Thr | Ile | Ala | Val | Phe | Thr | Pro | Phe | Ile | Pro |
| | | 130 | | | | 135 | | | | | | 140 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thr | Glu | Ser | Ala | Asn | Asp | Gly | Arg | Gly | Asp | Ser | Val | Ala | Tyr | Gly | Leu |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
- 25

ES 2 656 474 T3

Lys Ser Arg Ser Lys Lys Phe Arg Arg Ser Asn Val Gln Ser Pro Asp
165 170 175

Ala Thr Glu Glu Asp Phe Thr Ser His Ile Glu Ser Glu Glu Met His
180 185 190

Asp Ala Pro Lys Lys Thr Ser Gln Leu Thr Asp His Ser Lys Glu Thr
195 200 205

Asn Ser Ser Glu Leu Ser Lys Glu Leu Thr Pro Lys Ala Lys Asp Lys
210 215 220

Asn Lys His Ser Asn Leu Ile Glu Ser Gln Glu Asn Ser Lys Leu Ser
225 230 235 240

Gln Glu Phe His Ser Leu Glu Asp Lys Leu Asp Leu Asp His Lys Ser
245 250 255

Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Ile Arg Ile Ser His Glu Leu Asp Ser
260 265 270

Ala Ser Ser Glu Val Asn
275

REIVINDICACIONES

1. Osteopontina láctea de origen mamífero para uso como medicamento para potenciar la resistencia inmune a una enfermedad infecciosa en un mamífero, en donde la osteopontina es para administración oral.
- 5 2. Osteopontina láctea de origen mamífero para uso según la reivindicación 1, en donde la leche de origen mamífero se selecciona entre bovino, cabra, oveja, camello, búfalo, dromedario, llama y cualquier combinación de los mismos.
3. Osteopontina láctea de origen mamífero para uso según la reivindicación 1, en donde la osteopontina es bovina y comprende un polipéptido de osteopontina que tiene una secuencia de aminoácidos de los residuos 17 – 278 de la SEQ ID NO: 1; y un polipéptido de osteopontina truncada activo de 40 kDa derivado del polipéptido de OPN mediante ruptura *in vivo* de enlace peptídico en una posición que es C-terminal respecto a la estructura RGD.
- 10 4. Osteopontina láctea de origen mamífero para uso según la reivindicación 1, en donde la osteopontina es bovina y comprende un polipéptido de osteopontina que tiene una secuencia de aminoácidos de los residuos 17 – 278 de la SEQ ID NO: 1, y un polipéptido de osteopontina truncada activo en donde la secuencia de aminoácidos son los residuos 17 – 163 de la SEQ ID NO: 1.
- 15 5. Osteopontina láctea de origen mamífero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el mamífero es un humano.
6. Osteopontina láctea de origen mamífero para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la resistencia inmune a una enfermedad infecciosa en un mamífero es inducida por vacunación.
- 20 7. Osteopontina láctea de origen mamífero para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la enfermedad infecciosa se selecciona entre gripe, difteria, tétanos, tos ferina, polio, sarampión, paperas y rubeola, tuberculosis, hepatitis B, meningitis C, rotavirus, virus de papiloma humano, gripe de tipo a, gripe de tipo b, infección de neumococos y herpes.
8. Una composición nutricional que comprende la osteopontina láctea de origen mamífero para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 25 9. Un sistema de vacuna que comprende una vacuna y una osteopontina láctea de origen mamífero para uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad infecciosa en un mamífero, en donde la osteopontina es para administración oral; en donde la administración de la osteopontina potencia la resistencia inmune inducida por la vacuna.
- 30 10. El sistema de vacuna para uso según la reivindicación 9, en donde la osteopontina se selecciona entre bovino, cabra, oveja, camello, búfalo, dromedario, llama y cualquier combinación de los mismos.
- 35 11. El sistema de vacuna para uso según la reivindicación 9, en donde la osteopontina es bovina y comprende un polipéptido de osteopontina que tiene una secuencia de aminoácidos de los residuos 17 – 278 de la SEQ ID NO: 1 y un polipéptido de osteopontina truncada activo de 40 kDa derivado del polipéptido de OPN mediante ruptura de enlace peptídico *in vivo* en una posición que es C-terminal respecto a la estructura RGD.
- 40 12. El sistema de vacuna para uso según la reivindicación 9, en donde la osteopontina es bovina y comprende un polipéptido de osteopontina que tiene una secuencia de aminoácidos de los residuos 17 – 278 de la SEQ ID NO: 1, y un polipéptido de osteopontina truncada activo en donde la secuencia de aminoácidos son los residuos 17 – 163 de la SEQ ID NO: 1.
- 45 13. El sistema de vacuna para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde la osteopontina es para administración oral previa, simultánea o posterior a la vacunación del mamífero, o una combinación de los mismos.
14. Un sistema de vacuna para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en donde el mamífero es un humano.
15. El sistema de vacuna para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en donde la enfermedad infecciosa se selecciona entre gripe, difteria, tétanos, tos ferina, polio, sarampión, paperas y rubeola, tuberculosis, hepatitis B, meningitis C, rotavirus, virus de papiloma humano, gripe de tipo a, gripe de tipo b, infección de neumococos y herpes.

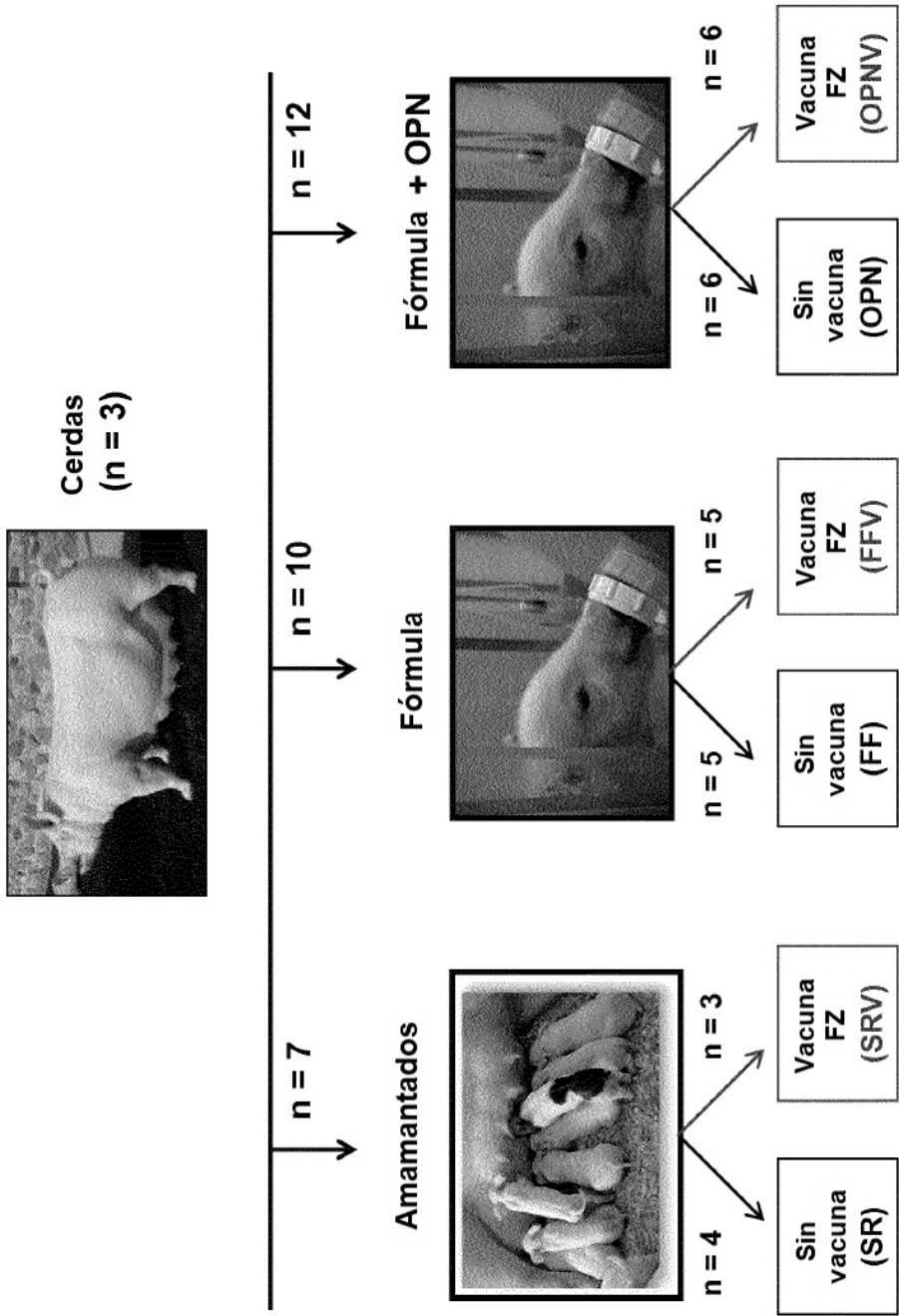


Figura 1

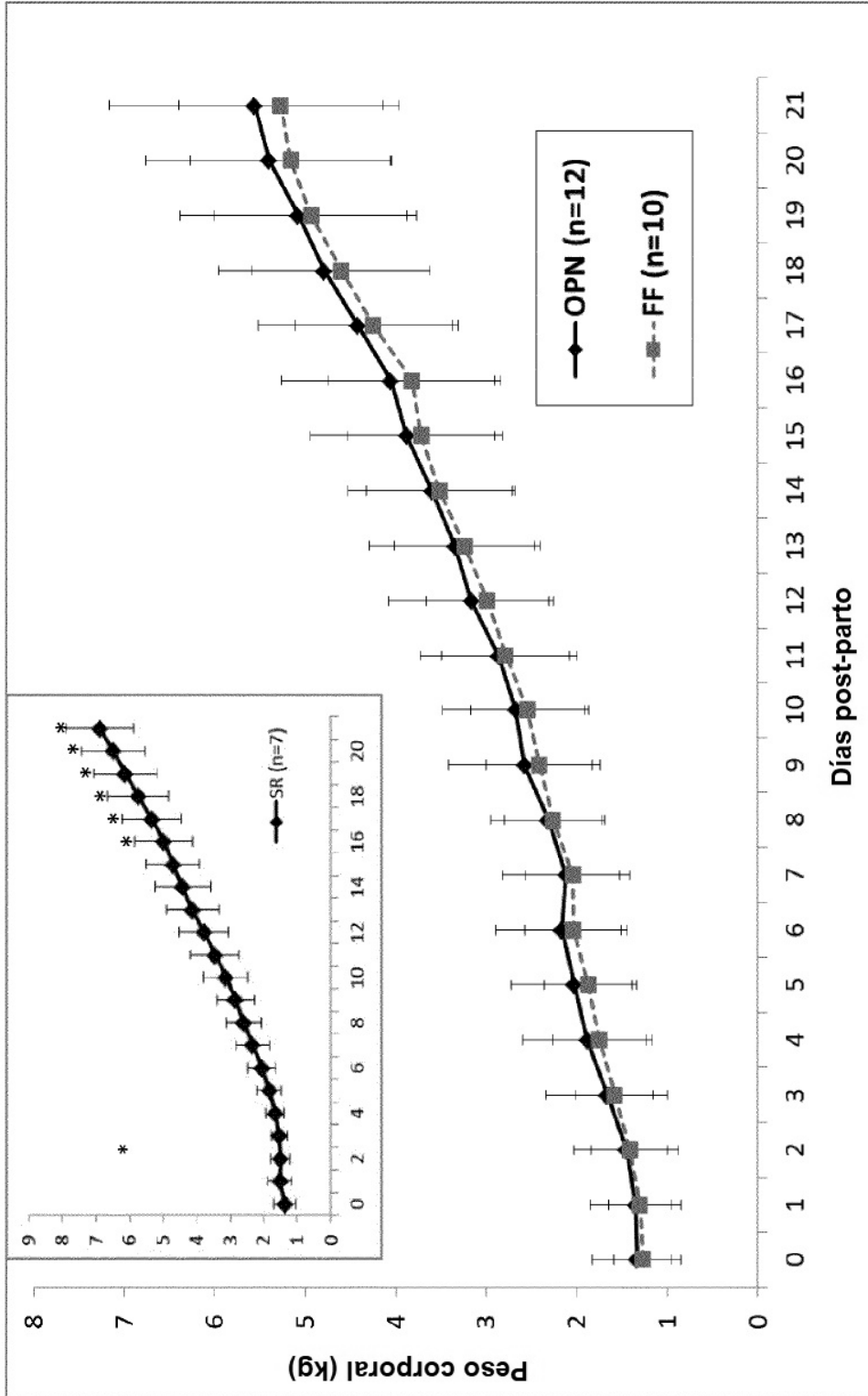


Figura 2

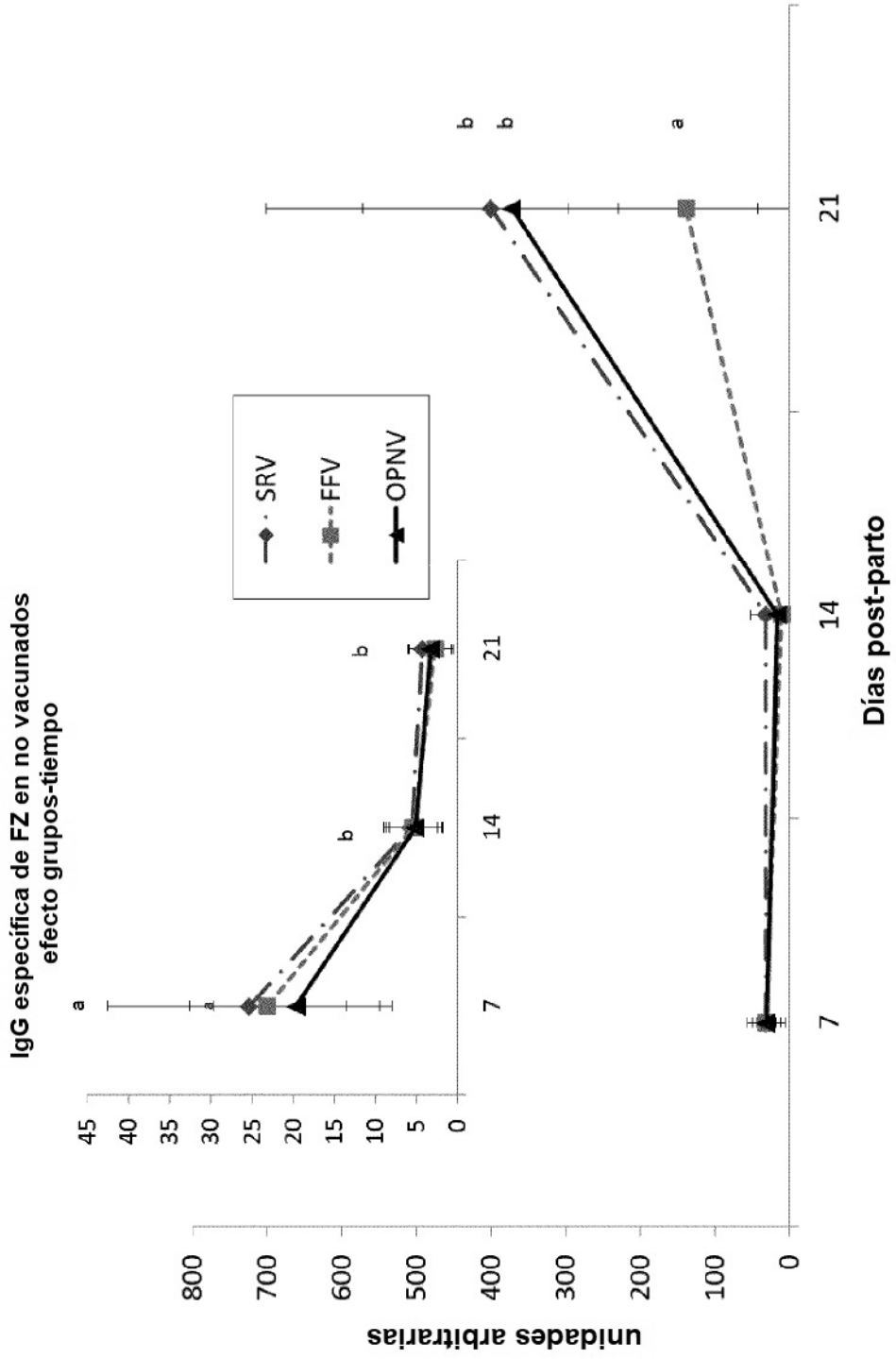


Figura 3

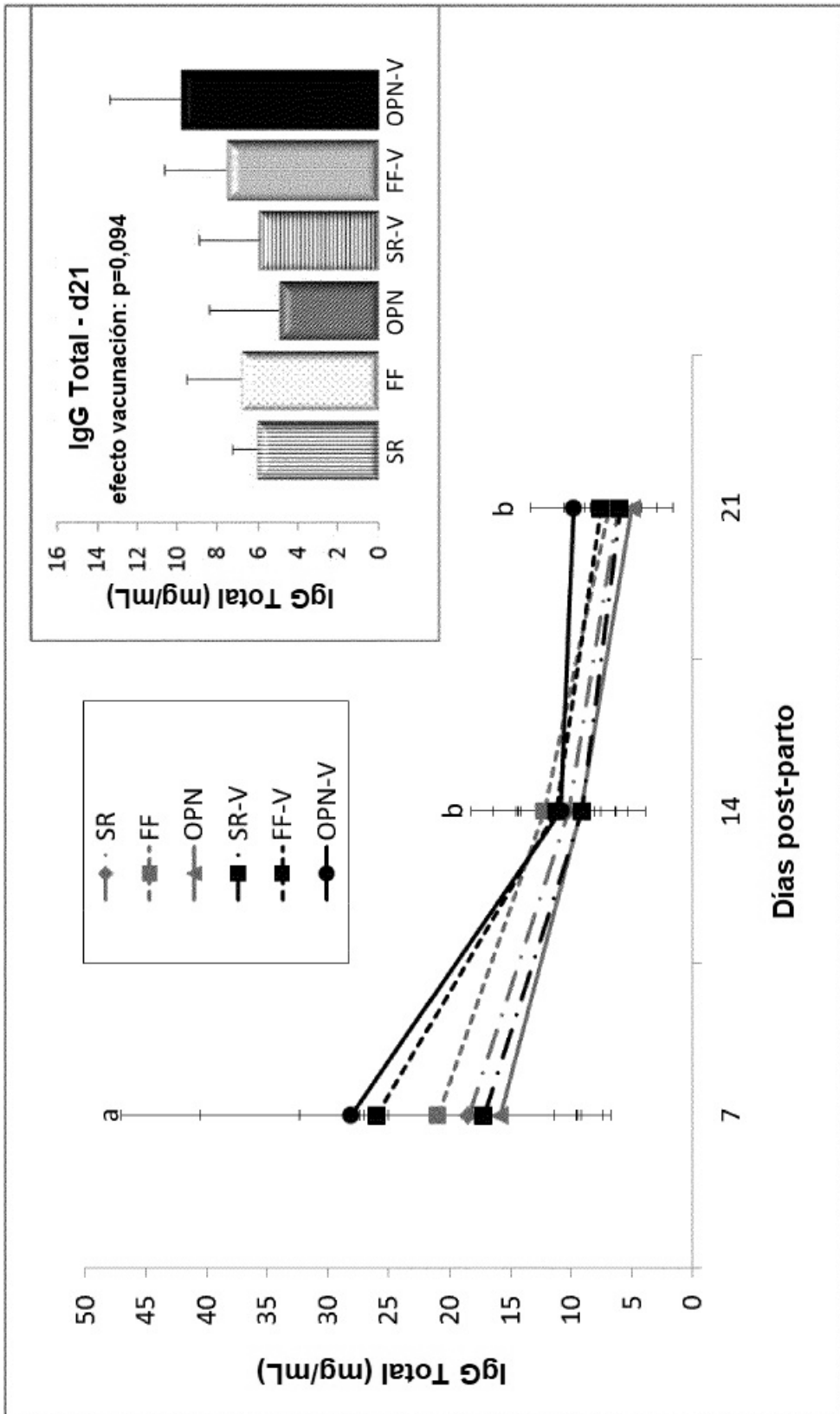


Figura 4

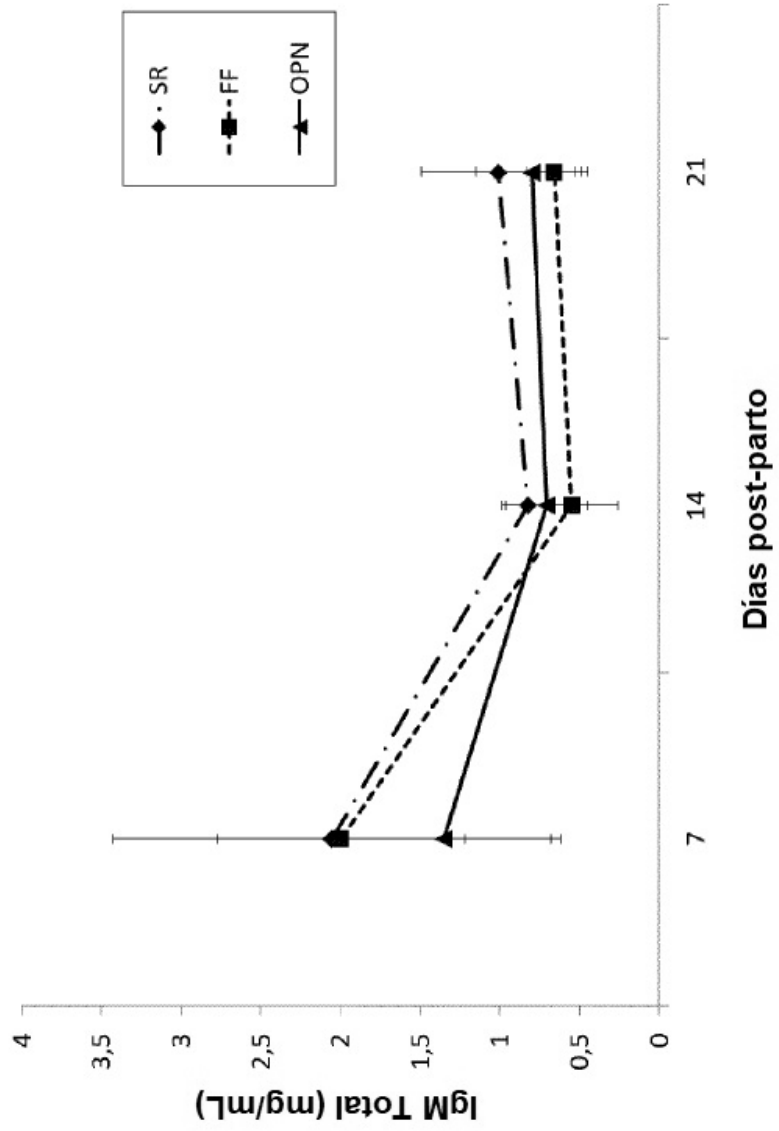


Figura 5

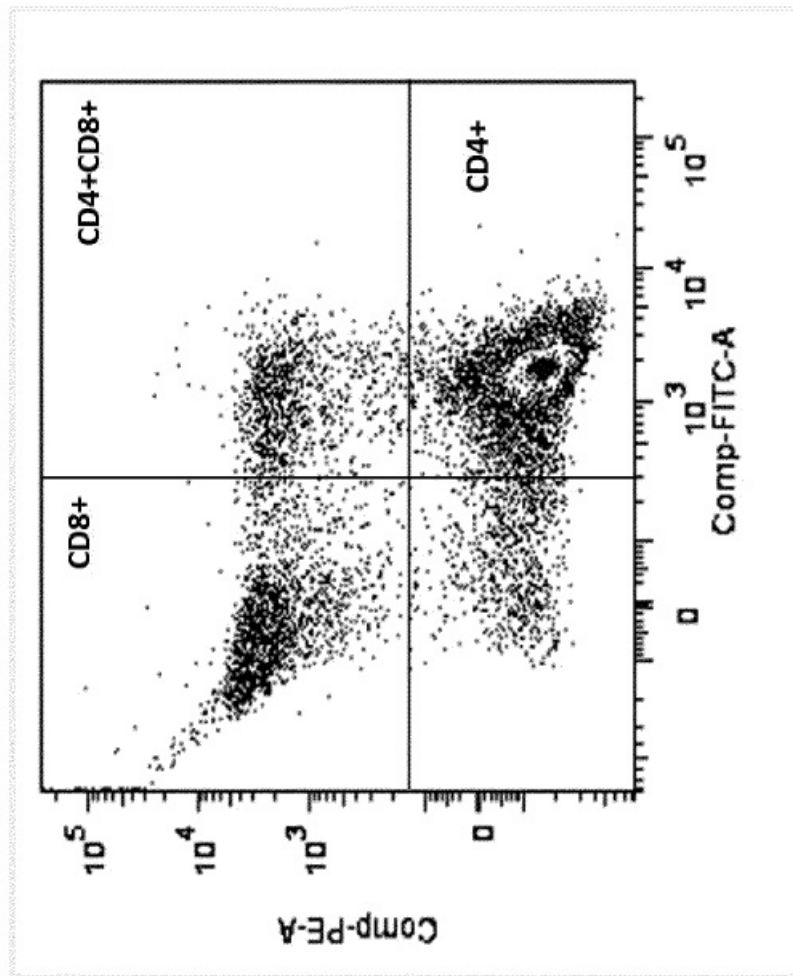


Figura 6

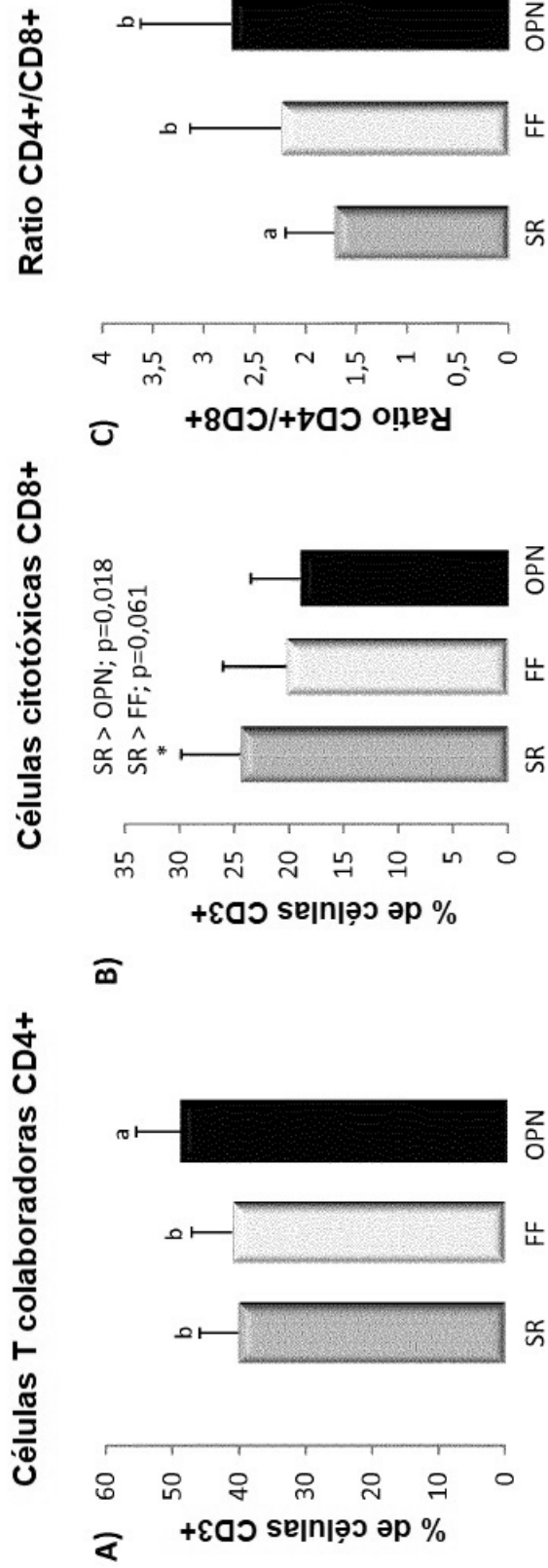


Figura 7

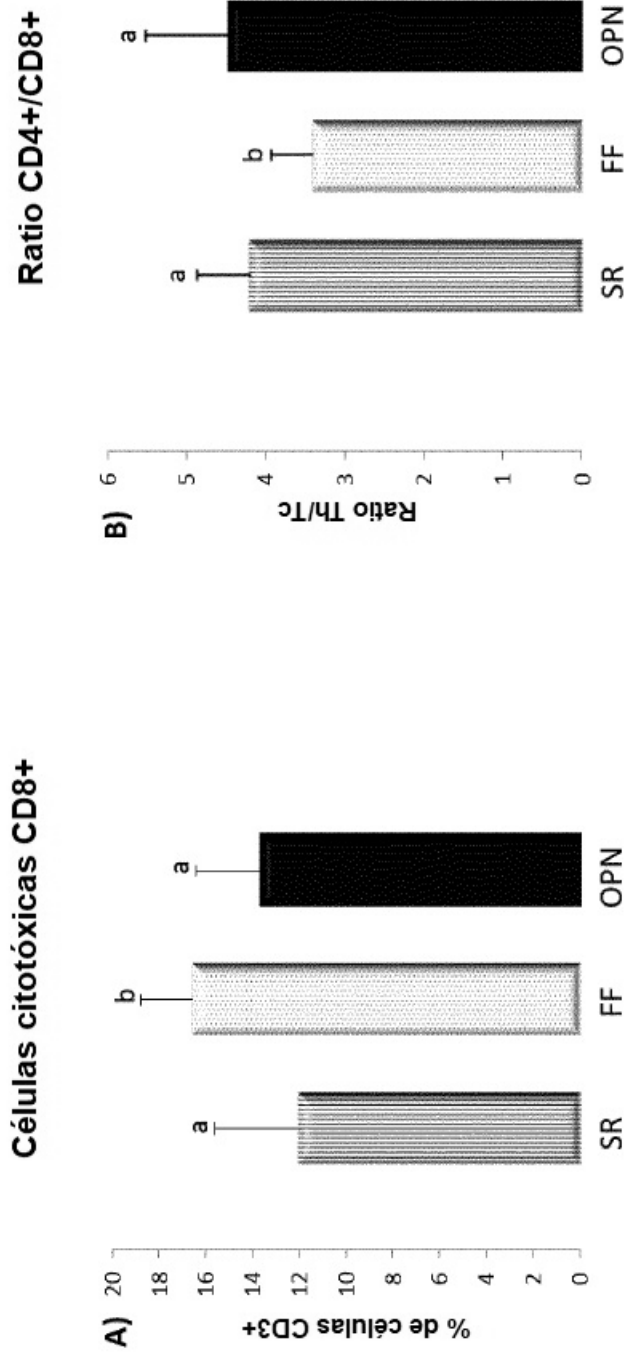


Figura 8

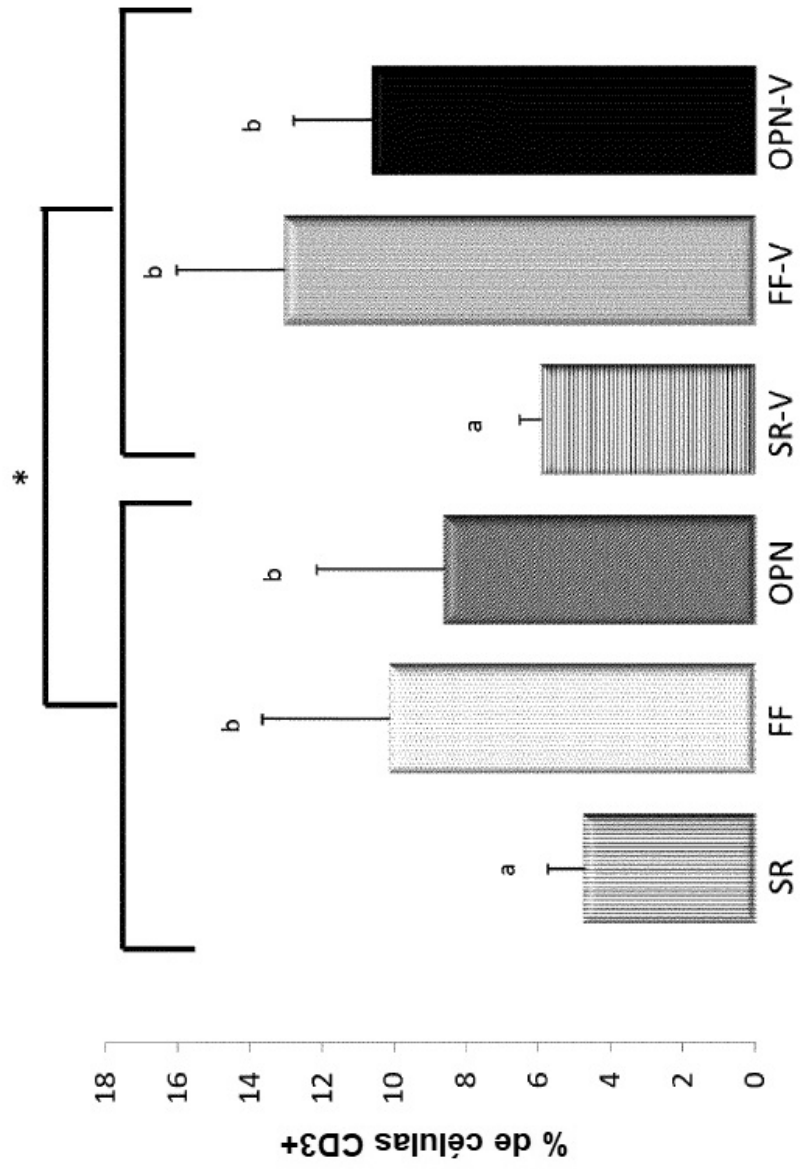


Figura 9

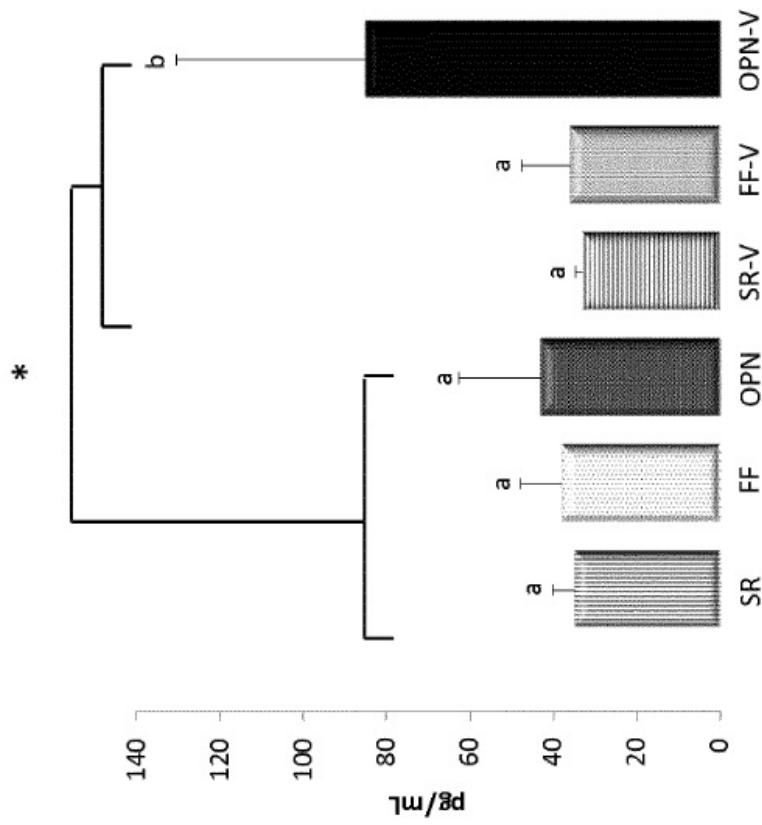


Figura 10

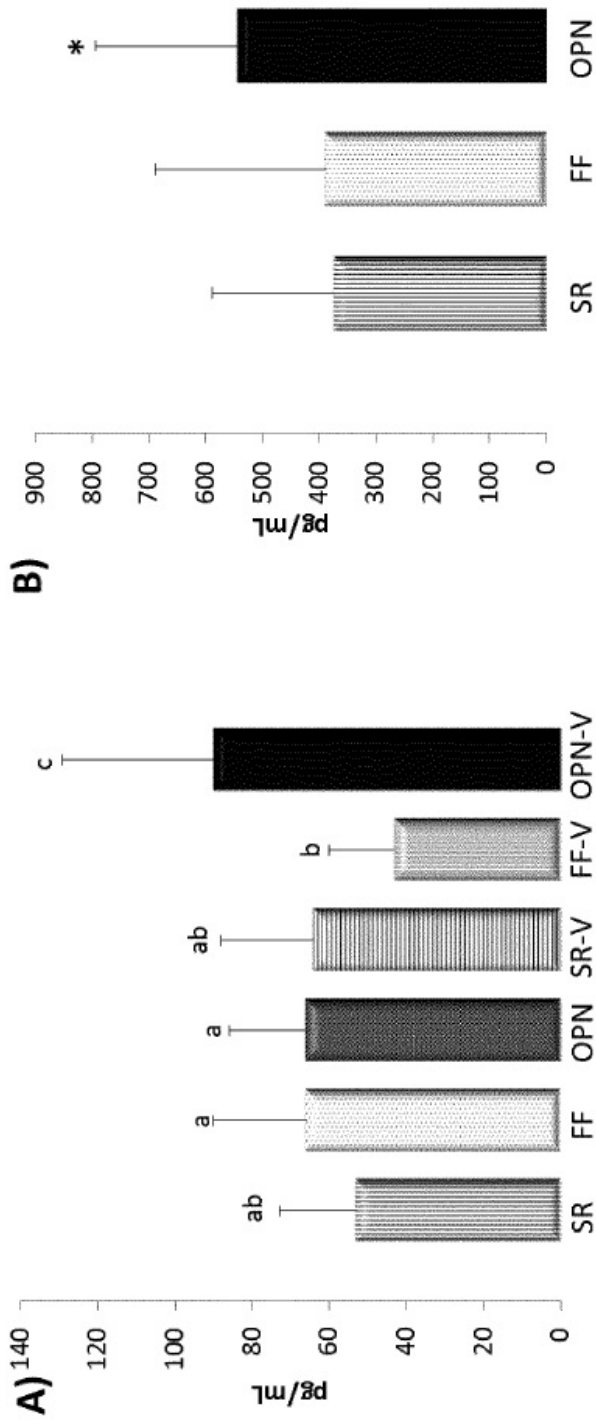


Figura 11

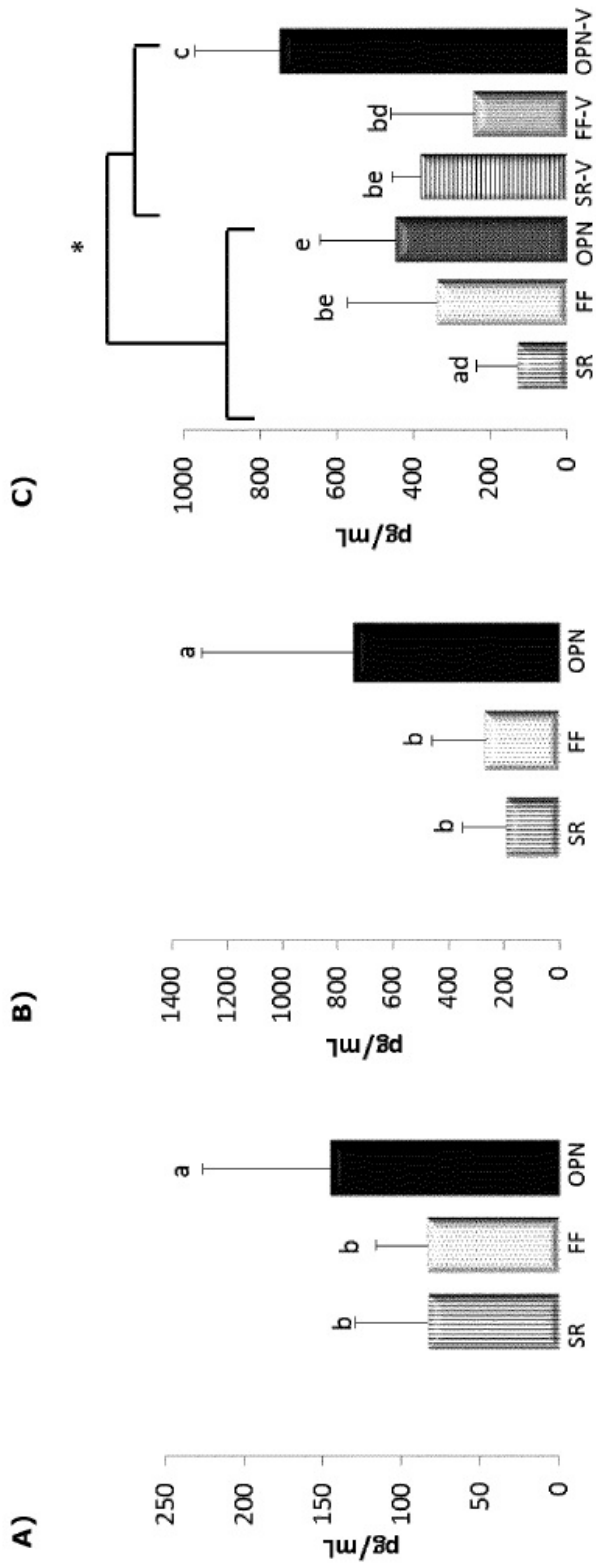


Figure 12

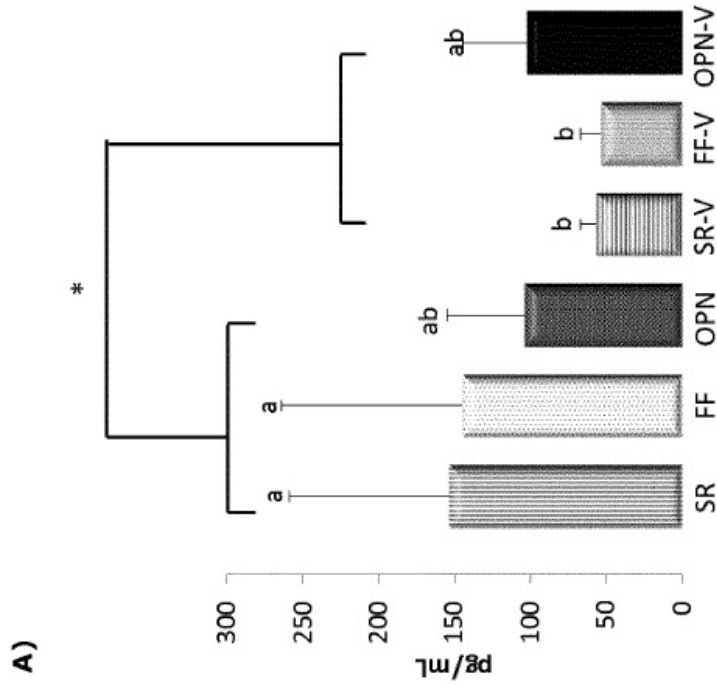
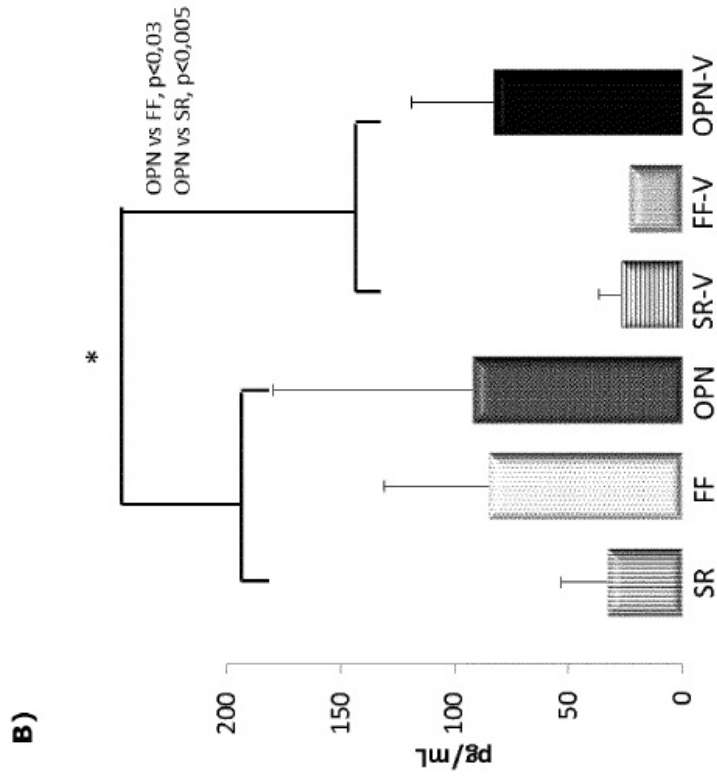


Figura 13

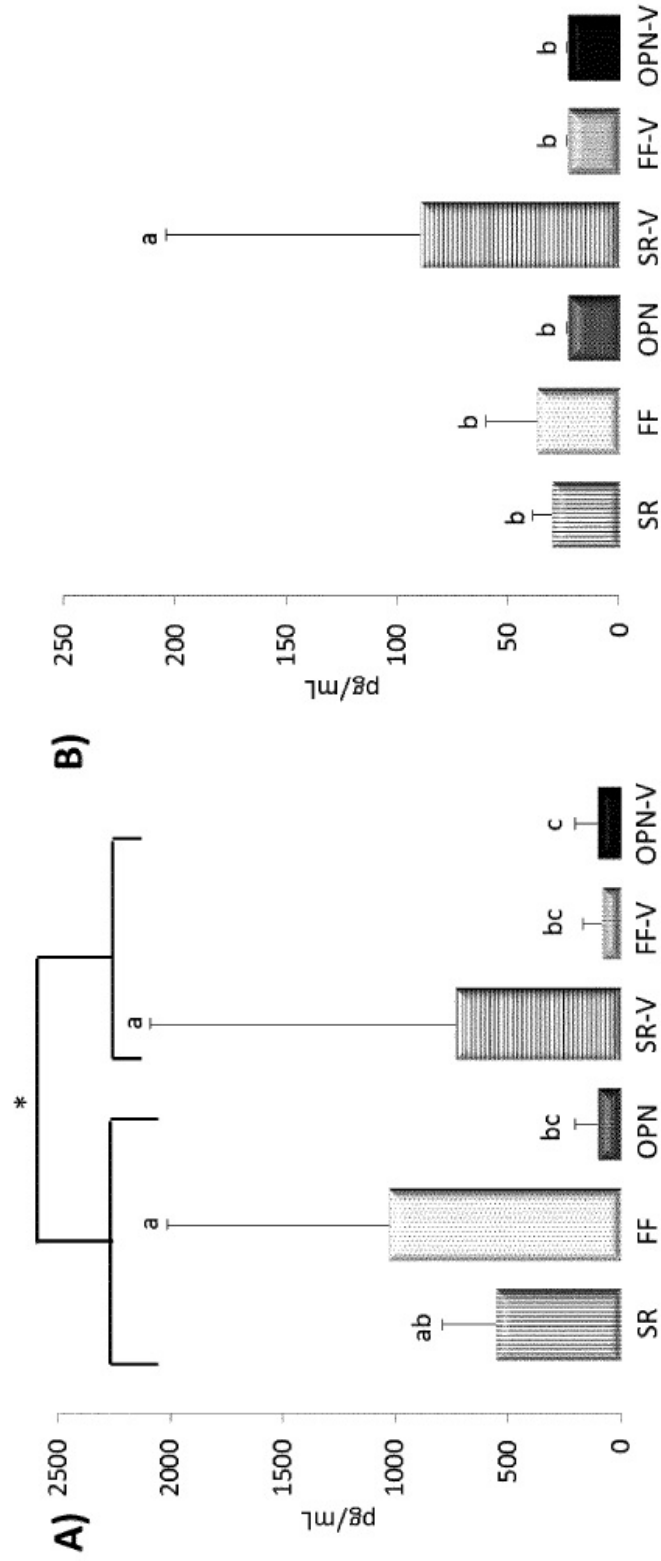


Figura 14

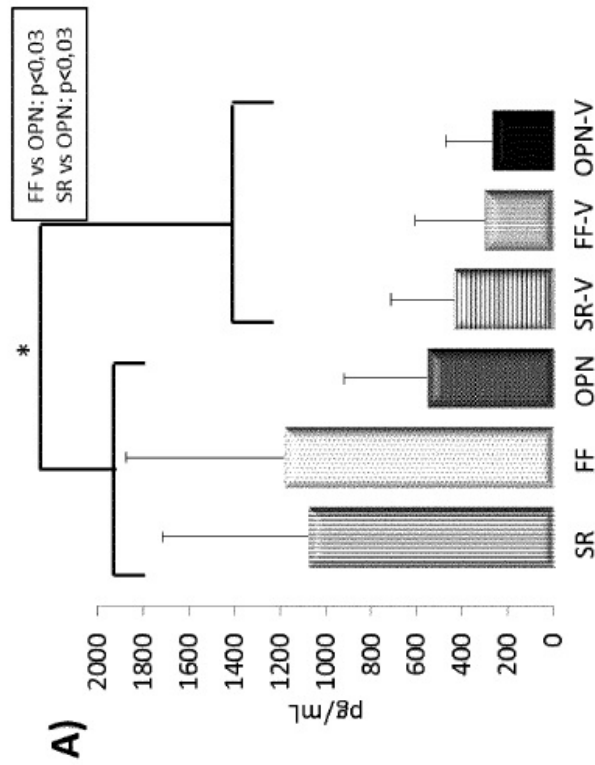
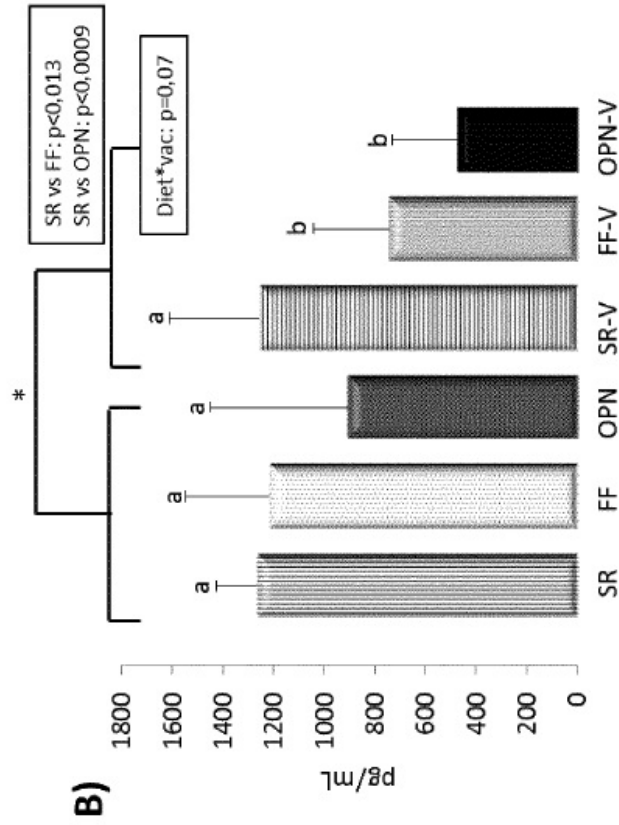


Figure 15

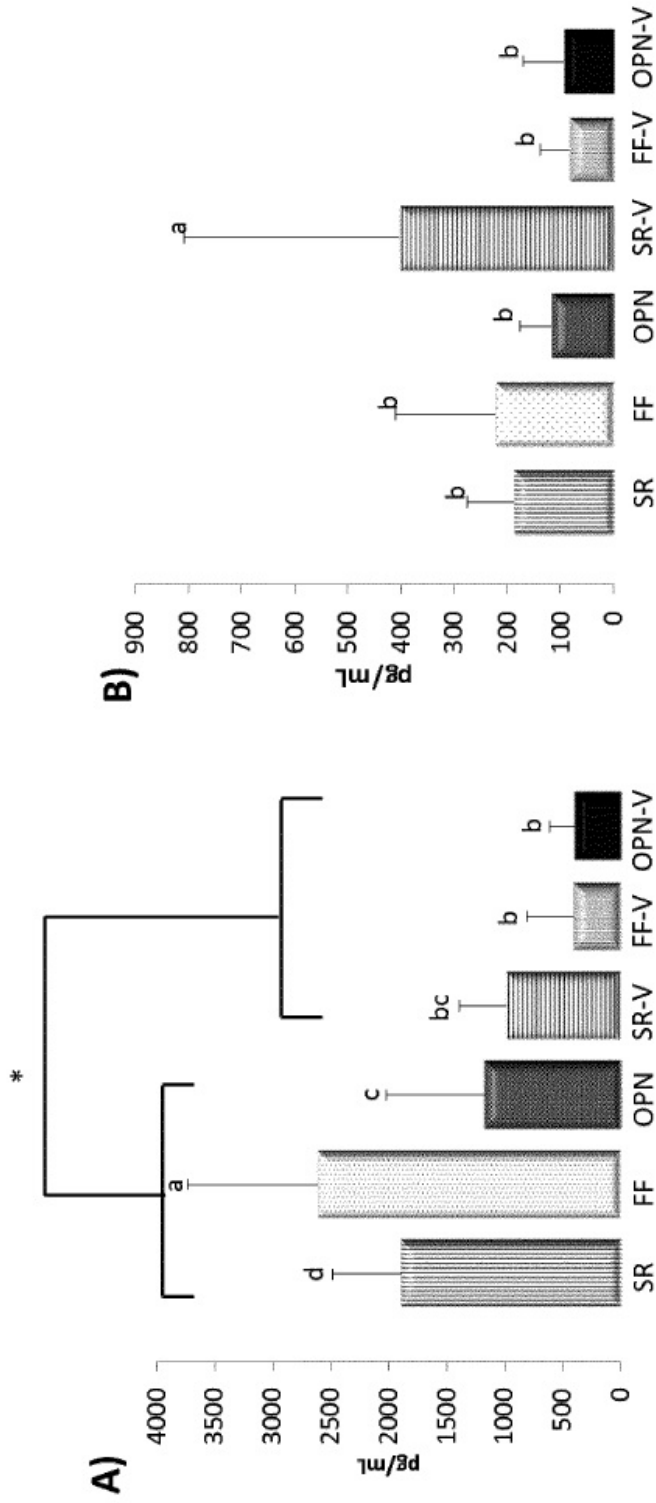


Figure 16

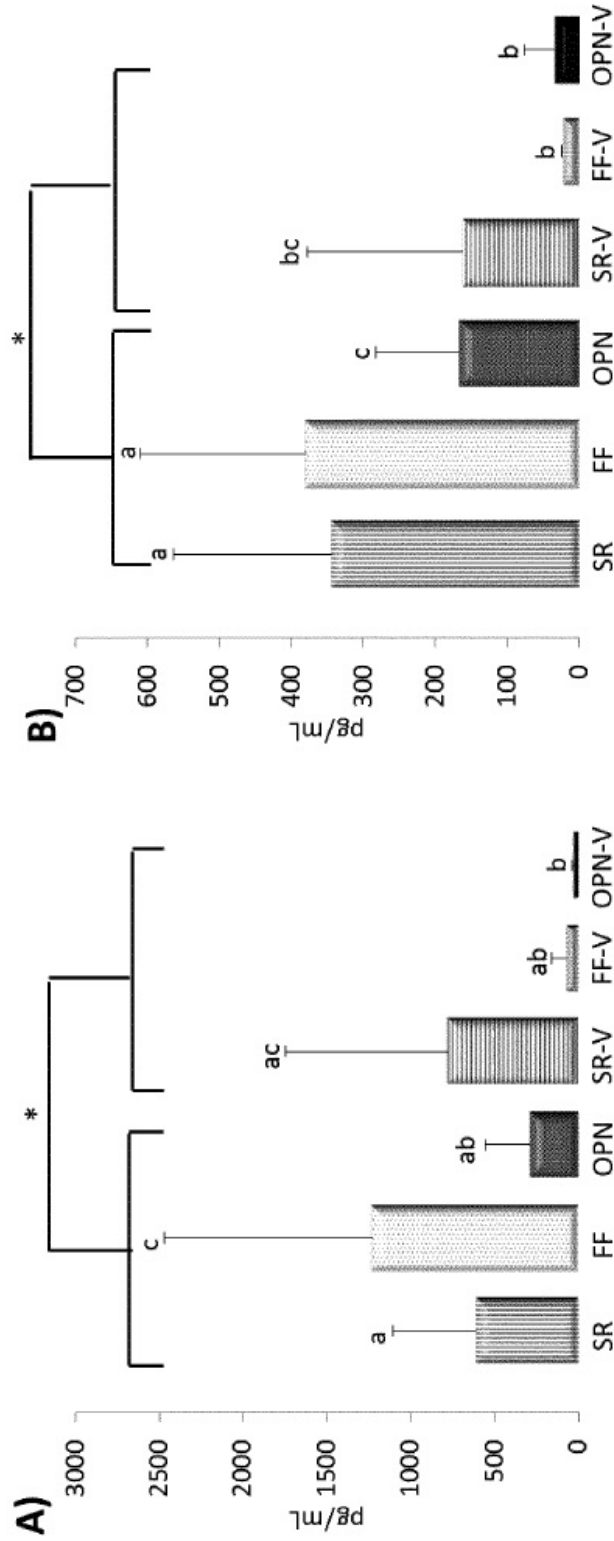


Figura 17

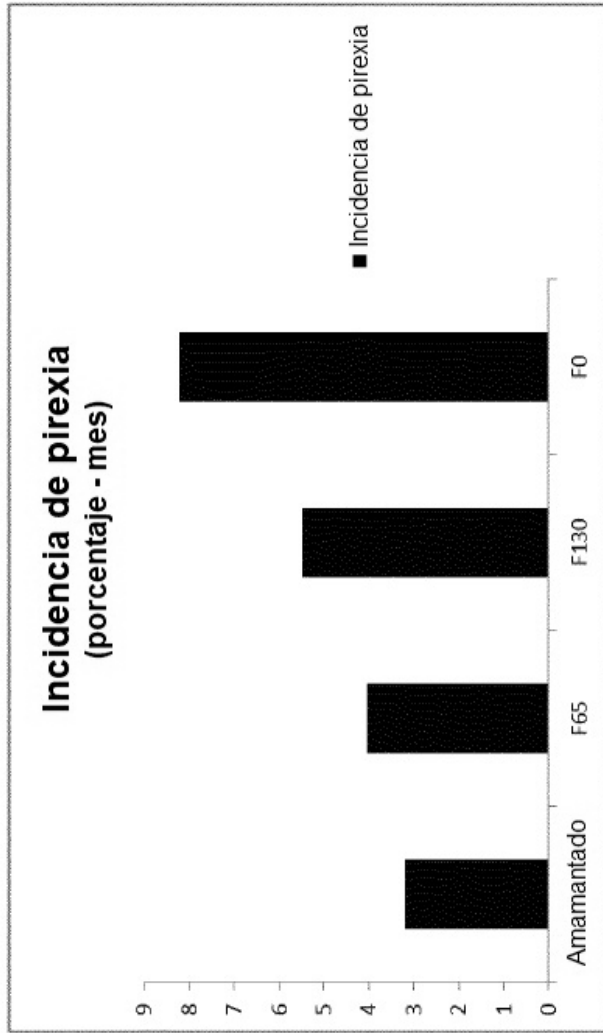


Figura 18