

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 186**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 1/14</b>	(2006.01)
<b>C07K 1/18</b>	(2006.01)
<b>C07K 1/30</b>	(2006.01)
<b>C07K 1/36</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/415</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/35</b>	(2006.01)
<b>C12P 21/06</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2012 PCT/EP2012/061404**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12172037**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2012 E 12728495 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2721051**

54 Título: **Procedimiento de producción de alérgenos hidrolizados**

30 Prioridad:

**15.06.2011 EP 11170031**

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

**14.03.2018**

73 Titular/es:

**ASIT BIOTECH S.A. (100.0%)  
avenue Ariane 5  
1200 Bruxelles, BE**

72 Inventor/es:

**PLACIER, GAEL;  
FRISCH, LAETITIA;  
LEGON, THIERRY y  
BENOIT, MARIE-ANGE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 659 186 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**

Procedimiento de producción de alérgenos hidrolizados

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de alérgenos hidrolizados, más precisamente a alérgenos hidrolizados con alergenicidad reducida.

5 Un procedimiento general para la producción de alérgenos hidrolizados se conoce por el documento 2008/000783 A1. El procedimiento desvelado en el mismo comprende las etapas de extracción, purificación, desnaturalización e hidrolizado de diferentes materiales naturales como leche, veneno, huevo, malas hierbas, hierba, árboles, arbustos, flores, vegetales, granos, hongos, etc.

10 Sin embargo, estudios experimentales avanzados que utilizan el procedimiento conocido muestran que el hidrolizado de alérgenos proteicos es complejo y necesita etapas de procedimiento adicionales con el fin de hidrolizar el alérgeno proteico completamente.

Es un objeto de la presente invención superar al menos alguno de los obstáculos de la técnica anterior, especialmente para proporcionar antígenos de alérgenos naturales con una capacidad significativamente reducida para desencadenar reacciones alérgicas en comparación con el extracto de alérgeno bruto, pero que sea capaz de estimular linfocitos B y linfocitos T.

15 El objeto se resuelve por un procedimiento para la producción de alérgenos hidrolizados a partir de alérgenos como se define en las reivindicaciones.

Sorprendentemente, se puede demostrar que aplicando dos etapas de desnaturalización, los alérgenos proteicos se pueden hidrolizar completamente.

20 “Extracción” como se utiliza en el presente documento es un tratamiento de una fuente de alérgenos con un medio de extracción que incluye agua, un tampón y disolventes orgánicos para separar ingredientes solubles de un resto no soluble. Se prefiere el uso de sistemas acuosos (que comprenden al menos un 50 % de H<sub>2</sub>O).

25 “Desnaturalización” como se utiliza en el presente documento es un proceso en el que las proteínas pierden su estructura cuaternaria, terciaria y secundaria, especialmente el término se refiere al tratamiento con uno o varios agentes desnaturalizantes.

La Etapa a) es una etapa de extracción.

La extracción se lleva cabo preferentemente con soluciones acuosas. Las sales adecuadas son sales tales como, pero sin restringirse a, fosfato hidrógeno disódico, carbonato, bicarbonato, fosfato, acetato, TRIS y HEPES.

30 También al contrario que muchos otros medios de extracción, se prefiere que la cantidad de medio de extracción sea comparativamente mayor, es decir, al menos 20 veces el peso de la fuente de alérgenos, preferentemente 100 veces el peso o más.

El extracto se denomina en las figuras y ejemplos como extracto proteico en bruto.

La Etapa b) es una etapa de purificación

35 Después de la extracción de la fuente de alérgeno, es decir la etapa a), el extracto se purifica (etapa b) para retirar los componentes no proteicos tales como azúcares, lípidos, ácidos nucleicos y similares.

La purificación del extracto se puede llevar a cabo mediante uno o más de los siguientes:

- etapas de cromatografía de intercambio iónico (incluyendo cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico),
- etapas de cromatografía de exclusión por tamaño (también llamada filtración en gel),
- 40 - etapas de precipitación,
- etapas de cromatografía de interacción hidrófoba.
- cromatografías de pseudo-afinidad y afinidad y/o
- diafiltración.

45 En una realización preferida se utiliza la cromatografía de intercambio iónico en el que en caso de intercambiador catiónico la solución de carga tiene un pH entre la pKa de la función ácida del intercambiador catiónico y la pKa de la proteína que tenga la pKa más baja de las proteínas del extracto. En el caso de un intercambiador aniónico el pH está entre la pKa de la función básica del intercambiador aniónico y la pKa de la proteína que tiene la mayor pKa de las proteínas que constituyen el extracto.

50 Mediante este procedimiento todas las proteínas se unen al intercambiador iónico mientras que las impurezas neutras y las impurezas con la misma carga que el la resina de intercambio iónico se eliminarán.

De manera alternativa, los alérgenos proteicos se pueden precipitar mediante la adición de al menos un 50 % (p/v) de sulfato amónico, más preferentemente al menos un 90 % (p/v) de sulfato amónico. En una realización preferida, la precipitación se puede llevar a cabo también por la adición de al menos un 2 % (p/v) de ácido tricloroacético (TCA), preferentemente un 5 % (p/v), más preferentemente de al menos un 10 (p/v) de TCA.

- 5 Normalmente, varias proteínas diferentes están presentes en la fracción proteica del extracto purificado. Las cantidades relativas de las proteínas en el extracto purificado se pueden medir fácilmente utilizando procedimientos como SDS-PAGE seguido por densitometría.

La Etapa c) es la primera etapa de desnaturalización

- 10 Como la siguiente etapa (etapa c)) se lleva a cabo una desnaturalización. El agente de desnaturalización es una mezcla de agente caotrópico y un agente reductor. Los agentes caotrópicos adecuados son por ejemplo, la urea y cloruro de guanidinio. Los agentes reductores típicos son por ejemplo, ditioneitol, β-mercaptoetanol, tioglicerol, tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) y mezclas de los mismos.

Un valor de pH típico es entre 7,0 y 11,0, preferentemente entre 7,0 y 10,0, más preferentemente entre 7,0 y 9,0 para la primera etapa de desnaturalización.

- 15 La desnaturalización se lleva a cabo preferentemente durante al menos 15 minutos, preferentemente al menos 30 minutos y más preferentemente al menos 60 minutos a una temperatura entre 15 y 40 °C, preferentemente entre 20 y 37 °C.

En una realización preferida el agente reductor que se utiliza en la desnaturalización es DTT (Ditioneitol).

- 20 Una concentración adecuada de urea es 3 M o más, preferentemente 4 M o más. Una concentración de guanidinio es preferentemente de 2 M, preferentemente de 3 M o más.

La Etapa d) es una etapa de purificación

- 25 En la etapa d) se lleva a cabo una purificación adicional. En una realización preferida se aplicaron procedimientos de filtración en gel o diafiltración. Se prefiere el uso de cromatografía especialmente de exclusión por tamaño. Se cree que mediante la etapa d) se pueden ahora retirar de la preparación las impurezas que no se unieron covalentemente a los componentes proteicos de los alérgenos y se habían parado de las proteínas por la etapa c).

La Etapa e) es la segunda etapa de desnaturalización.

- 30 Después de la etapa d), se lleva a cabo una segunda etapa de desnaturalización (etapa e)). Para esta etapa de desnaturalización se utiliza un segundo agente de desnaturalización que puede ser el mismo o tener una composición diferente del de la etapa c). En una realización preferida el agente reductor que se utiliza para la segunda etapa de desnaturalización es TCEP.

- 35 Se prefiere que el pH para la segunda etapa de desnaturalización se fije entre 1,5 y 9,0. Preferentemente el pH está cerca del pH óptimo para la actividad de la enzima seleccionada que se utiliza en la etapa f). En una realización preferida el pH es menor de 7,0 o menor de 5,0 o menor de 3,0 pero preferentemente mayor de 1,0. La desnaturalización se lleva a cabo preferentemente durante al menos 15 minutos, preferentemente al menos 30 minutos y más preferentemente al menos 60 minutos a una temperatura entre 15 y 40 °C, preferentemente entre 20 y 37 °C.

La siguiente etapa (etapa f)) es una etapa de hidrolización.

- 40 La etapa de hidrolización se lleva a cabo normalmente con una enzima. Las enzimas adecuadas son por ejemplo, pepsina, tripsina y/o quimotripsina. La etapa de hidrolización se puede llevar a cabo en presencia de un agente caotrópico, preferentemente urea o también cloruro de guanidinio. Durante la hidrolización, la concentración de urea y cloruro de guanidinio debería ser menor de 4 M, preferentemente menor de 3 M. La etapa de hidrolización también se puede llevar a cabo en presencia de un agente reductor, preferentemente TCEP. Durante la hidrólisis, la concentración de TCEP es preferentemente menor de 10 mM. Preferentemente, se utiliza la pepsina. Más preferentemente, la pepsina se utiliza a un intervalo de pH de 1,0 – 3,0.

- 45 La Etapa g) es una purificación y selección de los alérgenos hidrolizados

- 50 En una etapa adicional (etapa g)), los alérgenos hidrolizados se pueden purificar para formar un hidrolizado purificado, en el que específicamente se retiran los fragmentos de péptidos, es decir, normalmente los fragmentos con pesos moleculares por debajo de 1.000 Da, y por ejemplo, los fragmentos no hidrolizados de proteínas y/o péptidos con pesos moleculares mayores de 10.000 Da. Los péptidos del hidrolizado purificado, por lo tanto, que comprende péptidos con pesos moleculares entre 1.000 y 10.000 Da. Preferentemente, menos del 10 % de los péptidos tienen un peso molecular mayor de 10.000 Da y menos del 20 % de los péptidos tienen un peso molecular menor de 1.000 Da de manera que el 70 %, o más preferentemente el 80 % de los péptidos tienen entre 10.000 y 1.000 Da.

Los procedimientos adecuados para retirar péptidos grandes o pequeños son la ultrafiltración y la cromatografía de exclusión por tamaño. De nuevo se puede llevar la cromatografía de exclusión por tamaño en presencia de agentes caotrópicos, por ejemplo, urea, cloruro de guanidinio, etilenglicol, isopropanol y mezclas de los mismos.

5 Preferentemente, la purificación de los péptidos hidrolizados se lleva a cabo por cromatografía de exclusión por tamaño y/o por ultrafiltración, en la que la etapa de cromatografía de exclusión por tamaño se lleva a cabo preferentemente en presencia de agentes caotrópicos, preferentemente seleccionados de entre urea, cloruro de guanidinio, etilenglicol, isopropanol y mezclas de los mismos.

10 Una ventaja del hidrolizado es que los péptidos son el resultado de la digestión de proteínas desnaturalizadas purificadas. Tienen una potencia reducida para inducir reacciones alérgicas inmediatas y también reacciones co-inflamatorias.

En una divulgación adicional, la fuente de alérgenos es una fuente natural que comprende leche, veneno, huevo, malas hierbas, hierba, árboles, arbustos, flores, vegetales, granos, hongos, frutas, bayas, frutos secos, semillas, alubias, pescado, moluscos, mariscos, carne, especias, insectos, ácaros, hongos, animales, ácaro de la paloma, gusanos, coral blando, caspa de animales, nematodos, *Hevea brasiliensis* y mezclas de los mismos.

15 Los alérgenos utilizados en la presente invención son ácaros del polvo doméstico y cacahuets

En la presente invención, la fuente de alérgenos son cacahuets y ácaros del polvo doméstico (ácaros purificados).

Preferentemente, la fuente comprende una mezcla de alérgenos.

20 Preferentemente, los cacahuets se seleccionan de entre el género *Arachis*, preferentemente de especie *hypogaea*, más preferentemente de *hypogaea* y *fastigiata*. Las sub-especies comprenden las variedades *Virginia*, *Española*, *Valencia* y/o híbridos tales como *Runner* o incluso los cacahuets transgénicos obtenidos por modificación genética.

Preferentemente, se utiliza una mezcla de al menos 2, preferentemente 3 especies/sub-especies/variedades/híbridos y/o cacahuets transgénicos. En realizaciones preferidas se ha retirado el revestimiento rojo de la semilla (tegumento) de los cacahuets.

25 Los alérgenos hidrolizados de la presente invención se pueden utilizar para la preparación de una composición farmacéutica y/o composición alimentaria para inducir la tolerancia y desensibilización. La inducción a la tolerancia se puede utilizar para curar o evitar reacciones alérgicas.

La reacción alérgica que se va a tratar o evitar depende de la fuente de alérgenos, es decir la alergia a los cacahuets se evitan o tratan utilizando alérgenos de cacahuete, mientras que la alergia al polen de herbáceas se trata con alérgenos del polen de herbáceas.

30 Una realización adicional de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende los alérgenos hidrolizados de la presente invención. Adicionalmente, la composición farmacéutica puede comprender una o más de las siguientes sustancias: trifosfatos de nucleósidos, difosfatos de nucleósidos, monofosfatos de nucleósidos, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos, nucleósidos o análogos de los mismos, citocinas inmunosupresoras, compuestos que inducen la expresión de inmunoproteasomas, 1,25 dihidroxivitamina D3, o análogos de la misma, lipopolisacáridos, endotoxinas, proteínas de choque término, tiorredoxina con NADPH o NADP-tiorredoxina reductasa, agentes reductores, ditiotreitól, agonistas del receptor adrenérgico tales como salbutamol, antagonistas del receptor adrenérgico tales como la butoxamina, compuestos que regulan la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1, N-acetil-L-cisteína,  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina (L-glutatió reducido), alfa-2-macroglobulinas, inductores de la expresión del gen Foxp3, flavonoides, isoflavonoides, pterocarpanoides, estilbenos tales como resveratrol, antagonistas del receptor de la taquicinina, inhibidores de quimasa, adyuvantes vacunales o inmunomoduladores tales como CpG, hidróxido de aluminio, fosfato cálcico, agonistas de TLR-4 (es decir MPL) y agonistas de TLR-9 o adyuvantes tolerogénicos como el zimósano, beta-1,3-glucano, inductor de linfocitos T reguladores, un agente muco-adhesivo para unir la partícula al revestimiento mucoso intestinal, tales como lectinas vegetales, zinc, sales de zinc, polisacáridos, vitaminas y lisados bacterianos o partículas que presentan anticuerpos unidos a la superficie.

En una realización preferida, la composición farmacéutica se prepara por administración subcutánea, administración nasal, administración epicutánea, administración intralinfática, administración oral, por suministro farmacológico sublingual, o por suministro farmacológico entérico.

50 Una divulgación adicional son alérgenos hidrolizados purificados que se pueden obtener por el procedimiento de la presente invención.

Una divulgación adicional es el uso de ácido tricloroacético como medio de precipitación para la precipitación de proteínas alérgicas.

**Descripción de las figuras**

- 5      Figura 1: Perfil proteico del extracto en bruto del cacahuete por SDS-PAGE. Gel Bis-Tris al 4 a 12 %. Calle 1-5: Marcadores de peso molecular, calle 2: extracto de proteína en bruto de tipo Runner (13 µg), calle 3: extracto de proteína en bruto de tipo Virginia (13 µg), calle 4: extracto de proteína en bruto de tipo Español (13 µg), calle 6: extracto de proteína en bruto de mezcla de cacahuete (13 µg). Se lleva a cabo la tinción con azul brillante de Coomassie R-250. Alérgenos: alérgeno 1: ± 60 kDa; alérgeno 2: ± 17 kDa; alérgeno 3: 2 subunidades ± 20 kDa y ± 40 kDa; alérgeno 4: ± 37 kDa.
- 10      Figura 2: Perfil de elución de SEC G 25. La relación volumen de columna/volumen de muestra era 7. La resina se equilibró con 2 M de urea, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 a una caudal de 10 ml/min. La elución continuó con la absorbancia a 280 nm.
- 15      Figura 3: Perfil proteico del extracto de alérgenos purificado por SDS-PAGE. Gel Bis-Tris al 4-12 %. Calle 1: marcadores de peso molecular, calle 2: extracto desnaturalizado purificado (13 µg). Se llevó a cabo la tinción con azul brillante de Coomassie R-250. Alérgeno 1: ± 60 kDa; alérgeno 2: ± 17 kDa; alérgeno 3: 2 subunidades ± 20 kDa y ± 40 kDa; alérgeno 4: ± 37 kDa.
- 20      Figura 4: Inmunorreactividad por transferencia de western de IgE. Calle 1: marcadores de peso molecular, calle 2: extracto desnaturalizado purificado (13 µg). Bloqueo de membrana por BSA al 2 % (p/v). Agrupamiento de los sueros de 6 pacientes diluido a 1/500. Unión de IgE detectada por anti-IgE humana de cabra conjugado con peroxidasa diluido 1/1.000 y revelado por sustrato TMB. Alérgeno 1: ± 60 kDa; alérgeno 2: ± 17 kDa; alérgeno 3: 2 subunidades ± 20 kDa y ± 40 kDa; alérgeno 4: ± 37 kDa.
- 25      Figura 5: Perfil de hidrólisis de proteínas desnaturalizadas dos veces por SDS-PAGE. Gel Bis-Tris al 4-12 %. Calle 1: marcadores de peso molecular, calle 2: extracto de proteína en bruto (13 µg), calle 3: mezcla de alérgenos desnaturalizados (13 µg), calle 4: alérgenos hidrolizados (26 µg). Se llevó a cabo la tinción con azul brillante de Coomassie R-250.
- 30      Figura 6: Perfil de hidrólisis de las proteínas desnaturalizadas una vez por SDS-PAGE. Gel Bis-Tris al 4-12 %. Calle 1: marcadores de peso molecular, calle 2: extracto de proteína en bruto (13 µg), calle 3: hidrolizado de proteínas desnaturalizadas una vez (26 µg). Se llevó a cabo la tinción con azul brillante de Coomassie R-250.
- 35      Figura 7: Perfil de elución G 50 SEC. La columna se equilibró con 2 M de urea, 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5 con un caudal de 10 ml/min. La relación volumen de columna/volumen de muestra era de 10. La elución continuó con la absorbancia a 280 nm.
- 40      Figura 8: Comparación de los perfiles peptídicos antes y después de la purificación. Se llevó a cabo el análisis por SDS-PAGE. Gel Bis-Tris al 4-12 %. Calle 1: marcadores de peso molecular, calle 2: extracto de proteína en crudo (13 calle 3: mezcla de alérgenos desnaturalizados (13 Calle 4: alérgenos hidrolizados (26 calle 5: hidrolizado purificado (26 µg).  
Se llevó a cabo la tinción con azul brillante de Coomassie R-250.
- 45      Figura 9: Curva de calibración por análisis de HPLC. Se inyectaron 10 µl de las siguientes referencias (1 mg/ml) en la columna BioSep-SEC S 2000: Citocromo C (12 kDa), Glucagón (3,5 kDa), 1 kDa de péptido sintético.
- 50      Figura 10: Perfil de HPLC de exclusión por tamaño. Columna: BioSep-SEC S 2000. Tampón de elución: 50 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, un 0,5 % (p/v) de SDS- pH 6,8. Caudal 1 ml/min. Detección a 215 nm. Se inyectaron 10 µl de la muestra.
- 55      Figura 11: Perfil de proteínas de ácaro del polvo doméstico sobre SDS-PAGE reductora con Bis-Tris al 4 a 12 % en diferentes etapas de purificación. Calle 1: Marcadores de peso molecular; Calle 2: extracto de proteína en bruto de *Dermatophagoides pteronyssinus*; Calle 3: perfil proteico obtenido tras precipitación en TCA; Calle 4: extracto desnaturalizado purificado obtenido después de la segunda desnaturalización con TCEP; Calle 5: perfil de proteínas desnaturalizadas purificadas con 0,4 Eu. Ph. U de pepsina/100 mg; Calle 6: Perfil de proteínas desnaturalizadas hidrolizadas con 4 Eu. Ph. U de pepsina/100 mg; Calle 7: Perfil de proteínas desnaturalizadas hidrolizadas con 16 Eu. Ph. U de pepsina/100 mg. Se llevó a cabo la tinción con azul brillante de Coomassie R-250.
- 60      Figura 12: Alergenicidad reducida de péptidos de cacahuete. Se inhibía más la unión de la IgE de agrupamientos de sueros de donantes alérgicos a los cacahuetes a los alérgenos de cacahuete por pre-incubación con cantidades crecientes de alérgenos intactos de cacahuete que por péptidos alérgicos de cacahuete.
- 65      Figura 13 a-d: Perfiles de isotipos de la respuesta de anticuerpos IgG de ratas Lewis inmunizadas por vía subcutánea con péptidos de cacahuete (1 mg/inyección el D0, D3, D7) emulsionados con Adyuvante incompleto de Freund (v/v). Los resultados se expresan como la media ± SD (n = 4).

Figura 14: Ensayo de proliferación de esplenocitos en ratas Lewis inmunizadas previamente por vía subcutánea con proteínas de cacahuete (100 µg/inyección) o péptidos de cacahuete (400 µg o 1 mg/inyección) en respuesta a dosis crecientes (desde 6,25 a 100 µg/ml) de péptidos de cacahuete.

5 Figura 15: Ensayo de proliferación de esplenocitos en ratas Lewis inmunizadas por vía subcutánea con proteínas de cacahuete (100 µg/inyección) o péptidos de cacahuete (400 µg o 1 mg/inyección) en respuesta a dosis crecientes (desde 6,25 a 100 µg/ml) de proteínas de cacahuete.

10 Figura 16: ELISA de competición para la evaluación de la actividad bloqueante de anticuerpos. Se revistió con proteínas de cacahuete una placa de microtitulación. El suero agrupado de pacientes alérgicos a cacahuetes se mezcló con diluciones en serie de anticuerpos de conejo generados a péptidos o a proteínas de cacahuetes. Después de la incubación, la IgE que se une a las proteínas de cacahuete que revisten la placa se detectaron utilizando anticuerpos anti-IgE humana marcados con peroxidasa.

La invención se explica con más detalle mediante los siguientes ejemplos.

### **Ejemplo 1: Alérgenos de cacahuete**

#### Extracción de alérgenos de cacahuete

15 Una mezcla de tres tipos de cacahuete (*Arachis hypogaea* especies Runner, Virginia y Española se peló, molió y mezcló. Se añadió un 2 % (p/v) de la mezcla de cacahuetes a fosfato sódico (12,5 nM) y se incubó 1 h con agitado a temperatura ambiente. Las soluciones se clarificaron y filtraron entonces añadiendo Celita al 2 % (p/v) y se pasó a través de un filtro de 0,45 µm. Esta muestra constituye el extracto proteico en bruto.

20 La presencia de alérgenos en el extracto proteico en bruto se analizó por transferencia de Western utilizando sueros de pacientes alérgicos a los cacahuetes.

Como se muestra en la Figura 1, hay cuatro alérgenos principales en el extracto proteico en bruto (alérgeno 1, alérgeno 2, alérgeno 3 y alérgeno 4).

#### Purificación de alérgenos proteicos de cacahuete

El extracto de alérgenos se purificó mediante:

25 - Precipitación en ácido tricloroacético

Esta etapa se llevó a cabo a temperatura ambiente (20 a 25 °C).

Se añadió un 10 % (p/v) de ácido tricloroacético al producto con agitado. Entonces, el extracto precipitado se centrifugó durante 15 minutos a 10.000 g. El sobrenadante se desechó con cuidado.

- Primera desnaturalización

30 Los aglomerados se resuspendieron en 25 mg/ml en urea 8 M, se añadieron 0,1 M de Tris-HCl, pH 8,0 mM de DTT. La solución se incubó a 37 °C durante 1 h.

- Cromatografía de exclusión por tamaño en una columna de resina G25 (fine Sephadex de GE Healthcare)

El extracto desnaturalizado purificado se cargó inmediatamente en la columna y se eluyeron las proteínas con 2 M de urea, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0.

35 La presencia de proteínas se siguió por absorbancia a 280 nm. Las fracciones de interés se agruparon para constituir el extracto desnaturalizado refinado.

La Figura 2 ilustra el perfil de elución SEC G25 seguido por la absorbancia a 280 nm.

El extracto desnaturalizado refinado se analizó adicionalmente por SDS-PAGE y por Transferencia de Western utilizando sueros de pacientes alérgicos a los cacahuetes.

40 Como se muestra en la Figura 3, los cuatro alérgenos principales visualizados en el extracto de SDS-PAGE (cf. Figura 1) están presentes en el extracto desnaturalizado purificado.

La Figura 4 muestra que todas las proteínas y en particular los cuatro alérgenos principales son reconocidos por los sueros de pacientes alérgicos a los cacahuetes y después se visualizaron con anticuerpos anti-IgE humana.

Segunda desnaturalización

45 Se añadieron 8 M de urea y 40 mM de TCEP al extracto desnaturalizado refinado. Después, se ajustó el pH a 2,5. La solución se incubó a 37 °C durante 1 h.

Hidrólisis de los alérgenos de cacahuete desnaturalizados

Los alérgenos desnaturalizados se hidrolizaron utilizando el siguiente protocolo:

- 5 La mezcla de alérgenos desnaturalizados se diluyó 4 veces con 10 mM de HCl y se acidificó con HCl 6 N hasta un pH de 2,0. La hidrólisis de las proteínas se llevó a cabo con 16 Eu. Ph. U de pepsina por 100 mg de proteínas a 37 °C, durante 2 h. La hidrólisis se paró entonces aumentando el pH a 10,0 con una solución de NaOH.

La Figura 5 muestra una comparación entre el extracto de proteínas en bruto (calle 2), la mezcla de alérgenos desnaturalizados (calle 8) y los alérgenos hidrolizados (calle 4). Se puede ver que las proteínas desnaturalizadas dos veces están casi totalmente hidrolizadas ya que solo se visualiza una banda peptídica residual por encima de los 10 kDa en el perfil.

- 10 En comparación, la Figura 6, especialmente en la calle 3, se muestra el caso de proteínas desnaturalizadas una vez. Se visualizan tres proteínas residuales en el perfil del hidrolizado correspondiente. Esto ilustra el beneficio de la doble desnaturalización ya que la hidrólisis es menos eficaz cuando las proteínas se desnaturalizan solo una vez.

Purificación de los antígenos hidrolizados de cacahuete

- 15 Con el fin de eliminar los péptidos con un PM  $\geq$  10.000 Da y PM  $\leq$  1.000, se purificaron los alérgenos hidrolizados mediante:

- Cromatografía de exclusión por tamaño en resina G50 (fine Sephadex de GE Healthcare). Después de aumentar el pH, los alérgenos hidrolizados se cargaron rápidamente en la columna G50. Los péptidos se eluyeron con 2 M de Urea, 0,1 M de Tris-HCl, pH 9,5. La elución se siguió por absorbancia a 280 nm. Las fracciones que contenían los péptidos (PM  $\leq$  10 kDa) se agruparon como se muestra en la Figura 7.
- 20 - Diafiltración en membrana de 1 kDa (casete de ultrafiltración Omega PES de PALL). Los péptidos se concentraron 25 veces, se diafiltraron contra 10 volúmenes de 50 mM de fosfato sódico a pH 7,6 y finamente se concentraron dos veces. Esta muestra constituye el hidrolizado purificado.

El hidrolizado purificado se analizó por SDS-PAGE (véase la Figura 8). El perfil (calle 5) muestra que no hay proteínas residuales con pesos moleculares por encima de 10 kDa.

- 25 La eficacia de la purificación se controló por HPLC de exclusión por tamaño. Se equilibró una columna BioSep-SEC S2000 con 50 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, un 0,5 % (p/v) de SDS, pH 6,8 con un caudal de 1 ml/min. Los péptidos se detectaron a 215 nm.

Los límites de 10 kDa y 1 kDa se calcularon a partir de la curva de calibración que se ejemplifica en la Figura 9.

- 30 Como se muestra en la Figura 10, los péptidos con pesos moleculares entre 1.000 Da y 10.000 Da representan aproximadamente el 80 % de todos los péptidos del hidrolizado purificado.

**Ejemplo 2: Alérgenos del ácaro del polvo doméstico *Dermatophagoides pteronyssinus***Extracción de proteínas del ácaro del polvo doméstico

- 35 Las proteínas del ácaro del polvo doméstico se extrajeron por incubación en solución salina tampón de fosfato pH 7,4 durante 1 h a temperatura ambiente con agitado. La solución se clarificó y filtró mediante la adición de Celita al 2 % (p/v) y se pasó a través de un filtro PVDF 0,45  $\mu$ m. Esta muestra constituye el extracto de proteínas en bruto.

El extracto de proteínas en bruto parece que muestra los alérgenos principales (Derp1, Derp2) que se pueden localizar de acuerdo con su peso molecular (25 kDa y 14 kDa, respectivamente).

Purificación de alérgenos proteicos de ácaros de polvo doméstico

La purificación se llevó a cabo mediante:

- 40 • *Precipitación en ácido tricloroacético*  
Se añadió un 10 % (p/v) de ácido tricloroacético al extracto de proteínas en bruto con agitado durante 5 min a temperatura ambiente. Las proteínas se recolectaron por centrifugación durante 20 min a 10.000 g.
- *Primera desnaturalización*  
Después de la eliminación del sobrenadante, el aglomerado se re-suspendió en 8 M de urea, 0,1 M de Tris pH 7-8. La solución se incubó durante 1 h a 37 °C después del ajuste de pH a 7,5 y adición de 80 mM de DTT.
- 45 • *Cromatografía de exclusión por tamaño en columna de resina G25*  
Las proteínas del extracto desnaturalizado se cargaron en la columna, y se eluyeron con 2 M de Urea, 0,1 M de NaCl pH 9,0.
- *Segunda desnaturalización*  
50 La desnaturalización se produjo por incubación a 37 °C durante 1 h en 4 M de urea, 0,1 M de NaCl y 40 mM de

TECP con el pH ajustado a 2,5.

Hidrólisis de los alérgenos desnaturalizados para el ácaro

5 La mezcla de proteínas desnaturalizadas se diluyó previamente 2 veces con 10 mM de HCl y se acidificó con HCl 6 N hasta un pH de 2,0. La hidrólisis de las proteínas se llevó a cabo con 16 Eu. Ph. U de pepsina por 100 mg durante 1 h a 37 °C.

La Figura 11 muestra un perfil de proteínas de ácaros del polvo doméstico en SDS-PAGE reducida con un 4 a 12 % de Bis-Tris con diferentes etapas de purificación.

- 10 Calle 1: Marcadores de peso molecular;
- Calle 2: Extracto de proteína en bruto de Dermatophagoides pteronyssinus;
- Calle 3: Perfil proteico obtenido después de la precipitación con TCA;
- Calle 4: Extracto desnaturalizado purificado obtenido después de la segunda desnaturalización con TCEP;
- Calle 5: Perfil de proteínas desnaturalizadas con 0,4 Eu. Ph. U de pepsina/100 mg;
- Calle 6: Perfil de proteínas desnaturalizadas con 4 Eu. Ph. U de pepsina/100 mg;
- 15 Calle 7: Perfil de proteínas hidrolizadas con 16 Eu. Ph. U de pepsina/100 mg. Se llevó a cabo la tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

**Ejemplo 3**

Con un procedimiento similar al ejemplo 2, se prepararon alérgenos de polen de herbáceas y abedul.

**Ejemplo 4: Péptidos de cacahuete: Alergenicidad, inmunogenicidad y bloqueo potencial de anticuerpos específicos**

- 20 • Se investigó la alergenidad de péptidos de cacahuete se investigó por análisis de sus propiedades de unión a IgE *in vitro* mediante un ensayo ELISA de inhibición.
- Proliferación de linfocitos T, se utilizaron los títulos de IgG específicos después de inmunización a ratas para dirigir su inmunogenicidad.
- 25 • Se evaluó la actividad de bloqueo de los anticuerpos generados frente a péptidos de cacahuete por un ELISA de competición.

Alergenicidad de péptidos de cacahuete: Unión reducida de IgE del suero de pacientes alérgicos

Los péptidos de cacahuete presentan una alergenidad reducida *in vitro* como se demuestra por ensayo ELISA de inhibición.

30 El principio del ensayo ELISA de inhibición era para medir la disminución de la unión a las proteínas de cacahuete de la IgE del suero de pacientes alérgicos previamente incubados con cantidades crecientes de péptidos o proteínas de cacahuete.

35 Se revistieron placas de microtitulación de 96 pocillos Maxisorp con 0,8 µg/ml de proteínas de cacahuete en tampón de bicarbonato-carbonato 1 M pH 9,6 durante una noche a 4 °C. Después del bloqueo durante 1 h a 37 °C, se incubaron los pocillos durante una noche a 4 °C con 100 µl de mezclas del agrupamiento de suero (dilución 1/50) de pacientes alérgicos a los cacahuetes tratados previamente (1 h a 37 °C) con diluciones en serie de proteínas de cacahuete (intervalo: 1,25 µg/ml a 63,5 pg/ml) o péptidos de cacahuete (intervalo: 50 µg/ml a 20 ng/ml). Después de los lavados, los pocillos se incubaron con anticuerpos anti-IgE humanos marcados con peroxidasa, y se desarrolló por incubación con 100 µl de sustrato TMBS. La reacción se paró con 100 µl de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M y se midieron los valores de la densidad óptica a 450-650 nm.

40 El porcentaje de inhibición de la unión de IgE alcanzado por pre-incubación en presencia de péptidos de cacahuete o proteínas de cacahuete se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \left[ \frac{\text{DO de la muestra inhibida}}{\text{media de DO de controles positivos}} \times 100 \right]$$

Los controles positivos eran 50 µl de agrupamiento de suero humano diluido 1/25 mezclado con 50 µl de suero pre-inmune de conejo (n = 10).

45 La Figura 12 muestra una alergenidad de péptidos de cacahuete. La unión de IgE de los sueros agrupados de donantes alérgicos a los cacahuetes a los péptidos de cacahuete se inhibía más por pre-incubación con cantidades crecientes de proteínas de cacahuete que por péptidos de cacahuete.

Inmunogenicidad de péptidos de cacahuete: Inducción de anticuerpos específicos en ratas

Los péptidos de cacahuete son capaces de provocar respuestas inmunitarias humorales



Las ratas que se han inmunizado subcutáneamente tres veces con péptidos de cacahuete emulsionados en Adyuvante incompleto de Freund producen niveles significativos de IgG. La mezcla de péptidos de cacahuete induce IgG1, IgG2a e IgG2b.

5 Los días 0, 3 y 7 (D0, D3, D7), un grupo de cuatro ratas hembras de siete semanas de edad se inmunizaron con 1 mg de péptidos de cacahuete administrados por vía subcutánea como una emulsión (v/v) con Adyuvante Incompleto de Freund.

10 Se revistieron placas de microtitulación de 96 pocillos Maxisorp con 2 µg/ml de proteínas de cacahuete en 0,1 M de tampón bicarbonato-carbonato a pH 0,6 durante una noche a 4 °C. Después del bloqueo durante 1 h a 37 °C los pocillos se incubaron 1 h a 37 °C con 100 µl de diluciones en serie de suero (diluciones desde 1/200 a 1/437.400) de las ratas tratadas. La unión de la IgG de rata se detectó con anti-IgG de rata marcado con peroxidasa diluido 1/20.000. La IgG1, IgG2a o IgG2b se detectaron con anticuerpos, marcados con biotina diluidos respectivamente 1/1.500, 1/500 y 1/500. Después de la incubación con peroxidasa/estreptavidina (1/200), la reacción de color se inició añadiendo 100 µl de sustrato TMBS. La reacción se paró con 100 µl de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M y se midieron los valores de densidad óptica a 450-650 nm.

15 Los resultados se expresaron como títulos. Se definían como la dilución máxima de antisuero de rata que daba absorbancias de 0,3.

La Figura 13 a-d muestra perfiles de isotipo de la respuesta de anticuerpo IgG de las ratas Lewis inmunizadas por vía subcutánea con péptidos de cacahuete (1 mg/inyección, el D0, D3, D7) emulsionados con Adyuvante Incompleto de Freund (v/v). Los resultados se expresaron como la media ± SD (n = 4).

#### 20 Immunogenicidad de péptidos de cacahuete: Estimulación de respuestas inmunitarias celulares

Los péptidos de cacahuete son capaces de desencadenar la proliferación de linfocitos T aislados del bazo de ratas inmunizadas previamente con péptidos de cacahuete o proteínas de cacahuete.

Los péptidos de cacahuete se compararon con las proteínas de cacahuete purificadas en cuanto a su capacidad para estimular los linfocitos T, utilizando un ensayo de proliferación celular basado en la incorporación de timidina.

25 El estudio se llevó a cabo en ratas Lewis hembras de siete semanas de edad.

Los D0, D3 y D7, se inmunizaron por vía intraperitoneal cuatro ratas por vía intraperitoneal con 100 µg de proteínas de cacahuete mezcladas con aluminio (v/v). Se trataron cuatro ratas con 400 µg o 1 mg de péptidos de cacahuete administrados por vía subcutánea como una emulsión (v/v) con Adyuvante Incompleto de Freund.

30 El D21, se sacrificaron los animales y se extrajeron los esplenocitos. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con un 10 % (v/v) de suero fetal bovino, un 1 % de aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato, 50 µM de β-mercaptoetanol, 50 U/ml de Penicilina, 100 µg/ml estreptomycin, 10 µg de gentamicina, 1 mM HEPES (medio completo).

35 Las células se colocaron en placas a una densidad de  $2 \times 10^6$ /ml en medio completo. Los antígenos, se utilizaron también en medio completo a las siguientes concentraciones: 100, 50, 25, 12,5, 6,25 µg/ml. Todos los cultivos se llevaron a cabo en una incubadora humidificada a 37 °C en un 5 % de CO<sub>2</sub>. Se llevaron a cabo los ensayos de proliferación por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondeado durante 4 días estando las células pulsadas con 0,5 µCi de [<sup>3</sup>H]-timidina/pocillo a las 72 h, se recolectaron 12 a 16 h más tarde y se hizo el recuento de β-radioactividad.

Los resultados se expresaron como el índice de proliferación calculado de la siguiente manera:

- 40
- Las células cultivadas en medio solo (células no estimuladas) se consideraban como un 0 % de proliferación
  - Índice de proliferación = Cpm de pocillos ensayados (media de triplicados)/ cpm (media de triplicados) de células

La Figura 14 muestra un ensayo de proliferación de esplenocitos para ratas Lewis inmunizadas previamente con proteínas de cacahuete (100 µg/inyección) o péptidos de cacahuete (400 µg o 1 mg/inyección) en respuesta a dosis crecientes (desde 6,25 a 100 µg/ml) de péptidos de cacahuete.

45 Los resultados se expresan como medias ± SD de triplicados del índice de estimulación.

50 Como se muestra en la figura 14, los péptidos de cacahuete eran capaces de inducir la proliferación de linfocitos T de ratas inmunizadas previamente con proteínas de cacahuete. Además, cualquiera que sea la concentración de péptidos de cacahuete en el medio de cultivo, la proliferación de linfocitos T era mayor cuando las ratas se inmunizaban previamente por vía subcutánea con péptidos de cacahuete en presencia de Adyuvante Incompleto de Freund.

Para cada dosis de péptidos de cacahuete, las ratas sin tratar no mostraban ninguna proliferación relevante.

La Figura 15 muestra un ensayo de proliferación de esplenocitos para ratas Lewis previamente inmunizadas con proteínas de cacahuete (100 µg/inyección) o péptidos de cacahuete (400 µg o 1 mg/inyección) en respuesta a dosis crecientes (desde 6,25 a 100 µg/ml) de proteínas de cacahuete.

- 5 La Figura 15 representa la proliferación de linfocitos T aumentando la dosis de proteínas de cacahuete purificadas. Aunque a bajo nivel cuando se compara con los linfocitos T de ratas inmunizadas con proteína de cacahuete, las proteínas de cacahuete purificadas también desencadenan una respuesta inmunitaria en los linfocitos T de ratas inmunizadas con péptidos de cacahuete administrados por vía subcutánea.

Las ratas sin tratar no mostraban una proliferación relevante cualquiera que sea la concentración de proteína de cacahuete en el medio de cultivo.

- 10 Los resultados se expresan como la media ± SD del triplicado del índice de estimulación.

Estos resultados demuestran que los péptidos de cacahuete han conservado una actividad biológica unida a la presencia de epítomos de linfocitos T, capaces de estimular respuestas inmunitarias específicas en animales inmunizados.

#### **Bloqueo potencial de los anticuerpos generados por los péptidos de cacahuete**

- 15 Las inmunoglobulinas inducidas por inmunización de conejos con péptidos de cacahuete inhibían la unión de IgE del paciente a los alérgenos proteicos.

La capacidad de los anti-péptidos de cacahuete y anti-proteínas de cacahuete de conejo para inhibir la unión de anticuerpos IgE de pacientes alérgicos a los cacahuetes a los alérgenos se examinó por experimentos de ELISA de competición.

- 20 Se incubaron placas de ELISA Maxisorp revestidas con 0,8 µl/ml (v/v) de proteínas de cacahuete durante 2 h a 37 °C con diluciones en serie de dos veces de antisuero de conejo contra péptidos de cacahuete o proteínas de cacahuete (con una dilución final de 1/2 a 1/1024) en presencia de suero humano agrupado diluido 1/50 (dilución final). Después de una incubación de una noche a 4 °C, se detectaron los anticuerpos IgE unidos con anticuerpos policlonales anti-IgE humana, acoplados a peroxidasa diluidos 1/8.000. Los valores de la densidad óptica correspondientes a la IgE unida se midieron a 450-650 nm. El porcentaje de inhibición de la unión de IgE alcanzado por la pre-incubación en presencia de suero de conejo (péptidos anti-cacahuete o proteínas anti-cacahuetes) se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \left[ \frac{\text{DO de la muestra inhibida}}{\text{media de DO de controles positivos}} \times 100 \right]$$

- 30 Los controles positivos eran 50 µl de sueros humanos agrupados diluidos 1/25 mezclados con 50 µl de suero pre-inmune de conejo (n = 10).

- 35 La Figura 16 muestra un ELISA de competición para la evaluación del bloqueo de la actividad de anticuerpo. Se revistieron placas de microtitulación con proteínas de cacahuete. El suero agrupado de pacientes alérgicos a los cacahuetes se mezcló con diluciones en serie de anticuerpos de conejo generados a péptidos o proteínas de cacahuete. Después de la incubación, la IgE que se une a la placa revestida de proteínas de cacahuete se detectaron utilizando anticuerpos anti-IgE humana marcados con peroxidasa.

- 40 En conclusión, los péptidos de cacahuete obtenidos por la presente invención presentan características favorables para su uso en inmunoterapia de la alergia. Además, se caracterizan por reducir la alergenicidad pero conservando la reactividad de linfocitos T. Además, los péptidos derivados de alérgenos son capaces para inducir una respuesta inmunitaria en animales y generan anticuerpos IgG con potencial de bloqueo de la unión de IgE humana contra los alérgenos.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de producción de alérgenos hidrolizados a partir de alérgenos que comprende las etapas de:

- a) extracción de una fuente de alérgenos que comprende proteínas alergénicas para formar un extracto en bruto,
- b) purificación del extracto en bruto para retirar los componentes no proteicos para formar un extracto purificado,
- 5 c) desnaturalización del extracto purificado con un primer agente de desnaturalización que es una mezcla de agentes caotrópicos y agentes reductores para formar un extracto desnaturalizado purificado,
- f) hidrolización de la mezcla de alérgenos desnaturalizados para formar los alérgenos hidrolizados,
- g) purificación de los alérgenos hidrolizados para retirar los péptidos con pesos moleculares por encima de 10.000 Da y por debajo de 1.000 Da, en el que un 70 % o más de los péptidos tienen entre 10.000 Da y 1.000
- 10 Da,

en el que la fuente de alérgenos son cacahuetes o ácaros del polvo doméstico **caracterizado por** las etapas

- d) refinado del extracto desnaturalizado purificado para retirar impurezas no unidas covalentemente a las proteínas para formar un extracto desnaturalizado refinado,
- 15 e) desnaturalización del extracto desnaturalizado refinado con un segundo agente de desnaturalización que es una mezcla de agentes caotrópicos y agentes reductores para formar un alérgeno desnaturalizado

entre las etapas c) y f).

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la extracción se lleva a cabo en una solución que no comprende sal o comprende una sal seleccionada de entre un carbonato, bicarbonato, fosfato, acetato, TRIS y HEPES, en el que la extracción se lleva a cabo preferentemente con un medio de extracción, en el que el peso del medio de extracción es al menos 20 veces, preferentemente 100 veces el peso de la fuente natural de alérgenos.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la purificación y/o refinado comprende uno o más de una etapa de cromatografía de intercambio iónico, una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño o filtración en gel, una etapa de precipitación, una etapa de cromatografía de interacción hidrófoba, una etapa de cromatografía de pseudo-afinidad o afinidad o una etapa de diafiltración.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la etapa de precipitación se lleva a cabo con una solución que comprende ácido tricloroacético.

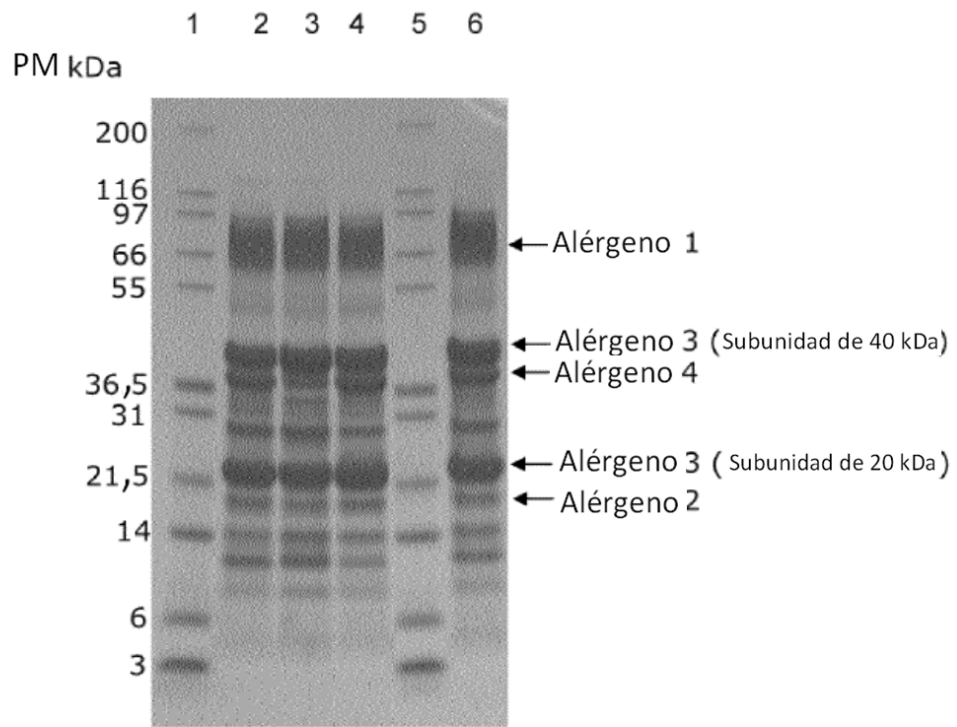
5. El procedimiento de una de las reivindicaciones precedentes 1 a 4, en el que la desnaturalización se lleva a cabo con un agente desnaturalizante que es una mezcla de agentes caotrópicos y agentes reductores seleccionados de entre el grupo de urea, cloruro de guanidinio, ditiotreitól, tioglicerol, β-mercaptoetanol, TCEP (tris ((2-carboxietil) fosfina) y mezclas de los mismos.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la concentración de urea es más de 4 M, preferentemente más de 6 M y/o la concentración de cloruro de guanidinio está por encima de 3 M, preferentemente por encima de 4 M.

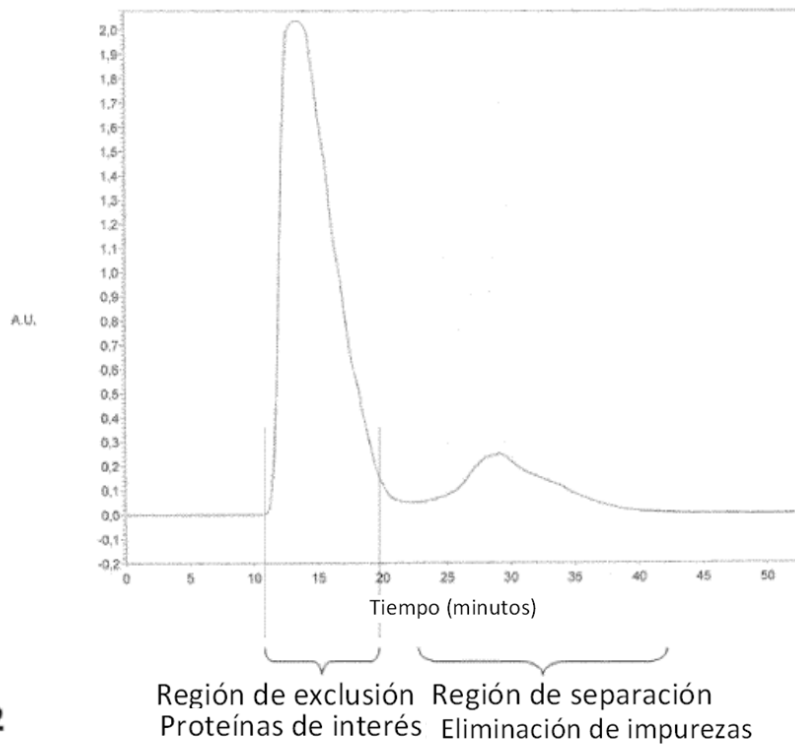
7. El procedimiento de una de las reivindicaciones precedentes 1 a 6, en el que la hidrólisis se lleva a cabo con una enzima, preferentemente pepsina, tripsina o quimotripsina, más preferentemente en el que la hidrolización se lleva a cabo en presencia de un agente caotrópico, preferentemente seleccionado de entre urea y cloruro de guanidinio y un reactivo reductor preferentemente de entre TCEP o DTT.

8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la retirada de los péptidos se lleva a cabo por cromatografía de exclusión por tamaño y/o por ultrafiltración, en el que la cromatografía de exclusión por tamaño se lleva a cabo en presencia de agentes caotrópicos, preferentemente seleccionados de entre urea, cloruro de guanidinio, etilenglicol, isopropanol y mezclas de los mismos.

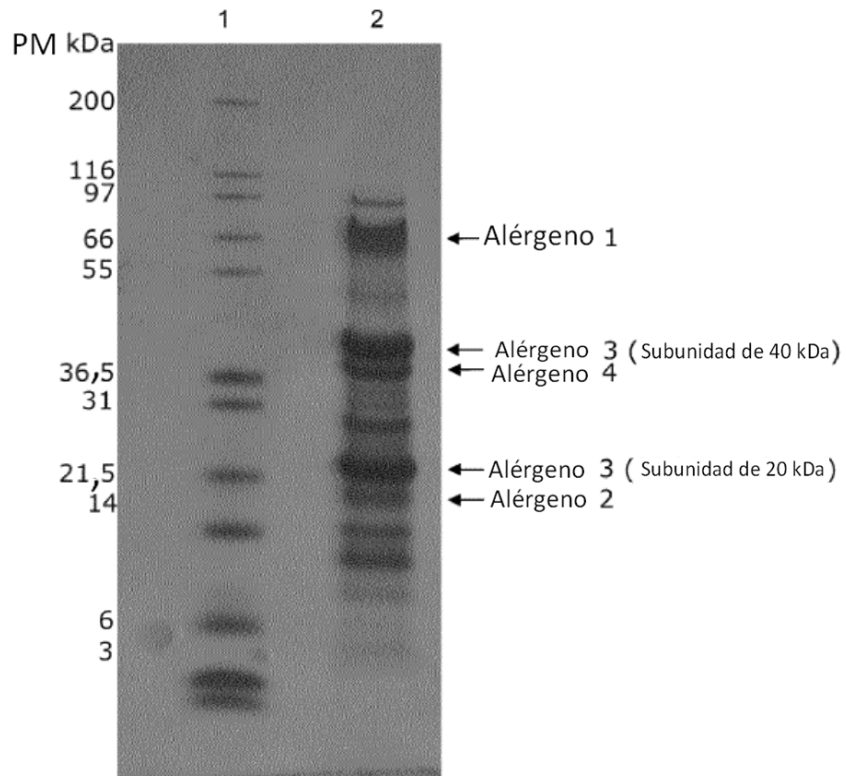
9. El procedimiento de una de las reivindicaciones precedentes 1 a 8, en el que las fuentes de alérgenos son cacahuetes, preferentemente una mezcla de al menos 2, más preferentemente 3 especies/subespecies/variedades/híbridos y/o cacahuetes transgénicos, en el que los cacahuetes se seleccionan de entre el género *Arachis*, preferentemente de la especie *hypogaea*, más preferentemente de *hypogaea* y *fastigiata*.



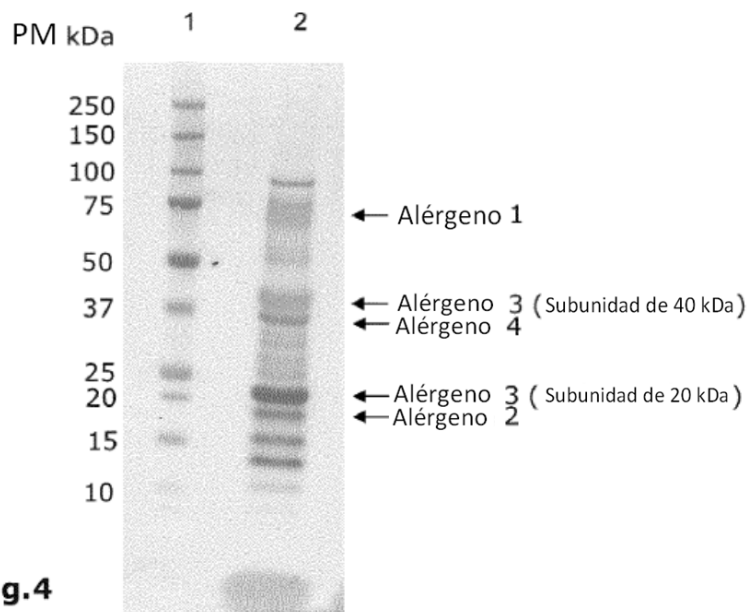
**Fig.1**



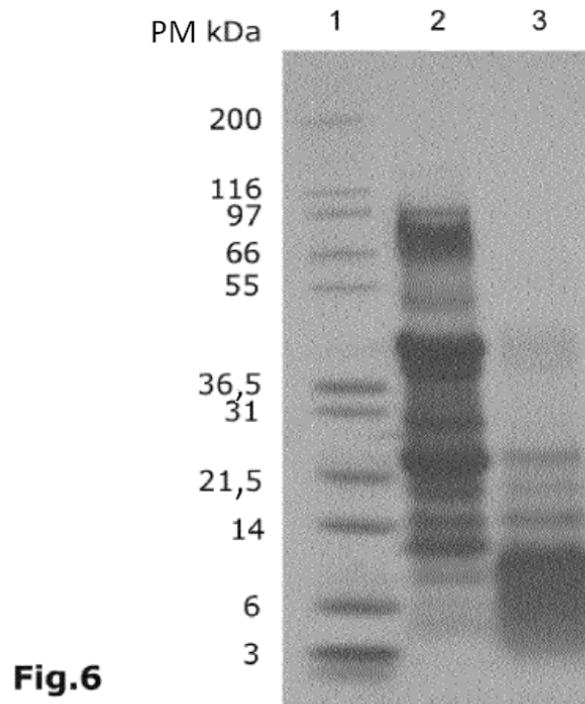
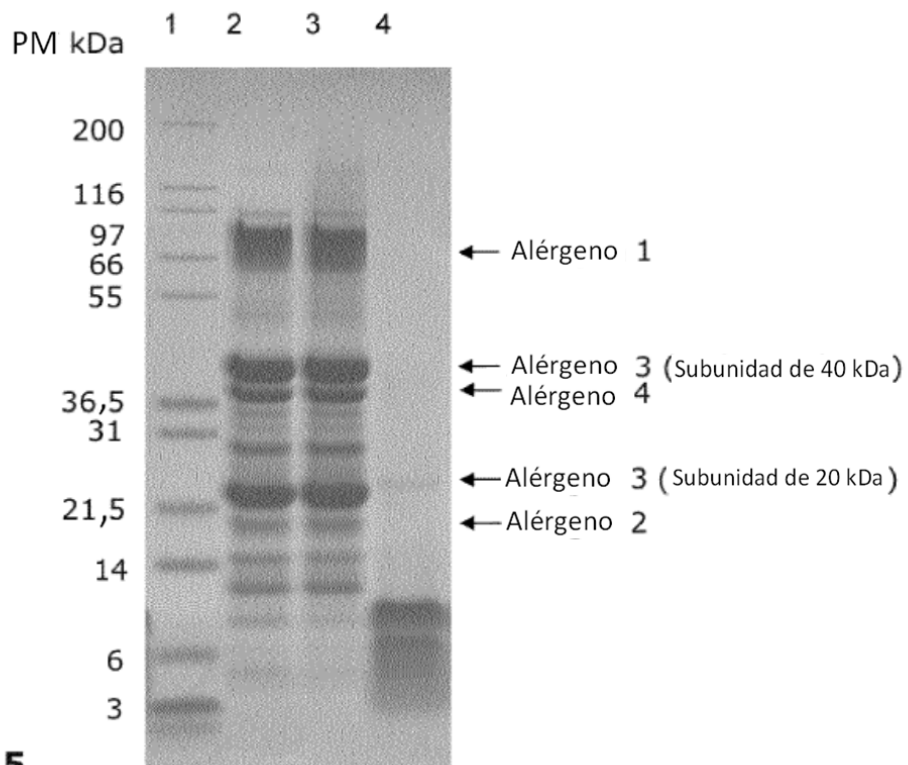
**Fig.2**

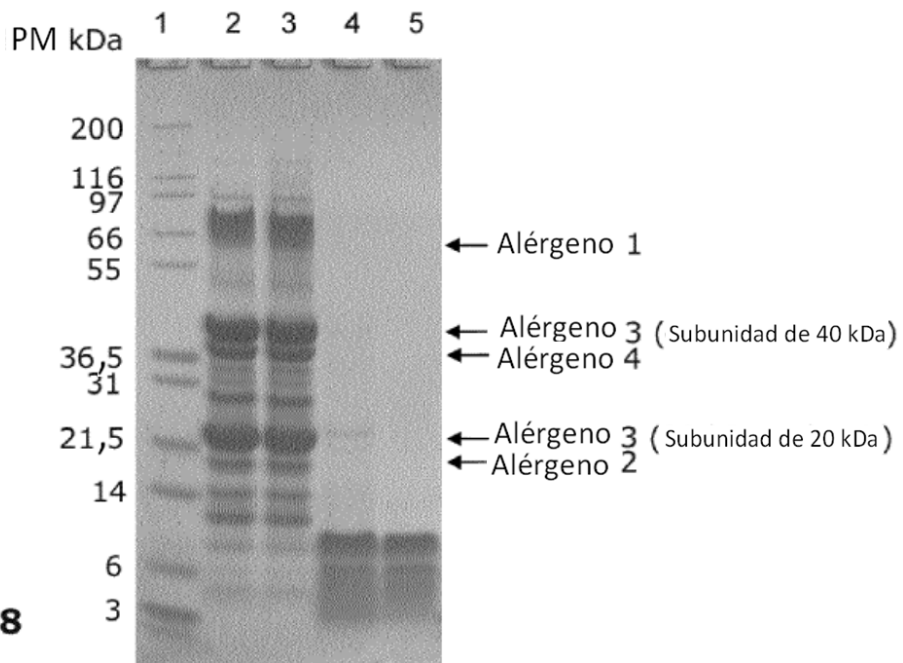
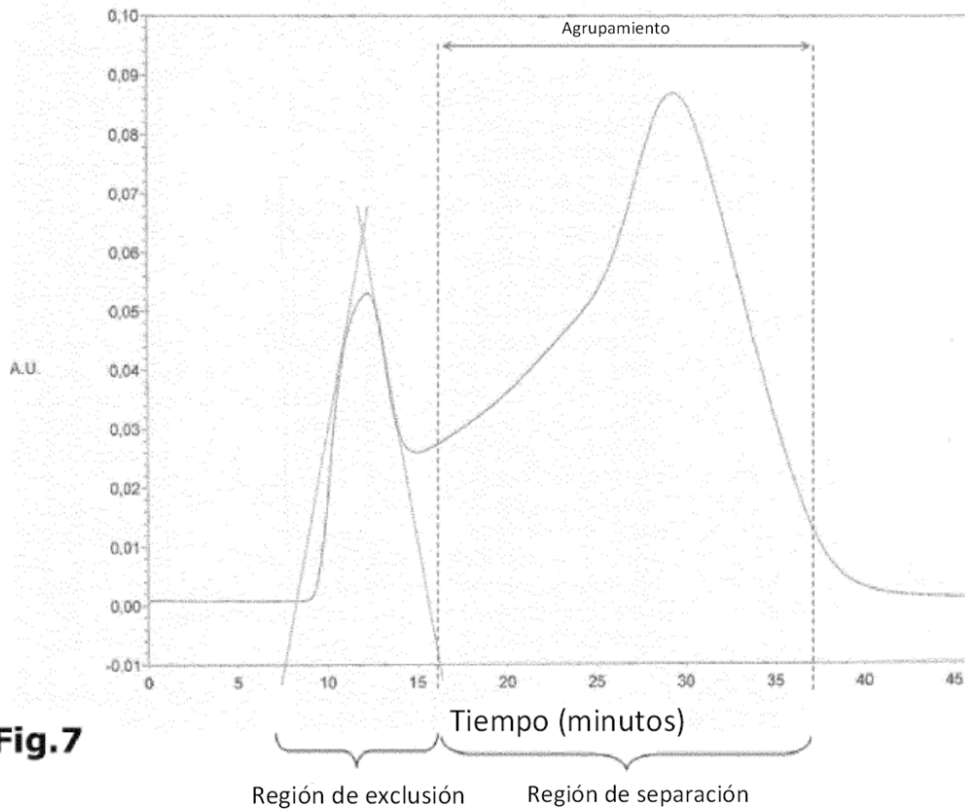


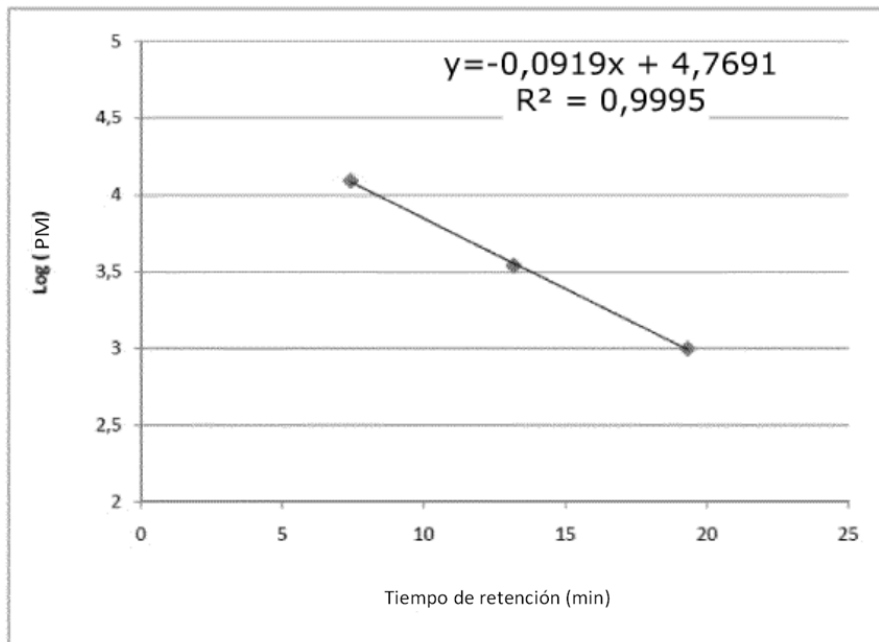
**Fig.3**



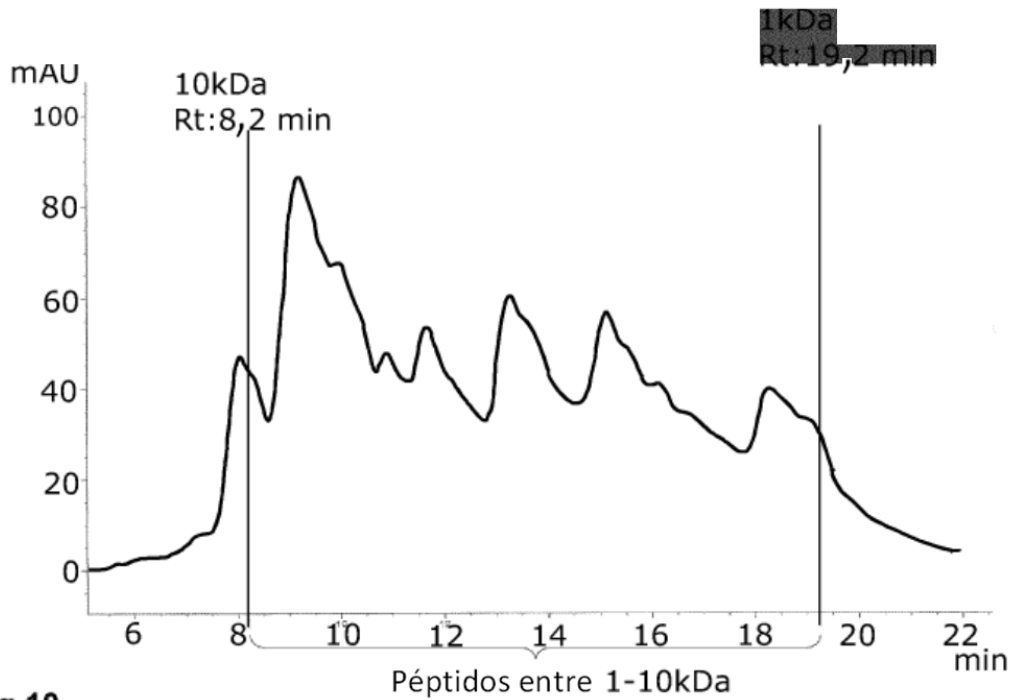
**Fig.4**





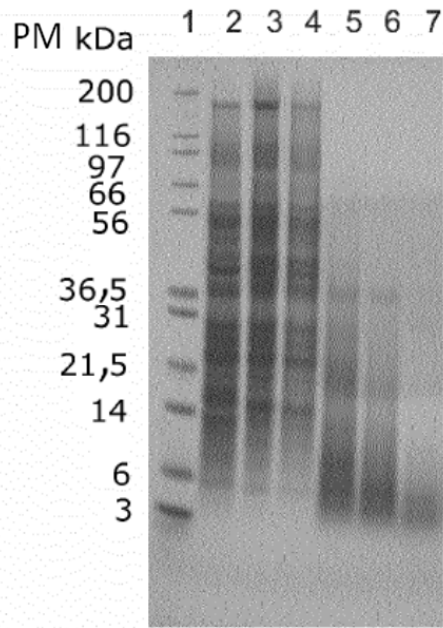


**Fig.9**

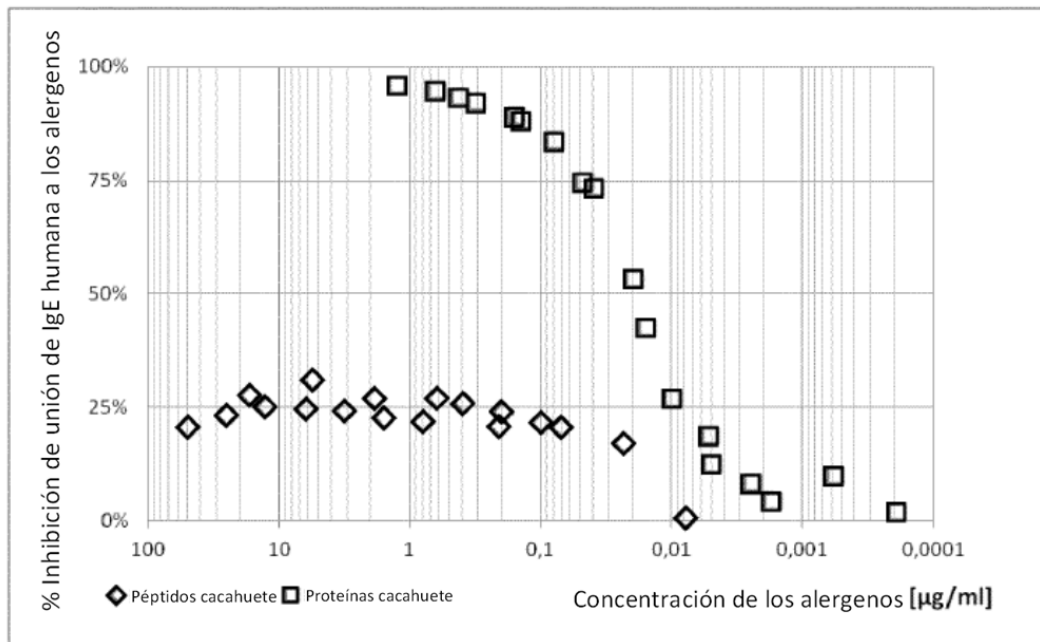


**Fig.10**

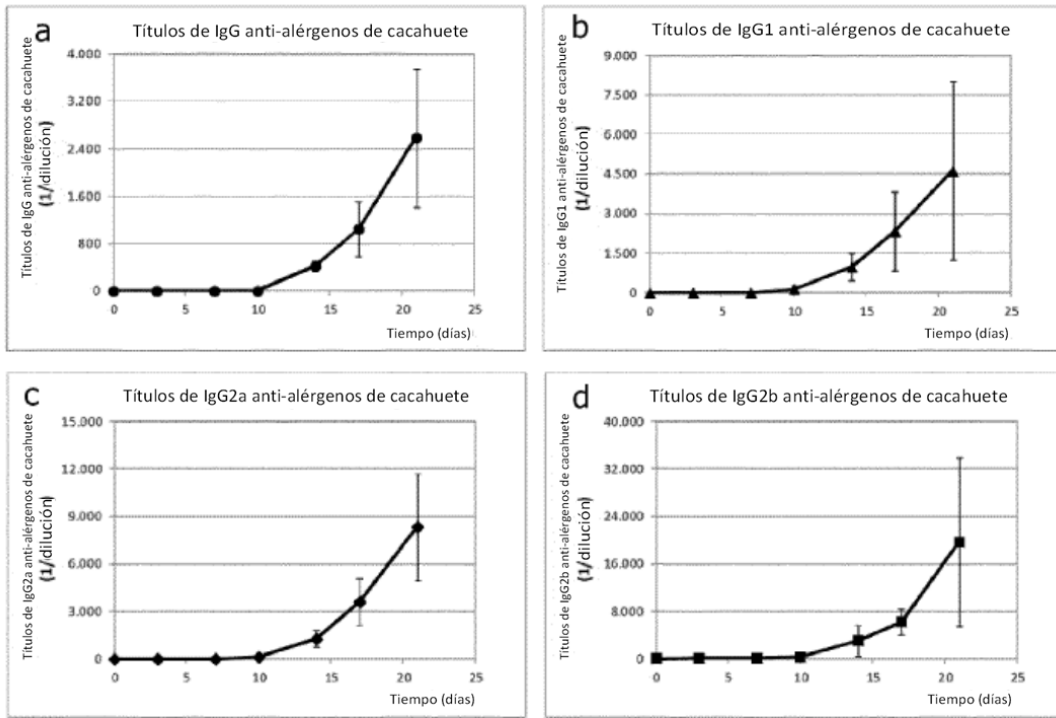




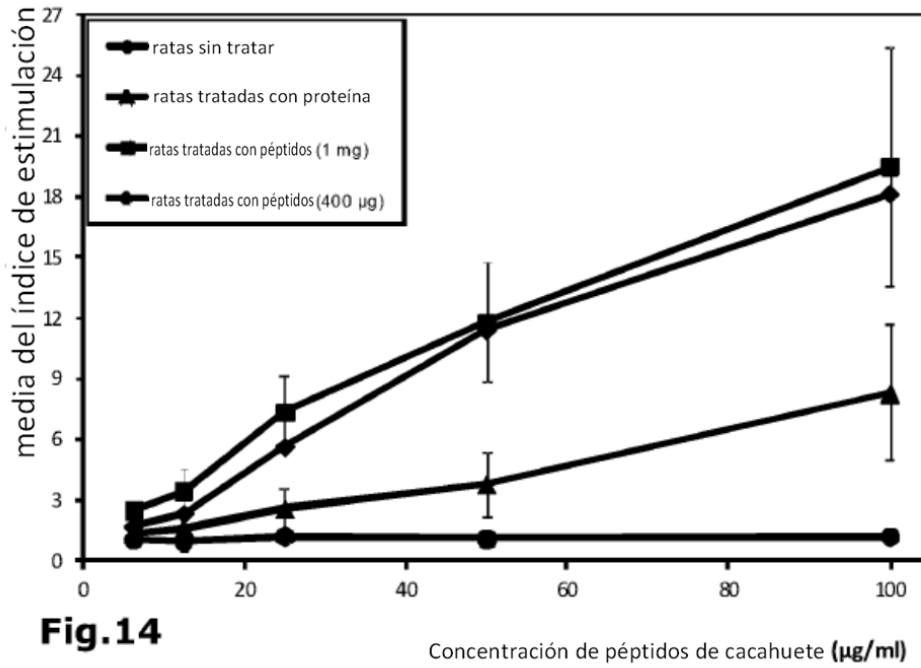
**Fig.11**

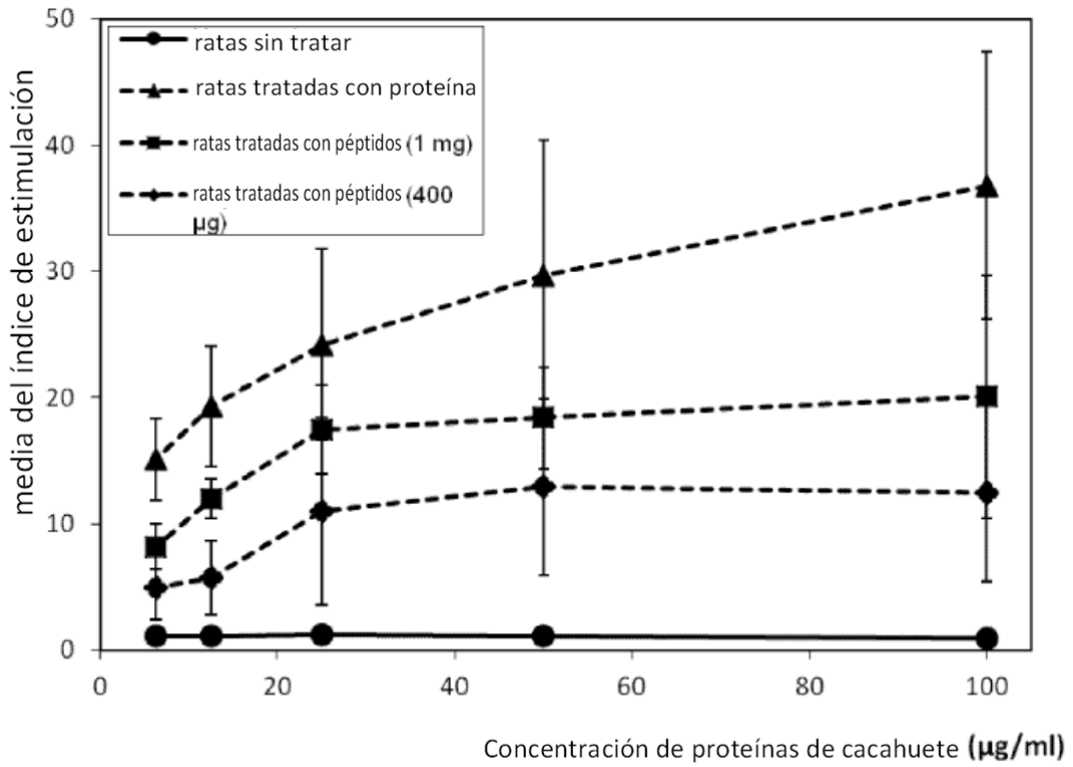


**Fig.12**

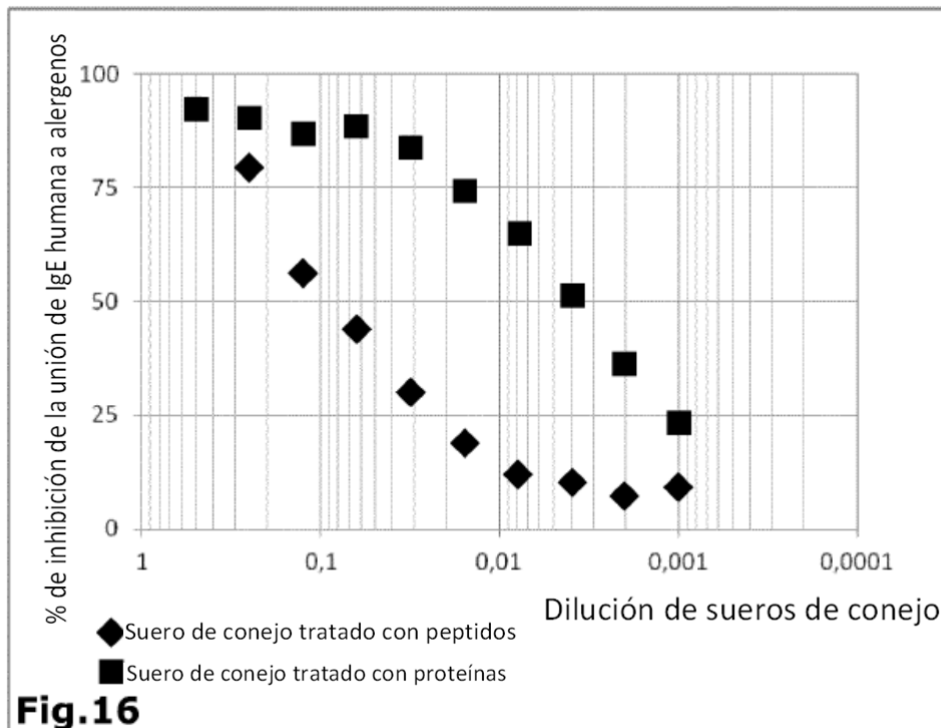


**Fig.13a-d**





**Fig.15**



**Fig.16**