

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 856 673**

51 Int. Cl.:

A23K 20/147 (2006.01)
A23K 50/10 (2006.01)
A23K 50/20 (2006.01)
A23K 50/30 (2006.01)
A23K 50/40 (2006.01)
A23K 50/75 (2006.01)
A23K 50/80 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2013 PCT/US2013/073807**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.07.2014 WO14107269**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2013 E 13812371 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2020 EP 2941300**

54 Título: **Composiciones IgA secretoras, métodos de fabricación y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

04.01.2013 US 201313734426

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.09.2021

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
614 Walnut Street, 13th Floor
Madison, WI 53726, US**

72 Inventor/es:

**SAND, JORDAN MARSHALL y
COOK, MARK ERIC**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 856 673 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

Composiciones IgA secretoras, métodos de fabricación y métodos de uso de las mismas

5 Campo de la divulgación

La presente divulgación está relacionada con métodos para producir IgA secretora, IgA secretora purificada, composiciones que comprenden IgA secretora y métodos de uso de las mismas.

10 Antecedentes

La inmunoglobulina A es la más abundante de las cinco clases de inmunoglobulina y se encuentra principalmente en la mucosa del tracto gastrointestinal y el tracto respiratorio. Hay dos tipos de inmunoglobulina A, la IgA secretora y la IgA sérica. La IgA sérica es generalmente un monómero que se encuentra en el suero de muchas especies, donde funciona como una segunda línea de defensa que media en la eliminación de patógenos que han traspasado la superficie de la mucosa. La IgA secretora (SIgA) es dimérica o polimérica y contiene un componente secretor además de la IgA. SIgA es un componente común de la leche materna para las crías y una proteína secretada en el sistema gastrointestinal durante el desarrollo posterior al destete y la edad adulta. Se ha sugerido que la administración sistémica de IgA puede proteger contra la progresión de la inflamación que conduce al choque séptico. Actualmente no existe ningún método ideado para corregir una deficiencia de SIgA en el tracto gastrointestinal de animales y humanos y no hay evidencia de que dicha administración pueda corregir estos trastornos.

Se ha demostrado que SIgA se une a una amplia variedad de proteínas ambientales y polisacáridos (por ejemplo, bacterias, virus, toxinas, componentes alimenticios) impidiendo su entrada en el cuerpo y la activación de los mecanismos inmunitarios inflamatorios del huésped. Actualmente, no se conoce ningún mecanismo para la producción de SIgA con un rango diverso de actividad de unión a antígeno aparte de la síntesis en un animal (por ejemplo, SIgA con actividad de unión a antígeno diversa no se puede producir usando química, microorganismos recombinantes en fermentación o células madre). Además, cuanto más diversa es la exposición de un animal a las agresiones medioambientales, mayor es el repertorio y la diversidad de la actividad SIgA. Para explorar el uso de SIgA como suplemento dietético/oral para el tratamiento de enfermedades, debe haber una fuente de SIgA que se pueda recolectar directamente de un animal. Además, es ventajoso que la cantidad de material recolectado sea rentable en relación con el tratamiento de la enfermedad porque muchas enfermedades tratables con SIgA no son lo suficientemente peligrosas para la vida como para justificar una terapia farmacéutica costosa.

Lo que se necesita es una fuente de SIgA que pueda usarse como complemento para tratar trastornos relacionados con SIgA.

Bourne et al. (Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure 229 (1) 18-25 (1971)) divulga que la IgA aislada de la mucosa intestinal y el jugo intestinal posee características antigénicas en común con otras moléculas de SIgA.

Porter et al. (Immunology 18 909-920 (1970)) divulga la secreción intestinal de inmunoglobulinas y anticuerpos contra *Escherichia coli* en el cerdo.

El documento EP 0479597 A2 divulga procesos para producir preparaciones de SIgA que no contienen virus.

Yonghao et al. (Journal of Northeast Agricultural University 15 (1) 58-61 (2008)) divulga métodos de aislamiento y purificación de calostro bovino SIgA e IgG.

El documento US 3658551 divulga un alimento para animales carnívoros producido al cocinar un producto cárnico para pasteurizarlo, enfriarlo al vacío mientras se reduce el agua y luego se agrega ácido como conservante.

Mantis et al. (Mucosal Immunology 4 (6) 603-611 (2011)) divulga las funciones de SIgA en la inmunidad y la homeostasis de la mucosa en el intestino.

El documento WO 2009/156301 A1 divulga una combinación de probióticos con SIgA y usos de esta combinación, como para la preparación de un producto para tratar o prevenir la inflamación.

El documento US 2011/0305753 A1 divulga un proceso para inhibir los síntomas de alergia o intolerancia alimentaria en un sujeto que incluye la administración oral de una IgA o una IgM.

Boullier et al. (The Journal of Immunology 183 (9) 5879-5885 (2009)) divulga que la neutralización de *Shigella flexneri* mediada por SIgA previene la destrucción del tejido intestinal al regular a la baja los circuitos inflamatorios.

El documento US 2008/0145420 A1 divulga una composición para tratar un sujeto que incluye un agente terapéutico de IgA dimérica o polimérica y un proceso para fabricar un medicamento para el tratamiento de la enfermedad asociada

a *C. difficile* en un ser humano en el que la modificación secuencial de IgA monomérica con La cadena J y el componente secretor se utilizan para formar un agente terapéutico de IgA dimérico o polimérico.

Kim et al. (Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 14 (3) 338-345 (2001)) divulga la proporción dietética óptima de proteína plasmática secada por aspersión y solubles porcinos secos para mejorar el rendimiento del crecimiento y el estado inmunológico en cerdos destetados a los 21 días de edad.

Balan et al. (The Journal of Nutrition 139 (2) 244-249 (2009)) divulga que las inmunoglobulinas de suero ovino administradas por vía oral influyen en el rendimiento del crecimiento, el peso de los órganos y la morfología intestinal en ratas en crecimiento.

El documento WO 02/063948 A2 divulga un método para aumentar el peso vivo de las aves de corral mediante la administración de un producto de plasma a las aves de corral a través del alimento y/o agua del animal.

RU 2005/109538 A divulga métodos para producir SIgA a partir del fluido biológico de animales.

Breve resumen

En un aspecto, una composición alimenticia comprende una composición alimenticia basal y más de 0.1 mg/kg de IgA secretora intestinal eficaz para aumentar la tasa de crecimiento, mejorar la eficiencia de la alimentación, reducir la inflamación gastrointestinal, reducir el riesgo de infección gastrointestinal en el animal, o una combinación de los mismos, en el que la IgA secretora intestinal es

(i) proporcionada como una preparación de fluido luminal intestinal que contiene IgA secretora intestinal pasteurizada, en el que dicha preparación de fluido luminal intestinal se prepara a partir del fluido luminal intestinal de un cerdo o una vaca o una preparación de mucosa intestinal que contiene IgA secretora intestinal pasteurizada, en el que dicha preparación de mucosa se prepara a partir de la mucosa intestinal de un cerdo o una vaca, en la que más del 10 % del material proteínico en la preparación de fluido luminal intestinal o en la preparación de mucosa intestinal es IgA, o

(ii) proporcionada como mucosa intestinal seca sin hidrolizar de un cerdo o una vaca.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una IgA secretora intestinal para su uso en un método para reducir la inflamación gastrointestinal, reducir el riesgo de infección gastrointestinal, o una combinación de los mismos en un sujeto, dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad de IgA secretora eficaz para reducir la inflamación gastrointestinal, reducir el riesgo de infección gastrointestinal, o una combinación de los mismos en el sujeto, en el que la IgA secretora intestinal es

(i) proporcionada como una preparación de fluido luminal intestinal que contiene IgA secretora intestinal pasteurizada, en el que dicha preparación de fluido luminal intestinal se prepara a partir del fluido luminal intestinal de un cerdo o una vaca o una preparación de mucosa intestinal que contiene IgA secretora intestinal pasteurizada, en el que dicha preparación de mucosa se prepara a partir de la mucosa intestinal de un cerdo o una vaca, en la que más del 10 % del material proteínico en la preparación de fluido luminal intestinal o en la preparación de mucosa intestinal es IgA, o

(ii) proporcionada como mucosa intestinal seca sin hidrolizar de un cerdo o una vaca.

También se divulga un proceso para purificar IgA secretora, que comprende tratar el fluido luminal intestinal de un cerdo con polietilenglicol que tiene un peso molecular de 3000 a 30,000 para precipitar la IgA secretora y aislar la IgA secretora precipitada. También se describe un método para preparar un alimento para animales que comprende secar la mucosa intestinal de cerdo o vaca no hidrolizada y añadir la mucosa intestinal de cerdo o vaca seca y no hidrolizada a una composición alimenticia animal basal.

Los expertos en la técnica apreciarán y comprenderán las características descritas anteriormente y otras a partir de la siguiente descripción detallada, dibujos y reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada

SIgA es una inmunoglobulina con diversa actividad de unión al antígeno. Cuando la SIgA se libera de la mucosa al ambiente externo, forma complejos inmunes con patógenos, antígenos alimenticios y alérgenos, evitando así que se unan y penetren en la mucosa intestinal. Por tanto, la SIgA purificada se puede utilizar para complementar la deficiencia de SIgA y para mejorar la ganancia de peso y/o la eficiencia alimentaria en los animales.

Actualmente, los intestinos de cerdo y vaca se utilizan típicamente como fuente de heparina. La heparina es un glicosaminoglicano altamente sulfatado, ampliamente utilizado como anticoagulante. Al igual que SIgA, la heparina no se puede producir mediante métodos químicos modernos y se aísla de fuentes biológicas. La heparina se purifica típicamente de todo el intestino del cerdo o del revestimiento endotelial (mucosa) mediante un procedimiento que implica temperatura elevada, presión elevada y/o proteasas para separar la heparina del tejido. La purificación final

normalmente implica el uso de una resina de intercambio catiónico. La SIgA puede aislarse del fluido luminal intestinal durante la preparación de los intestinos para la extracción de heparina, así como de la mucosa intestinal.

Como se usa en el presente documento, el fluido luminal intestinal es el fluido que se encuentra dentro del lumen intestinal de un animal. El lumen es la cavidad interior del intestino por donde pasan los alimentos digeridos y se absorben los nutrientes. La composición del fluido luminal intestinal varía según la dieta, el estado de ayuno/alimentación y el estado patológico del organismo. El fluido luminal intestinal contiene, por ejemplo, lípidos; proteínas que incluyen SIgA; bacterias; iones como sodio, potasio y calcio; y materiales sólidos no digeridos.

También como se usa en el presente documento, mucosa intestinal se refiere a la pared interna (revestimiento luminal) del intestino. El intestino incluye una pared externa llamada serosa, capas musculares medias y un interior llamado mucosa.

En el presente documento se divulga una composición que comprende SIgA aislada y/o pura. La SIgA aislada o pura puede aislarse o purificarse del fluido luminal intestinal o de la mucosa intestinal de un cerdo o una vaca.

Como se usa en este documento, el término proteína "aislada" incluye moléculas de proteína que están separadas de al menos una fracción de la otra proteína o moléculas no proteicas presentes en la fuente natural de la proteína. Una proteína aislada está libre de una cantidad sustancial de material celular u otros polipéptidos contaminantes de la célula, el tejido o la fuente de fluido corporal de la que se deriva la proteína. La SIgA aislada puede tener una concentración de SIgA dos veces mayor que la concentración en el material de origen, es decir, el doble de la concentración de SIgA en la mucosa intestinal o el fluido luminal de origen. SIgA aislada puede tener una concentración de tres, cuatro, cinco, diez o más veces en comparación con la concentración en la mucosa intestinal de origen.

La IgA secretora también se puede aislar de una fuente que es la mucosa intestinal de un cerdo o una vaca, en donde la concentración de IgA secretora en la IgA secretora aislada es al menos dos veces la concentración en el material de origen, donde el material de origen es mucosa intestinal seca, una preparación acuosa de mucosa intestinal o una preparación seca de proteínas preparada a partir de la mucosa intestinal.

Una preparación de SIgA aislada puede ser una preparación seca procedente de la mucosa intestinal, en la que el 5 % o más del material proteico en la SIgA aislada comprende IgA. Sin restringirse a la teoría, se considera que hay 5-10 g de SIgA por cada 100 g de proteína de la mucosa. En otros casos, más del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 % del material proteico en la SIgA aislada comprende IgA.

El término puro con referencia a SIgA significa que SIgA está aislado y que los componentes de SIgA (IgA y componentes secretores) comprenden más del 75 %, específicamente más del 85 % y más específicamente más del 95 % de la proteína en la muestra. La SIgA pura se puede preparar a partir de la mucosa intestinal o del fluido luminal intestinal.

La pasteurización es un proceso de calentar un fluido a una temperatura específica durante un período de tiempo definido y luego enfriar sustancialmente inmediatamente el líquido. El objetivo de la pasteurización es reducir la cantidad de patógenos viables en un líquido. Las condiciones ejemplares para la pasteurización son 50-100 °C durante 5-30 segundos o 120-150 °C durante 1-8 segundos, para una pasteurización estable en almacenamiento. Como se muestra en el presente documento, la pasteurización del SIgA aislado de la mucosa intestinal del cerdo puede ser importante en el uso de las preparaciones de SIgA para aumentar la eficiencia alimenticia en pollos.

La composición de SIgA pura puede tener una actividad de unión a lipopolisacárido (LPS) de IgA secretora al menos 5 veces mayor que la actividad de unión a lipopolisacárido de IgA en suero. Un ELISA indirecto puede demostrar la actividad de unión a LPS. El LPS se recubre sobre una placa de microvaloración. Se añade SIgA intestinal o IgA sérica en diversas diluciones al LPS unido en la placa de microvaloración. Después de eliminar la SIgA no unida mediante lavado, se detecta la cantidad de SIgA que se une al LPS unido a la placa usando un anticuerpo anti-IgA conjugado con una enzima como peroxidasa de rábano picante más sustrato. La unión aumentada se produce cuando una cantidad dada de SIgA intestinal tiene una mayor capacidad de unión en relación con la misma cantidad de IgA en suero.

Un proceso para purificar una composición de SIgA puede comprender tratar el fluido luminal intestinal de un cerdo o vaca con polietilenglicol que tiene un peso molecular de 3000 a 30.000 y aislar el SIgA precipitado. La SIgA puede enriquecerse al menos dos veces en comparación con la concentración de SIgA en el fluido luminal intestinal. El método puede comprender además resuspender el SIgA precipitado en una solución de polietilenglicol que tiene un peso molecular de 3000 a 30.000 para producir SIgA reprecipitado, y aislar el SIgA reprecipitado. La resuspensión y precipitación se pueden repetir hasta que se produzca una composición de SIgA pura como se describe en este documento.

La composición de SIgA precipitada se puede pasteurizar como se describió anteriormente.

El SIgA puro precipitado se puede someter a tratamientos/pasos de purificación adicionales, tales como esterilización por filtración, precipitaciones con etanol helado (inferior a 0 °C para disolver el PEG y dejar solo la proteína pura), desalación. Otros procedimientos de purificación, como precipitaciones de sulfato de sodio y gamma carragenano, y cromatografía de exclusión por tamaño.

La SIgA puede prepararse a partir de la mucosa intestinal de un cerdo o una vaca. La preparación de SIgA puro o aislado puede incluir lisar la mucosa intestinal, eliminar los desechos por centrifugación, por ejemplo, y luego las proteínas en el sobrenadante se precipitan secuencialmente usando varias concentraciones de polietilenglicol (3.5-15 % p/v) que tiene un peso molecular. de 3000 a 30.000, de modo que la SIgA se aislará de otras proteínas en la preparación de la mucosa.

La SIgA puede estar en forma de mucosa intestinal seca de un cerdo o una vaca, en la que la mucosa intestinal no está hidrolizada. La mucosa intestinal seca puede contener una cantidad de SIgA eficaz para aumentar la tasa de crecimiento y/o mejorar la eficiencia alimentaria en un animal. Si bien la mucosa intestinal del cerdo se ha utilizado anteriormente como fuente de aminoácidos en alimentos para animales, la mucosa intestinal se hidrolizó para reducir las proteínas constituyentes a aminoácidos. Los inventores de la presente solicitud han descubierto inesperadamente que la mucosa intestinal de cerdo o vaca seca, sin hidrolizar, es una fuente de SIgA. La mucosa intestinal seca, no hidrolizada de cerdo o vaca se puede utilizar, por ejemplo, como suplemento en composiciones alimenticias para animales. Como se usa en este documento, el término no hidrolizado significa que una preparación no ha sido tratada con enzimas, calor (más de 90 °C) o productos químicos en condiciones que se espera que reduzcan las proteínas constituyentes a aminoácidos.

La mucosa intestinal seca se puede liofilizar, secar en tambor o secar por aspersión.

También se divulga en el presente documento un método para aumentar la tasa de crecimiento, aumentar la eficiencia de la alimentación, reducir la inflamación gastrointestinal, reducir el riesgo de infección gastrointestinal o una combinación de los mismos en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad de SIgA eficaz para aumentar la tasa de crecimiento, mejorar la eficacia de la alimentación, reducir la inflamación gastrointestinal, reducir el riesgo de infección gastrointestinal en el sujeto, o una combinación de los mismos. Los sujetos ejemplares incluyen seres humanos, aves, porcinos, bovinos, ovinos, caprinos, peces, reptiles, moluscos, animales invertebrados, caballos, perros o gatos. El SIgA se puede añadir como SIgA puro o aislado preparado a partir del fluido luminal intestinal o la mucosa intestinal de un cerdo o una vaca como se describe en el presente documento. Alternativamente, el SIgA se agrega como mucosa intestinal seca no hidrolizada. En un caso, el animal es un pollo y el SIgA se administra en forma de una composición alimenticia para animales que comprende el SIgA que tiene una eficiencia alimenticia mejorada en comparación con una composición alimenticia basal. En un caso, el animal es un cerdo y el SIgA se administra en forma de una composición alimenticia para animales que comprende el SIgA que tiene una eficiencia alimenticia mejorada en comparación con una composición alimenticia basal.

En una realización, la invención proporciona IgA secretora intestinal para su uso en un método para reducir la inflamación gastrointestinal, reducir el riesgo de infección gastrointestinal, o una combinación de los mismos en un sujeto, dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad de secreción intestinal IgA eficaz para reducir la inflamación gastrointestinal, reducir el riesgo de infección gastrointestinal o una combinación de los mismos en el sujeto, en el que la IgA secretora intestinal:

(i) se proporciona como una preparación de fluido luminal intestinal que contiene IgA secretora intestinal pasteurizada, en el que dicha preparación de fluido luminal intestinal se prepara a partir del fluido luminal intestinal de un cerdo o una vaca o una preparación de mucosa intestinal que contiene IgA secretora intestinal pasteurizada, en el que dicha preparación de mucosa se prepara a partir de la mucosa intestinal de un cerdo o una vaca, en la que más del 10 % del material protéico en la preparación de fluido luminal intestinal o en la preparación de mucosa intestinal es IgA, o

(ii) se proporciona como mucosa intestinal seca sin hidrolizar de un cerdo o una vaca. Los animales ejemplares incluyen aves, porcinos, bovinos, ovinos, caprinos, peces, reptiles, moluscos, animales invertebrados, caballos, perros o gatos.

En otra realización, una composición alimenticia eficaz para aumentar la tasa de crecimiento, mejorar la eficiencia de la alimentación, reducir la inflamación gastrointestinal, reducir el riesgo de infección gastrointestinal en el animal, o una combinación de las mismas, comprende una composición alimenticia basal y más de 0.1 mg/Kg de SIgA intestinal en el que la IgA secretora intestinal:

(i) se proporciona como una preparación de fluido luminal intestinal que contiene IgA secretora intestinal pasteurizada, en el que dicha preparación de fluido luminal intestinal se prepara a partir del fluido luminal intestinal de un cerdo o una vaca o una preparación de mucosa intestinal que contiene IgA secretora intestinal pasteurizada, en la que dicha preparación de mucosa se prepara a partir de la mucosa intestinal de un cerdo o una vaca, en la que más del 10 % del material protéico en la preparación de fluido luminal intestinal o en la preparación de mucosa intestinal es IgA, o

(ii) se proporciona como mucosa intestinal seca sin hidrolizar de un cerdo o una vaca.

La cantidad exacta de SlgA eficaz para aumentar la tasa de crecimiento, mejorar la eficiencia de la alimentación, reducir la inflamación gastrointestinal o reducir el riesgo de infección gastrointestinal en el animal puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica.

El término “composición alimenticia básica” se refiere a una composición alimenticia combinable con aditivos tales como las composiciones de SlgA descritas en el presente documento. Las composiciones alimenticias basales pueden ser adecuadas para la ingestión de un ser humano o un animal. Las composiciones alimenticias ejemplares adecuadas para la ingestión por parte de un ser humano incluyen una fórmula nutricionalmente completa, un producto lácteo, una bebida fría o estable en almacenamiento, una sopa, un suplemento dietético como una vitamina, un sustituto de comidas, una barra nutricional, dulces u otras composiciones alimenticias.

El término “composición básica alimenticia para animales” se refiere a un alimento para animales combinable con aditivos tales como las composiciones de SlgA descritas en el presente documento. Las composiciones básicas alimenticias para animales pueden incluir componentes tales como proteínas, granos, composiciones de sabor, vitaminas, minerales, conservantes y similares. En realizaciones específicas, la composición básica alimenticia para animales es para aves, porcinos, bovinos, ovinos, caprinos, peces, reptiles, moluscos, animales invertebrados, caballos, perros o gatos.

En una realización, la composición alimenticia animal basal es para un pollo y en la que la composición alimenticia animal tiene una eficiencia alimenticia mejorada en comparación con la composición alimenticia basal. En una realización adicional, la composición alimenticia para pollos comprende de 1 mg a 10 g de SlgA/kg de alimento para pollos.

En una realización, el SlgA se añade a una composición alimenticia basal en forma de mucosa intestinal seca de un cerdo o una vaca, en la que la mucosa intestinal seca no está hidrolizada. En una realización, la concentración es de 1 mg/kg a 10 g/kg de la mucosa intestinal seca a la composición alimenticia animal basal. En una realización específica, la composición alimenticia basal es para un pollo y en la que la composición alimenticia animal tiene una eficiencia alimenticia mejorada en comparación con la composición alimenticia basal.

En el presente documento se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden SlgA puro, pasteurizado y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Como se usa en este documento, “composición farmacéutica” significa cantidades terapéuticamente efectivas del compuesto junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes y adyuvantes. Como se usa en este documento, los “excipientes farmacéuticamente aceptables” son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden estar en forma de dosis unitaria y pueden contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, por ejemplo, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo, lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o glicina; lubricante para formación de comprimidos, por ejemplo, estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; desintegrantes, por ejemplo almidón de patata, o agentes humectantes aceptables como lauril sulfato de sodio. Los comprimidos se pueden recubrir de acuerdo con métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires acuosos u oleosos, o pueden presentarse como un producto seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo sorbitol, jarabe, metilcelulosa, jarabe de glucosa, grasas comestibles hidrogenadas de gelatina; agentes emulsionantes, por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitán o goma arábiga; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo, aceite de almendras, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos como glicerina, propilenglicol o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico y, si se desea, agentes aromatizantes o colorantes convencionales.

Para la aplicación tópica a la piel, el fármaco se puede convertir en una crema, loción o ungüento. Las formulaciones de cremas o ungüentos que pueden usarse para el fármaco son formulaciones convencionales bien conocidas en la técnica. La administración tópica incluye formulaciones transdérmicas como parches.

Para la aplicación tópica en el ojo, el inhibidor puede prepararse en una solución o suspensión en un vehículo acuoso o no acuoso estéril adecuado. Aditivos, por ejemplo, tampones tales como metabisulfito de sodio o edeato de disodio; También se pueden incluir conservantes que incluyen agentes bactericidas y fungicidas tales como acetato o nitrato fenilmercúrico, cloruro de benzalconio o clorhexidina, y agentes espesantes tales como hipromelosa.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1. Aislamiento de SlgA de la materia luminal de cerdos sacrificados comercialmente

Se recogió fluido luminal de cerdos sacrificados comercialmente. El fluido luminal se combinó con PEG 8000 al 3.5 % p/v (peso molecular de polietilenglicol 6000-8000) y se centrifugó a 14,000 x g, 4 °C durante 10 minutos. El

líquido clarificado se recogió y se filtró a través de lana de vidrio para eliminar las grasas que pudieran quedar. A continuación, el líquido clarificado se combinó con PEG 8000 al 8.5 % p/v y se centrifugó a 14,000 x g, 4 °C durante 10 minutos. A continuación, se vertió el sobrenadante y se resuspendió el sedimento dentro del tubo en PEG al 12 % 8000 p/v en agua desionizada. A continuación, la mezcla se centrifugó a 14.000 x g, 4 °C durante 10 minutos. A continuación, se vertió el sobrenadante y el sedimento restante se congeló a -80 °C y luego se liofilizó. La pureza del sedimento se determinó mediante ELISA. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos con anticuerpo IgA anti-cerdo de cabra (120 ul) de Bethyl Laboratories (Montgomery TX) disuelto en tampón de recubrimiento (1.59 g de Na₂CO₃, 2.93 g de NaHCO₃, 0.2 g de NaN₃, pH 9.6, volumen total de 1000 ml) durante la noche para permitir la unión del anticuerpo a la placa Nunc Maxisorp® F (Thermo-Fisher Scientific, Rochester NY). Después, las placas se bloquearon con tampón de bloqueo libre de proteínas (Pierce, Rockford IL) durante 1 hora. A continuación, las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween al 0.05 % (Fisher-Scientific, Pittsburgh PA). A continuación, se añadieron muestras a la placa en diluciones de 10 veces de 1: 10-1: 1.000.000.000 para determinar la cantidad de IgA presente durante 1 hora. Se proporcionó suero de referencia de cerdo como control. A continuación, las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween al 0.05 %. A continuación, se añadió anticuerpo secundario de cabra anti-IgA porcina (Bethyl Laboratories, Montgomery TX) en tampón de bloqueo (5 ul de anticuerpo 2 °: 12.5 ml de tampón de bloqueo) durante 30 minutos. Las placas se lavaron 6 veces con tampón de lavado. A continuación, se añadió el sustrato en tampón de sustrato (97 ml de dietanolamina, 100 mg de MgCl₂, 0.2 g de NaN₃, 800 ml de ddH₂O, pH 9.8), se incubó durante 15 minutos y luego se leyó a 450 nm.

Tabla 1: Cantidad de IgA aislada del líquido luminal

Dilución	OD	Cantidad de proteína		
10	1.094	1737.572		
100	1.047	1100.952		
1000	0.994	658.1045		
10000	0.995	664.525		
100000	1.04	1028.615		
1000000	0.868	193.6504		
10000000	0.634	19.96927	193 y 199 mg/200 mg	
100000000	0.442	3.09598		

Pureza de IgA: Se utilizó fluido luminal (fluido recogido del interior del tracto intestinal a través de una serie de rodillos que expresan el contenido intestinal sin romper el revestimiento de la mucosa) y se demostró una pureza superior al 90 % de la muestra. Utilizando diluciones de 10 veces había entre 193 y 199 mg de IgA/200 mg de producto total.

En un intento adicional de cuantificar la pureza relativa de IgA, se usó SDS-PAGE para determinar si había algún contaminante dentro de la IgA. Se usaron contenidos lumbinales esterilizados por filtro, brevemente, una vez que los contenidos lumbinales terminaron la centrifugación final, los sedimentos se hidrataron usando agua desionizada y se filtraron a través de un filtro stericup de 0.2 um (Fisher Scientific Pittsburgh PA). Una vez que se filtró el material, se liofilizó hasta que se necesitó. El polvo liofilizado se rehidrató luego usando PBS acidificado esterilizado (pH 4) a una dilución de 1:10 p/v. A continuación, esta solución madre se diluyó adicionalmente a 1: 1000 y se separó en un gel SDS-PAGE y se visualizó utilizando tinción con azul de Commassie. El azul Commassie tiñe todas las proteínas y permite la visualización. Se identificaron 6 bandas únicas en el gel. Sin restringirse a la teoría, se considera que estas bandas representan la IgA con algunos contaminantes. Este gel se envió al Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin-Madison para la secuenciación de proteínas para tener otra forma más de determinar la pureza de la muestra. Cuatro de las seis bandas encontradas tenían IgM o IgA dentro de las tres principales proteínas encontradas. En algunos casos, dentro de las cuatro bandas, se encontraron IgM e IgA en ambas. Este resultado confirma que se ha aislado una gran abundancia de anticuerpos del lumen del cerdo. Las dos bandas superiores eran aminopeptidasas, que son enzimas no específicas. Tener el anticuerpo IgM también es muy bueno; La IgM es otro tipo de anticuerpo de primera respuesta. Es el primer anticuerpo secretado en respuesta a una infección.

Tabla 2: Proteínas identificadas por secuenciación de proteínas

	Proteínas identificadas	Cubrimiento porcentual
Banda 1	Glutamil aminopeptidasa	50
	Dipeptidil peptidasa IV porcina	56
Banda 2	Glutamil aminopeptidasa	49
	Meprina A	35
	Regulador de los canales de cloruro activado por calcio 4	32

(continuación)

	Proteínas identificadas	Cubrimiento porcentual
Banda 3	Dominios ch4 y secretados de IgM porcina	71
	Glutamil aminopeptidasa	46
	Aminopeptidasa N	36
Banda 4	Dominios ch4 y secretados de IgM porcina	73
	Región C de la cadena alfa de Ig (IgA)	66
	Aminopeptidasa N	47
Banda 5	Dominios ch4 y secretados de IgM porcina	63
	Región C de la cadena alfa de Ig (IgA)	69
	Aminopeptidasa N	51
Banda 6	Cadena lambda de inmunoglobulina (cadena ligera de Ig)	65
	Región C de la cadena alfa de Ig (IgA)	64
	Cadena pesada de inmunoglobulina	29

Se confirmó que la IgA estaba presente y en gran abundancia, ya que el 50 % de las bandas tenían una gran cantidad de IgA. Curiosamente, otro anticuerpo importante, IgM, se identificó en gran cantidad en el 50 % de las bandas que se encuentran en nuestro fluido luminal esterilizado con filtro. En el 83 % de las bandas se identificó IgA o IgM, similar a la afirmación de una pureza superior al 90 % utilizando ELISA de captura. La cobertura de secuencia es una medida de la cantidad de proteína que se secuenció, es decir, el 73 % de los aminoácidos de la proteína estaban presentes. Las mayores cantidades se dieron en IgA e IgM.

Otra forma de determinar la IgA en el aislado y también determinar si la IgA es activa es usar ELISA para unir IgA a dos sustratos diferentes, LPS y proteína de soja aislada. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos con 0.25 g de proteína de soja aislada o 2 mg de lipopolisacárido de *E. coli* 055: B5 disuelto en tampón de recubrimiento durante la noche para permitir la unión del péptido a la placa Nunc Maxisorp® F (Thermo-Fisher Scientific, Rochester NY). Después, las placas se bloquearon con tampón de bloqueo libre de proteínas (Pierce, Rockford IL) durante 1 hora. A continuación, las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween al 0.05 % (Fisher-Scientific, Pittsburgh PA). A continuación, las muestras se cargaron en diluciones de 10 veces de 1: 10-1: 1,000,000,000 usando el fluido luminal liofilizado durante 1 hora. A continuación, las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween (0.05 %). A continuación, se añadió anticuerpo secundario de cabra anti-IgA porcina (Bethyl Laboratories, Montgomery TX) en tampón de bloqueo (5 µl de anticuerpo 2 °: 12.5 ml de tampón de bloqueo) durante 30 minutos. Las placas se lavaron 6 veces con tampón de lavado. A continuación, se añadió el sustrato en tampón de sustrato (97 ml de dietanolamina, 100 mg de MgCl₂, 0.2 g de NaN₃, 800 ml de ddH₂O, pH 9.8), se incubó durante 15 minutos y luego se leyó a 450 nm. Se utilizó suero de cerdo como control.

Tabla 3: Resultados de ELISA de unión de IgA a LPS

10	0.185			Control IgA	0.138
100	1.732				
1000	0.335			Fondo	0.088
2000	0.182				
4000	0.138				
8000	0.124				
16000	0.102				
32000	0.08				

La Tabla 3 muestra los resultados de la unión de IgA a LPS. El control utilizado fue 1 µg de IgA aislado de suero de cerdo. La IgA aislada del lumen necesitaba ser diluida 4000 veces para unirse al mismo que el control, es decir, había 4 mg (4000 dilución x 1 µg [cantidad de unión encontrada en el control]) de IgA que se unía a LPS en el lumen de los intestinos de cerdo.

Tabla 4: Resultados de ELISA de unión de IgA a proteína de soja

10	0.244	Control IgA	0.075
100	0.823		
1000	0.313	Fondo	0.0623
2000	0.196		

(continuación)

10	0.244	Control IgA	0.075
4000	0.142		
8000	0.089		
16000	0.067		
32000	0.023		

La Tabla 4 muestra los resultados de la unión de IgA a proteína de soja aislada. El control utilizado fue 1 µg de IgA aislado de suero de cerdo. La IgA aislada del lumen necesitaba diluirse 8000 veces para unirse al mismo como el control, es decir, había 8 mg de IgA que se unía a proteína de soja en el lumen de los intestinos de cerdo.

Sin restringirse a la teoría, se cree que los resultados del LPS y la proteína de soja son razonables, ya que sería poco probable que hubiera más del 5 % de IgA disponible para unirse de manera no específica a la proteína de soja y al LPS.

Ejemplo 2: pasteurización de la preparación de IgA

Se utilizó la pasteurización para eliminar las bacterias de las preparaciones de IgA. Un pasteurizador de calidad comercial de la Planta Piloto de Lácteos de la Universidad de Wisconsin-Madison calentó el fluido luminal que contenía IgA a 121 °F durante 20 segundos, y el material se enfrió rápidamente después. Casi no hubo pérdida en la cantidad de IgA ni disminución en la capacidad de unión de la IgA después de la pasteurización.

Ejemplo 3. SIgA aislado del lumen intestinal de cerdo muestra una promoción del crecimiento en pollos comerciales

Estudio de pollos No. 1: todos los procedimientos que implican animales fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Wisconsin. Se compraron cien pollos de engorde Cornish Rock de Welp Hatchery (Bancroft IA) y se dividieron en grupos de al menos 50 pollos/grupo, con pollos divididos en partes iguales entre IgA muerta por calor (control, IgA calentada a 80 °C durante 30 minutos) e IgA. Los pollos fueron alimentados con 0.02 g de anticuerpo/kg de alimento (control o IgA). Se alimentó 0.02 g de anticuerpo/kg de alimento además de una dieta completa (Sunfresh® Purina, Gray Summit MO). Se controlaron semanalmente el peso de los pollos y la eficiencia alimentaria. En este caso, la IgA NO fue pasteurizada.

Tabla 5: Resultados del estudio uno de pollos

		Semana 1	Semana 2	Semana 3
IgA	Peso	133.32	341.16	678.3
	Eficiencia alimenticia	1.43	1.75	1.75
Control	Peso	129.68	334.16	674.9
	Eficiencia alimenticia	1.43	1.76	1.76
		p<0.2		

La Tabla 5 muestra que con IgA no pasteurizada alimentada a 0.02 g/kg de alimento para pollos no hubo mejora en la eficacia de la alimentación ni en la ganancia de peso. La mejora en el aumento de peso en la primera semana, tiene un valor p de 0.2 y no se considera un experimento exitoso.

Estudio de pollos # 2: Se compraron cien pollos de engorde Cornish Rock de Welp Hatchery (Bancroft IA) y se dividieron en grupos de al menos 50 pollos/grupo, con pollos divididos en partes iguales entre IgA muerta por calor (control, IgA calentado a 80 °C durante 30 minutos) e IgA. Los pollos fueron alimentados con 0.02 g de anticuerpo/kg de alimento (control o IgA). Se alimentó con 0.02 g de anticuerpo/kg de alimento además de una dieta completa (Sunfresh® Purina, Gray Summit MO). Se controlaron semanalmente el peso de los pollos y la eficiencia alimentaria. En este caso se pasteurizó la IgA.

Tabla 6: Resultados del estudio dos de pollos

		Semana 1	Semana 2	Semana 3
IgA	Peso	149.34	392.7	745.61
	Eficiencia alimenticia	1.51	1.71	1.75
Control	Peso	143.72	379.56	727.76
	Eficiencia alimenticia	1.62	1.79	1.79
		p<0.05	p<0.03	p<0.08

Sin restringirse a la teoría, se considera que la pasteurización fue la clave de este experimento. Comparando los pesos del estudio 1 con el estudio 2, ya sea que tenga control o prueba, los pesos son más altos. La IgA promovió el crecimiento alrededor del 4 % y mejoró la eficiencia de la alimentación alrededor del 4.5 %. Estos son números relevantes para la industria avícola y este experimento debe considerarse un éxito.

Ejemplo 4. Mejora de la eficiencia alimenticia en pollos comerciales utilizando solo la mucosa liofilizada

Estudio de pollos con mucosa No. ° 1: se compraron cien pollos de engorde Cornish Rock de Welp Hatchery (Bancroft IA) y se dividieron en grupos de al menos 50 pollos/grupo, con pollos divididos en partes iguales entre mucosa muerta por calor (control, mucosa calentada a 80 °C durante 30 minutos) y mucosas. Los pollos se alimentaron con 0.02 g de mucosa/kg de alimento (control o mucosa). Se alimentó con 0.02 g de mucosa/kg de alimento además de una dieta completa (Sunfresh® Purina, Gray Summit MO). Se controlaron semanalmente el peso de los pollos y la eficiencia alimentaria. En este caso, la mucosa NO fue pasteurizada.

Tabla 7: Estudio de pollos utilizando mucosa liofilizada

		Semana 1	Semana 2	Semana 3
Mucosa	Peso	132.18	380.44	723.95
	Eficiencia alimenticia	1.54	1.52	1.57
Control	Peso	133.65	375.7	715.5
	Eficiencia alimenticia	1.82	1.75	1.81
		p<0.009	P<0.01	p<0.006

El experimento fue un éxito con una mejora del 13-16 % en la eficiencia de la alimentación. Después de la semana uno, la conversión alimenticia en los controles no fue tan buena como habíamos visto en cuatro ensayos anteriores. Sin embargo, la semana 2 y la semana 3 estuvieron cerca de lo que se vio en las dos primeras pruebas con pollos. Independientemente, la conversión de alimento usando la mucosa es 10 puntos mejor que la mejor de la IgA de todos los otros experimentos.

La cantidad de mucosa en un cerdo que se midió (3.5 Lbs de peso húmedo) fue de 219.5 gramos después de la liofilización. La tasa de alimentación equivale a 20 gramos de mucosa liofilizada/tonelada de alimento.

Ejemplo 5. Aislado de SIgA de la mucosa intestinal de cerdo

La mucosa se homogeneiza en partes iguales (50 % de tampón de lisis: 50 % de mucosa) tampón de lisis [50 mmol/IHEPES, 150 mmol/l de NaCl, 10 % de glicerol, 1 % de Triton X-100, 1.5 mmol/l de MgCl₂, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de leupeptina, 1 mmol/l de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 200 µmol/l de Na₃VO₄, 200 µmol/l de NaF y 1 mmol/l de EGTA (pH final 7.5)] durante la noche a 4 °C. A continuación, se añade PEG 8000 al 3.5 % p/v a la mezcla de tampón de lisis/mucosa y se centrifuga a 14.000 x g, 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se mantiene y luego se filtra a través de lana de vidrio. A continuación, el sobrenadante se combina con PEG 8000 al 8.5 % p/v, se disuelve y luego se centrifuga a 14.000 x g, 4 °C durante 10 minutos. A continuación, se desecha el sobrenadante y el sedimento resultante se resuspende en una solución de agua dioionizada que contiene PEG al 12 % 8000 p/v y se centrifuga a 14.000 x g, 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se descarta y el sedimento resultante se congela a -80 °C durante 1 hora y se liofiliza.

El uso de los términos “un” y “uno, una” y “el, la” y referencias similares (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en este documento o claramente contradicho por el contexto. Los términos primero, segundo, etc., tal como se utilizan aquí, no pretenden indicar ningún orden en particular, sino simplemente por conveniencia para indicar una pluralidad de, por ejemplo, capas. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significa “que incluye, pero no se limita a”) a menos que se indique lo contrario. La recitación de rangos de valores está destinada simplemente a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del rango, a menos que se indique lo contrario aquí, y cada valor separado se incorpora en la especificación como si se mencionara individualmente en el presente documento. Los puntos finales de todos los rangos se incluyen dentro del rango y se pueden combinar de forma independiente. Todos los métodos descritos en este documento se pueden realizar en un orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, “tal como”), está destinado simplemente a ilustrar mejor la invención y no supone una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como indicativo de ningún elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención como se usa en este documento.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a una realización ejemplar, los expertos en la técnica entenderán que la invención no debe limitarse a la realización particular descrita como el mejor modo contemplado para llevar a cabo esta invención, sino que la invención incluirá todas las realizaciones que caigan dentro del alcance de las

reivindicaciones adjuntas. Cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas sus posibles variaciones está incluida en la invención a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente.

REIVINDICACIONES

1. Una composición alimenticia eficaz para aumentar la tasa de crecimiento, mejorar la eficiencia alimentaria, reducir la inflamación gastrointestinal, reducir el riesgo de infección gastrointestinal en un sujeto animal, o una combinación de los mismos, dicha composición comprende una composición alimenticia basal, y
5 superior a 0.1 mg/kg de IgA secretora intestinal, en el que la IgA secretora intestinal:

(i) se proporciona como una preparación de fluido luminal intestinal que contiene IgA secretora intestinal pasteurizada, en la que dicha preparación de fluido luminal intestinal se prepara a partir del fluido luminal intestinal de un cerdo o una vaca o una preparación de mucosa intestinal que contiene IgA secretora intestinal pasteurizada, en la que dicha preparación de mucosa se prepara a partir de la mucosa intestinal de un cerdo o una vaca, en la que más del 10 % del material proteínico en la preparación del fluido luminal intestinal o en la preparación de la mucosa intestinal es IgA,
10 o

(ii) se proporciona como mucosa intestinal seca sin hidrolizar de un cerdo o una vaca.

2. Composición alimentaria de la reivindicación 1, en la que la composición alimenticia es una composición alimenticia humana.
20

3. La composición alimenticia de la reivindicación 1, en la que la composición alimenticia basal es una composición alimenticia animal para un animal aviar, porcino, bovino, ovino o caprino, o un pez, reptil, molusco, animal invertebrado, caballo, perro o gato.

4. La composición alimenticia de la reivindicación 1, dicha composición alimenticia comprende de 1 mg/kg a 10 g/kg de mucosa intestinal seca sin hidrolizar.
25

5. La composición alimenticia de la reivindicación 1, en la que la mucosa intestinal no hidrolizada se liofiliza, se seca por pulverización o en tambor.
30

6. IgA secretora intestinal para usar en un método para reducir la inflamación gastrointestinal, reducir el riesgo de infección gastrointestinal, o una combinación de los mismos en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad de IgA secretora intestinal eficaz para reducir la inflamación gastrointestinal, reducir el riesgo de infección gastrointestinal, o una combinación de las mismas en el sujeto, en la que la IgA secretora intestinal:
35

(i) se proporciona como una preparación de fluido luminal intestinal que contiene IgA secretora intestinal pasteurizada, en la que dicha preparación de fluido luminal intestinal se prepara a partir del fluido luminal intestinal de un cerdo o una vaca o una preparación de mucosa intestinal que contiene IgA secretora intestinal pasteurizada, en la que dicha preparación de mucosa se prepara a partir de la mucosa intestinal de un cerdo o una vaca, en la que más del 10 % del material proteínico en la preparación del fluido luminal intestinal o en la preparación de la mucosa intestinal es IgA,
40 o

(ii) se proporciona como mucosa intestinal seca sin hidrolizar de un cerdo o una vaca.

7. La IgA secretora intestinal para el uso de la reivindicación 6, en la que el sujeto es un ser humano.
45

8. La IgA secretora intestinal para el uso de la reivindicación 6, en la que el sujeto es un animal seleccionado de un animal aviar, porcino, bovino, ovino, caprino, o un pez, reptil, molusco, animal invertebrado, caballo, perro o gato.

9. La IgA secretora intestinal para el uso de la reivindicación 6, en la que la mucosa intestinal no hidrolizada se liofiliza, se seca por pulverización o se seca en tambor.
50