

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 887 086**

51 Int. Cl.:

A61K 35/57 (2015.01)

A23K 50/75 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2016 PCT/EP2016/064114**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2017 WO17009004**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2016 E 16729926 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.06.2021 EP 3319618**

54 Título: **Procedimiento para producir yema de huevo con alto contenido de af-16**

30 Prioridad:

10.07.2015 SE 1551018

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2021

73 Titular/es:

**LANTMÄNNEN FUNCTIONAL FOODS AB
(100.0%)
Box 30192
104 25 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

LANGE, STEFAN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

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

ES 2 887 086 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 para producir yema de huevo con alto contenido de af-16

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una yema de huevo con un contenido muy alto de proteínas de factor antiselector (AF), en particular con un contenido muy alto de fragmento de proteína AF que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ.ID.NO. 1 (AF-16) y/o en SEQ.ID.NO. 2 (AF-8), comprendiendo dicho procedimiento durante al menos 12 semanas alimentar a un ave, tal como una gallina, con un pienso granulado inductor de AF-16 para aves de corral que comprende al menos un 0,14 % de triptófano libre, o al menos 1-2 g de triptófano/kg de pienso y, después de esto, recoger un huevo de dicha ave, separar la yema del huevo de la clara del huevo y, de forma alternativa, secar por pulverización, secar en lecho fluido, triturar, lixiviar, extraer, evaporar, filtrar por membrana y/o liofilizar dicha yema de huevo.

La presente invención se refiere además a dicha yema de huevo con un contenido muy alto de proteínas de factor antiselector (AF) y fragmentos de las mismas, producidas de acuerdo con el procedimiento descrito en el presente documento, a su uso para la preparación de productos alimenticios funcionales, y a productos farmacéuticos para su uso en el tratamiento y profilaxis de la diarrea y/o deshidratación. La invención también se refiere a productos alimenticios y farmacéuticos preparados de este modo.

Definiciones

Las proteínas son macromoléculas biológicas constituidas por residuos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Las proteínas, como polímeros lineales de aminoácidos, también se denominan polipéptidos. Típicamente, las proteínas tienen 50-800 residuos de aminoácidos y, por tanto, tienen pesos moleculares en el intervalo de aproximadamente 6000 a aproximadamente varios cientos de miles de Dalton o más. Las proteínas pequeñas se denominan péptidos, polipéptidos u oligopéptidos. Los términos "proteína", "polipéptido", "oligopéptido" y "péptido" pueden usarse de manera intercambiable en el presente contexto. Los péptidos pueden tener muy pocos residuos de aminoácidos, tal como entre 2-50 residuos de aminoácidos (aa).

Una "composición farmacéutica", en el presente contexto, se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente activa de una proteína de factor antiselector (AF), opcionalmente en combinación con un excipiente farmacéuticamente activo, tal como un vehículo. Dicha composición farmacéutica se formula para la vía de administración adecuada, que puede variar dependiendo del estado del paciente, así como de otros factores, como la edad o la elección preferente. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de factor antiselector (AF) puede servir como sistema de administración de fármacos. La composición farmacéutica tras la administración presenta la sustancia activa al cuerpo de un ser humano o un animal. Dicha composición farmacéutica puede estar en forma de, por ejemplo, comprimidos, pastillas, pastillas para chupar, cápsulas, pastillas fecales, geles, soluciones, etc., pero no se limita a los mismos.

El término "sal farmacéuticamente activa" se refiere a una sal de una proteína, péptido o polipéptido del factor antiselector (AF), o un homólogo y/o fragmento del mismo que puede ser cualquier sal derivada del mismo, en base a la denominada serie de Hofmeister. Otros ejemplos de sales farmacéuticamente activas comprenden trifluoroacetato, acetato, sulfato y cloruro, la invención no se limita a las mismas.

El término "antiselector" se refiere en el presente contexto a inhibir o disminuir la secreción y/o la transferencia de fluidos. Por tanto, el término "proteína de factor antiselector (AF)" se refiere a una clase de proteínas que pueden inhibir o disminuir o modular de otro modo la transferencia de fluidos así como la secreción en un cuerpo.

En el presente contexto, "actividad equivalente" se refiere al efecto biológico de la proteína, péptido o polipéptido del factor antiselector (AF), o un homólogo, derivado y/o fragmento del mismo, es decir, su capacidad para mejorar el tratamiento y/o uso en el tratamiento del glioblastoma. Los ejemplos estandarizados para someter a prueba y/o medir dicha capacidad son bien conocidos en el campo de la técnica.

En el presente contexto, los términos "proteína de factor antiselector", "proteína de factor antiselector (AF)", "proteína de AF", AF, o un homólogo, derivado o fragmento de la misma, se pueden usar de manera intercambiable con el término "factores antiselectores" o "proteínas de factor antiselector" como se define en el documento WO 97/08202, y se refieren a una proteína de factor antiselector (AF) o un péptido o un homólogo, derivado y/o fragmento del mismo que tiene actividad antiselectora y/o funcional equivalente y/o análoga, o a una modificación del mismo que no altere la función del polipéptido. Por tanto, se debe entender que un "factor antiselector", "proteína de factor antiselector", "péptido antiselector", "fragmento antiselector" o una "proteína de factor antiselector (AF)" en el presente contexto, también se puede referir a un derivado, homólogo o fragmento del mismo. Todos estos términos se pueden usar de manera intercambiable en el contexto de la presente invención. Además, en el presente contexto, el término "factor antiselector" se puede abreviar como "AF". La proteína de factor antiselector (AF) en el presente contexto también se refiere a una proteína con propiedades antiselectoras

como se define previamente en los documentos WO 97/08202 y WO 00/38535. También se han divulgado factores antiseoretos, por ejemplo, en el documento WO 05/030246. También se pretende que el término factor antisecretor corresponda a factores antiseoretos naturales en la yema de huevo enriquecida con factores antiseoretos como se divulga en los documentos SE 900028-2 y WO 00/38535, como se describe además a continuación.

A continuación, el término "NASP" se usará para la "proteína antisecretora natural".

El término "ASP" se usará para la "proteína antisecretora" comprendida en una proteína antisecretora natural.

Por "producto alimenticio funcional" se entiende, en el presente contexto, un producto alimenticio que tiene una función saludable, es decir, que tiene un efecto beneficioso sobre la salud del ser humano o de un animal.

PBS: solución salina tamponada con fosfato;

AF: factor antisecretor,

Proteína de AF de longitud completa (como se muestra en la SEQ ID NO: 1)

AF-6: un hexapéptido CHSKTR (como se muestra en la SEQ ID NO: 2);

AF-16: un péptido compuesto por los aminoácidos VCHSKTRSNPENNVGL (como se muestra en la SEQ ID NO: 3);

AF-8: un septapéptido VCHSKTR (como se muestra en la SEQ ID NO: 4);

Octapéptido IVCHSKTR (como se muestra en la SEQ ID NO: 5);

Pentapéptido HSKTR (como se muestra en la SEQ ID NO: 6).

SPC: Cereales especialmente procesados

RTT: Procedimiento para medir una respuesta de secreción estandarizada en el intestino delgado de rata, como se publicó en el documento SE 9000028-2 (número de publicación 466331) para medir el contenido de AF (ASP).

Antecedentes

El documento WO 98/21978 divulga el uso de productos que tienen actividad enzimática para la producción de un alimento que induce la formación de proteínas de factor antisecretor (AF). El documento WO 00/038535 divulga además productos alimenticios enriquecidos con proteínas de factor antisecretor (AF) natural como tales.

Por la patente sueca SE 9000028-2 (publicación n.º 466.331) se sabe que la formación de un factor antisecretor o una proteína antisecretora (ASP: también denominada FIL) se puede estimular añadiendo, al pienso de los animales, determinados glúcidos, aminoácidos y amidas. Los tipos y cantidades de estas sustancias que se van a usar para la formación de una cantidad interesante de ASP se determinan mediante un procedimiento divulgado en la patente. En resumen, este procedimiento implica la medición de una respuesta de secreción estandarizada en el intestino delgado de la rata. Por la patente es evidente que las ASP inducidas formadas dirigen la secreción de fluido corporal al intestino. En dicha patente, el contenido o la cantidad de proteínas antisecretoras naturales se define por su efecto sobre la secreción de fluido en el intestino delgado de ratas de laboratorio que han sido expuestas a la toxina del cólera. Una unidad de ASP (unidad de FIL) corresponde a una reducción de un 50 % del flujo de fluido en el intestino en comparación con un control sin ASP. Las proteínas antisecretoras son activas en cantidades extremadamente pequeñas y, por lo tanto, es más fácil determinarlas por su efecto que por su masa.

Por la solicitud PCT PCT/SE 96/01049 son conocidas las estructuras de determinadas proteínas antisecretoras y se caracterizan sus partes activas. Se ha demostrado que una ASP sintética preparada por genomanipulación recombinante o por tecnología de fase sólida y que tiene estructuras definidas tiene una influencia de control general sobre el flujo de fluidos corporales sobre las membranas de las células vivas.

Por la solicitud PCT PCT/SE 97/01918 (documento WO 98/21978) es conocido que la formación de ASP se puede inducir en el organismo mediante el consumo de un determinado tipo de alimento con actividad enzimática. El efecto de la inducción y, debido a eso, la formación de ASP varía de acuerdo con el individuo y sus síntomas, y tiene lugar con una fuerza y un período de inducción hasta ahora impredecibles. Sin embargo, se pueden medir posteriormente y se pueden hacer las correcciones necesarias con la guía de dichas mediciones.

Durante el trabajo continuo de los autores de la invención en la formulación de piensos para estimular la formación de proteínas antiselectoras de acuerdo con la patente sueca SE 900028-2, se supo que la capacidad de síntesis y concentración de las proteínas antiselectoras naturales formadas se distribuyen de la forma más desigual en el cuerpo. Se encontraron niveles muy altos de NASP en determinados órganos, partes del cuerpo o fluidos corporales y, en particular, en la yema de los huevos de las aves. El documento WO 008535 divulga este hecho y, en consecuencia, el uso de yema de huevo que se ha enriquecido con respecto a NASP. El documento WO 008535 en general divulga la preparación de productos alimenticios y productos farmacéuticos enriquecidos con NASP para el tratamiento y profilaxis de afecciones fisiológicas anómalas causadas por una descarga extrema de fluidos corporales.

Breve descripción de la invención

A diferencia de la yema de huevo descrita previamente, por ejemplo, en el documento WO 008535, la presente invención describe por primera vez una yema de huevo con un contenido mucho mayor de proteínas de factor antiselector (AF) y, en particular, con un contenido constante y alto del fragmento de proteína de factor (AF) con una secuencia de aminoácidos como se divulga en la SEQ.ID.NO.1 (AF-16) y/o en la SEQ.ID.NO.2 (AF-8). La yema de huevo divulgada en el presente documento comprende un fragmento de proteína de factor antiselector (AF) de al menos 0,05 ng/ml con una secuencia de aminoácidos como se divulga en la SEQ.ID.NO.1 y/o SEQ.ID.NO.2 (AF-8). La yema de huevo puede estar en forma líquida, o de forma alternativa, secada por pulverización o secada en lecho fluido, y se caracteriza además por inducir al menos 0,5 unidades de AF en un paciente que lo necesita entre 60 y 120 min después del aporte de al menos 4 gramos de dicha yema de huevo liofilizada, que es al menos el doble de rápida que la que se podría inducir por la yema de huevo descrita en el documento WO 008535.

La yema de huevo de acuerdo con la presente invención puede provenir típicamente de huevos de aves de corral, tales como aves gallináceas, tales como una gallina.

La yema de huevo de acuerdo con la presente invención se produce mediante un procedimiento para producir una yema de huevo con un contenido muy alto de proteínas de factor antiselector (AF), en particular con un contenido muy alto de fragmento de proteína de AF como se muestra en la SEQ.ID.NO. 1 (AF-16), dicho procedimiento comprende durante al menos 12 semanas alimentar a un ave, tal como una gallina, con un pienso granulado inductor de AF-16 para aves de corral que comprende al menos un 0,4 % de triptófano libre y, después de esto, recoger un huevo de dicha ave, separar la yema del huevo de la clara del huevo y, de forma alternativa, secar por pulverización, secar en lecho fluido, triturar, lixiviar, extraer, evaporar, filtrar por membrana y/o liofilizar dicha yema de huevo.

En un modo de realización, la yema de huevo de acuerdo con la presente invención se produce mediante un procedimiento para producir una yema de huevo con un contenido muy alto de proteínas de factor antiselector (AF), en particular con un contenido muy alto de fragmento de proteína de AF como se muestra en la SEQ.ID.NO. 2 (AF-8), dicho procedimiento comprende durante al menos 12 semanas alimentar a un ave, tal como una gallina, con un pienso granulado inductor de AF-8 para aves de corral que comprende al menos un 0,4 % de triptófano libre y, después de esto, recoger un huevo de dicha ave, separar la yema del huevo de la clara del huevo y, de forma alternativa, secar por pulverización, secar en lecho fluido, triturar, lixiviar, extraer, evaporar, filtrar por membrana y/o liofilizar dicha yema de huevo.

La yema de huevo de acuerdo con la presente invención se produce mediante un procedimiento para producir una yema de huevo con un contenido muy alto de proteínas de factor antiselector (AF), en particular con un contenido muy alto de fragmento de proteína de AF como se muestra en la SEQ.ID.NO. 1 (AF-16) y/o en la SEQ.ID.NO.2 (AF-8), dicho procedimiento comprende durante al menos 12 semanas alimentar a un ave, tal como una gallina, con un pienso granulado inductor de AF-16 y/o AF-8 para aves de corral que comprende al menos un 0,4 % de triptófano libre y, después de esto, recoger un huevo de dicha ave, separar la yema del huevo de la clara del huevo y, de forma alternativa, secar por pulverización, secar en lecho fluido, triturar, lixiviar, extraer, evaporar, filtrar por membrana y/o liofilizar dicha yema de huevo.

En un modo de realización de la presente invención, la yema de huevo producida por el procedimiento de acuerdo con la presente invención se usa en medicina. En un modo de realización actualmente preferente, dicha yema de huevo se usa en el tratamiento y profilaxis de la diarrea y/o deshidratación.

Una yema de huevo de acuerdo con la presente invención se puede usar para la preparación de productos alimenticios funcionales enriquecidos con proteínas de factor antiselector (AF), tales como piensos, alimentos y/o complementos alimenticios. En consecuencia, se divulga del mismo modo dicho alimento, pienso y/o complemento alimenticio que comprende yema de huevo de acuerdo con la presente invención. Un alimento de este tipo que comprende yema de huevo de acuerdo con la presente invención se puede seleccionar del grupo que consiste en tortita, tortilla, helado, huevo duro o pasado por agua y refrescos, yogur, barras de alimentos, etc.

Otro modo de realización de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende yema de huevo de acuerdo con la presente invención y un vehículo farmacéutico adecuado. Típicamente, el vehículo farmacéutico adecuado se selecciona del grupo que consiste en agua, PBS, etc.

5 Un modo de realización particular se refiere a una composición farmacéutica que comprende yema de huevo de acuerdo con la presente invención, que comprende al menos 0,05 ng/ml de un fragmento de proteína de factor antiselector (AF) con una secuencia de aminoácidos como se divulga en la SEQ.ID.NO.1, que se caracteriza además por inducir al menos 0,5 unidades de AF en un paciente que lo necesita.

10 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una yema de huevo con un contenido muy alto de proteínas de factor antiselector (AF), en particular con un contenido muy alto de fragmento de proteína AF que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ.ID.NO.1 (AF-16) y/o en la SEQ.ID.NO. 2 (AF-8), comprendiendo dicho procedimiento durante al menos 12 semanas alimentar a un ave, tal como una gallina, con un pienso granulado inductor de AF-16 y/o AF-8 para aves de corral que comprende al menos un 0,14 % de triptófano libre y, después de esto, recoger un huevo de dicha ave, separar la yema del huevo de la clara del huevo y, de forma alternativa, secar por pulverización, triturar, lixiviar, extraer, evaporar, filtrar por membrana, secar en lecho fluido y/o liofilizar dicha yema de huevo. Dicha ave de corral es típicamente un ave gallinácea tal como una gallina.

20 Un procedimiento para producir una yema de huevo de acuerdo con la presente invención puede comprender de forma alternativa alimentar a un ave con un pienso inductor de AF-16 y/o AF-8 durante al menos 13 o 14 semanas, tal como durante al menos 15, 16, 17 o 18 semanas.

25 La yema de huevo producida de acuerdo con el procedimiento descrito en el presente documento está en un modo de realización actualmente preferente caracterizada además por que comprende al menos un fragmento de proteína de factor antiselector (AF) de 0,05 ng/ml con una secuencia de aminoácidos como se divulga en la SEQ.ID.NO.1. En otro modo de realización, la yema de huevo producida de acuerdo con el procedimiento divulgado en el presente documento se caracteriza además por que comprende al menos un fragmento de proteína de factor antiselector (AF) de 0,05 ng/ml con una secuencia de aminoácidos como se divulga en la SEQ.ID.NO.2.

30 **Descripción detallada de la invención**

Yema de huevo

35 La yema de huevo producida de acuerdo con el procedimiento descrito en el presente documento está en un modo de realización actualmente preferente caracterizada además por que comprende al menos un fragmento de proteína de factor antiselector (AF) de 0,05 ng/ml con una secuencia de aminoácidos como se divulga en la SEQ.ID.NO.1 y/o en la SEQ.ID.NO.2.

40 **Alimentos y complementos alimenticios**

La presente invención se refiere en general al uso de yema de huevo para la preparación de proteína de factor antiselector (AF), tal como en particular productos alimenticios funcionales enriquecidos con AF-16.

45 De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a dicho uso para la preparación de provisiones con propósitos nutritivos particulares que contienen proteínas de factor antiselector (AF), tales como en particular AF-16 y/o AF-8.

50 Se pretende que la expresión "producto alimenticio", en el presente contexto, comprenda alimentos para uso humano así como piensos para uso animal. El alimento puede ser un artículo en forma de productos, cuya preparación incluye yema de huevo, tal como tortita, tortilla, helado y diversos tipos de pan. La yema de huevo también se puede consumir en forma de ponche de huevo o huevos duros o pasados por agua. El alimento también puede estar en forma de pan, galletas, pasta, granos y copos, papilla o gachas, o mezclado en diversas composiciones de bebidas con o sin electrolitos, o una preparación de alimento que contenga carne y productos cárnicos, grasas y productos grasos o leche y productos lácteos que se haya enriquecido con proteína de factor antiselector (AF), tal como en particular AF-16 y/o AF-8. La proteína de factor antiselector (AF), tal como en particular AF-16 y/o AF-8, se puede mezclar en el producto alimenticio en una forma más o menos purificada. La preparación de alimento de puede hacer con gran libertad usando los conocimientos conocidos por el experto, para cumplir los requisitos en cuanto a agradabilidad y variación de las comidas.

60 La yema de huevo proviene típicamente de huevos de aves que se pueden usar para el consumo humano y animal, y que comprenden un contenido muy alto de proteína de factor antiselector (AF), tal como en particular AF-16 y/o AF-8. Los huevos se producen preferentemente por gallinas ponedoras, pero también se pueden obtener, por ejemplo, de patos, pavos, codornices y avestruces.

65

Un alimento o pienso con un contenido muy alto de proteína de factor antiselector (AF), tal como en particular AF-16 y/o AF-8, comprende dicha proteína o fragmento de proteína en una concentración tal que, al consumir el producto alimenticio, proporciona el efecto valioso deseado sobre la salud.

5 En un modo de realización, el consumo de al menos 4 g de yema de huevo producida de acuerdo con el procedimiento actualmente divulgado induce en el paciente que lo necesita al menos 0,5 unidades de AF en la sangre de dicho paciente, es decir, el nivel de unidades de FIL/ml de sangre supera las 0,5 unidades de FIL/ml de sangre. Las personas sanas típicamente tienen niveles de unidades de AF en sangre de entre 0 y 0,5 unidades de FIL/ml de sangre.

10 Cuando se estimula la proteína de factor antiselector (AF), tal como en particular la producción de AF-16 y/o AF-8, se ha demostrado, de manera sorprendente e inesperada, que se pueden inducir niveles extremadamente altos de proteína de factor antiselector (AF), incluyendo fragmentos de la misma, tal como en particular AF-16 y/o AF-8, en huevos de aves.

15 **Composiciones farmacéuticas**

La proteína de factor antiselector (AF) y los fragmentos de la misma, tal como en particular AF-16 y/o AF-8 producidos en la yema de huevo, se pueden concentrar, por ejemplo, en una columna de adsorción específica, eluir, recuperar y/o concentrar y, después de esto, se pueden administrar a animales o seres humanos, mezclar con un pienso o alimento, respectivamente, o como productos más o menos aislados, preparar y formular como productos farmacéuticos u otros productos sanitarios. Dichos productos farmacéuticos se preparan de una manera conocida por el experto, usando excipientes aceptados que incluyen vehículos y diluyentes, y se formulan como formas sólidas o líquidas dependiendo de la vía de administración pretendida.

25 Las composiciones farmacéuticas contempladas en el presente documento se formulan preferentemente para ingestión oral y se administran por vía oral.

30 De acuerdo con otro modo de realización del uso de acuerdo con la invención para la preparación de proteína de factor antiselector (AF) y/o fragmentos de la misma, tales como en particular productos alimenticios enriquecidos con AF-16 y/o AF-8, se hace uso de la yema de huevo como tal o del huevo completo, posiblemente en forma procesada, para mezclar con el alimento o pienso. Cualquier procesamiento puede incluir trituración, lixiviación, extracción, evaporación, ultrafiltración, secado y otras operaciones estándar para obtener una proteína de factor antiselector (AF), tal como en particular un producto de yema de huevo enriquecido con AF-16 y/o AF-8, apto para propósitos prácticos, para mezclar con el alimento o pienso.

35 Típicamente, la proteína de factor antiselector (AF), tal como en particular AF-16 y/o AF-8, se administra en dosis de 4 g-8 g de yema de huevo en polvo secada por pulverización una o dos veces al día.

40 Para determinadas afecciones, se pueden requerir dosis incluso mayores de proteína de factor antiselector (AF), tal como en particular AF-16 y/o AF-8. En dichos casos, la proteína de factor antiselector (AF), tal como en particular AF-16 y/o AF-8 aislado de la yema de huevo, se puede añadir a cualquier producto alimenticio o proteína aislada de factor antiselector (AF), tal como en particular la AF-16 y/o AF-8, se puede preparar para su aporte en forma de comprimidos o suspensiones.

45 Un modo de realización preferente en particular comprende la preparación de yema de huevo en polvo mediante secado por pulverización. Dicho producto es adecuado en particular en el procesamiento industrial de diversos productos alimenticios donde se desea lograr el efecto beneficioso de la proteína de factor antiselector (AF), tal como en particular AF-16 y/o AF-8, tras el aporte del producto alimenticio en cuestión. La yema de huevo en polvo se deja mezclar bien por sí misma en productos tan diferentes como las salchichas y los helados, por lo que será posible lograr una gran variación en cuanto al carácter de la comida.

50 La yema de huevo en polvo también es más adecuada como intermedio en caso de que se desee preparar una proteína de factor antiselector (AF) enriquecida o concentrada, tal como en particular el producto de AF-16 y/o AF-8 a través de lixiviación o extracción para preparación ulterior de, por ejemplo, productos farmacéuticos.

55 Debido a su peso molecular relativamente bajo, la proteína de factor antiselector (AF), y en particular los fragmentos de la misma, tal como AF-16 y/o AF-8, es comparativamente termoestable y, por lo tanto, puede estar contenida en el alimento ya antes de preparar el mismo para el consumo.

60 En un modo de realización de la presente invención, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. La elección del excipiente farmacéuticamente aceptable y su concentración óptima para su uso de acuerdo con la presente invención se puede determinar fácilmente por experto en la técnica mediante experimentación. Los excipientes farmacéuticamente aceptables para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen disolventes, agentes tamponantes, conservantes, agentes quelantes, antioxidantes y estabilizadores, agentes emulsionantes, agentes de suspensión y/o diluyentes.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional, por ejemplo, de acuerdo con "Remington: The science and practice of pharmacy", 21.^a edición, ISBN 0-7817-4673-6 o "Encyclopedia of pharmaceutical technology", 2.^a edición, ed. Swarbrick J., ISBN: 0-8247-2152-7. Un excipiente farmacéuticamente aceptable es una sustancia que es sustancialmente inocua para el individuo al que se va a administrar la composición. Dicho excipiente normalmente cumple los requisitos establecidos por las autoridades sanitarias nacionales. Las farmacopeas oficiales tal como, por ejemplo, la Farmacopea Británica, la Farmacopea de los Estados Unidos de América y la Farmacopea Europea establecen estándares para excipientes farmacéuticamente aceptables.

Lo siguiente es una revisión de composiciones pertinentes para su uso opcional en una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. La revisión se basa en la vía de administración particular. Sin embargo, se aprecia que, en aquellos casos en los que se puede emplear un excipiente farmacéuticamente aceptable en diferentes formas farmacéuticas o composiciones, la aplicación de un excipiente farmacéuticamente aceptable particular no se limita a una forma farmacéutica particular o de una función particular del excipiente. Se debe resaltar que la invención no se limita al uso de las composiciones mencionadas en lo siguiente.

Composiciones parenterales:

Para aplicación sistémica, las composiciones de acuerdo con la invención pueden contener vehículos y excipientes convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo microesferas y liposomas.

Las composiciones para su uso de acuerdo con la invención pueden incluir todo tipo de composiciones sólidas, semisólidas y fluidas.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir disolventes, agentes tamponantes, conservantes, agentes quelantes, antioxidantes y estabilizadores, agentes emulsionantes, agentes de suspensión y/o diluyentes.

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede administrar en un contexto localmente o por medio de infusión periférica intravenosa o por medio de inyección intramuscular o subcutánea al paciente o por vía bucal, pulmonar, nasal, cutánea u oral. Además, también es posible administrar la composición farmacéutica a través de una derivación insertada quirúrgicamente en un ventrículo cerebral del paciente.

En un modo de realización, la composición farmacéutica usada de acuerdo con la presente invención se formula para administración intraocular, local, intranasal, oral, subcutánea y/o sistémica. La vía de administración elegida variará dependiendo de la afección del paciente que se va a tratar y la edad y sexo del paciente, etc.

En un modo de realización preferente, la composición de la invención se administra mediante aplicación como una suspensión o, incluso más preferentemente, un polvo para inhalación con un pulverizador, aerosol, inhalador o nebulizador por vía nasal y/o en el aparato respiratorio.

La administración de un polvo que comprende factores antiseoretos tiene ventajas adicionales en términos de estabilidad y dosificación. Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención también se puede aplicar por vía tópica, administrar por vía ocular, nasal, oral, subcutánea y/o sistémica a través de vasos sanguíneos. En un modo de realización preferente, la composición farmacéutica se formula para administración intravenosa, intramuscular, local, oral o nasal. Típicamente, cuando se usa para aplicación tópica en el ojo, la concentración aplicada en la composición de la invención es de 1 µg a 1 mg por aplicación, preferentemente 50-500 µg, como una dosis única al día o bien repetida varias veces al día (dosis múltiples), pero no se limita a la misma.

Administrada sistémicamente a la sangre, la dosis está dentro del intervalo de 0,1 µg a 10 mg por aplicación y kg de peso corporal, tal como 0,1 µg a 1 mg por aplicación y kg de peso corporal, preferentemente 1-500, tal como 1-1000 µg/kg de peso corporal. Cuando se usa yema de huevo enriquecida en factores antiseoretos de acuerdo con la presente invención, esta formulación se administra preferentemente por vía oral.

En un modo de realización de la invención, dicha composición farmacéutica comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicho excipiente puede ser cualquier excipiente preferente elegido para que sea apropiado para el propósito específico.

Factor antisecretor (AF)

El factor antisecretor es una clase de proteínas que se produce naturalmente en el cuerpo. El factor antisecretor (AF) es una proteína de 41 kDa que se describió originalmente para proporcionar protección contra las enfermedades diarreicas y la inflamación intestinal (para una revisión, véase Lange y Lonroth, 2001). Se ha secuenciado la proteína de factor antisecretor (AF) y se ha clonado su ADNc. La proteína de factor antisecretor AF humano es una proteína de 41 kDa, que comprende 382-288 aminoácidos cuando se aísla de la hipófisis. El sitio activo con respecto al efecto beneficioso sobre el tratamiento del glioblastoma de acuerdo con la presente invención se puede localizar en la proteína en una región cercana al N-terminal de la proteína, en particular localizado en los aminoácidos 1-163 de la SEQ ID NO. 4, más específicamente en las posiciones de aminoácidos

35-50 en la secuencia de la proteína de factor antiselector (AF). El efecto biológico del AF lo ejerce cualquier péptido o polipéptido que comprenda al menos 6 aminoácidos, SEQ ID NO: 3 (AF-6), de dicha secuencia consenso, o una modificación de la misma que no altere la función del polipéptido y/o péptido.

5 Las investigaciones inmunoquímicas e inmunohistoquímicas han revelado que la proteína de factor antiselector (AF) está presente y también se puede sintetizar por la mayoría de los tejidos y órganos del cuerpo. Los péptidos sintéticos, que comprenden la secuencia antidiarreica, se han caracterizados anteriormente (documentos WO 97/08202; WO 05/030246).

10 Los autores de la presente invención han demostrado que el factor antiselector es hasta cierto punto homólogo con la proteína S5a y Rpn10, que constituye una subunidad de un constituyente predominante en todas las células, el proteasoma 26 S, más específicamente en la caperuza 19 S/PA700. En la presente invención, las proteínas de factor antiselector (AF) se definen como una clase de proteínas homólogas que tienen las mismas propiedades funcionales. El factor antiselector también es altamente similar a la angiocidina, otra isoforma proteica conocida por que se une a la trombospondina-1 y se asocia con la progresión del cáncer.

15 Los homólogos, derivados y fragmentos de proteínas y/o péptidos de factor antiselector (AF) tienen todos una actividad biológica análoga. Los homólogos, derivados y fragmentos, en el presente contexto, comprenden al menos 6 aminoácidos (como se muestra en la SEQ ID NO: 2) correspondientes a los de una proteína de factor antiselector (AF) natural, que se pueden modificar además cambiando uno o más aminoácidos para optimizar la actividad biológica del factor antiselector, sin alterar la función esencial del polipéptido y/o péptido.

20 Por derivado se entiende en el presente contexto una proteína que tiene una actividad equivalente y/o una actividad funcional equivalente a un factor antiselector como se define en el presente documento, que se deriva de otra sustancia directamente o bien por modificación o sustitución parcial, en la que uno o más aminoácidos se han sustituido por otro aminoácido, pudiendo ser dicho aminoácido un aminoácido modificado o no natural. Por ejemplo, los derivados de factor antiselector de acuerdo con la invención pueden comprender un grupo protector N-terminal y/o C-terminal. Un ejemplo de un grupo protector N-terminal incluye acetilo. Un ejemplo de un grupo protector C-terminal incluye amida.

25 Los procedimientos para determinar la identidad y la similitud están codificados en programas disponibles públicamente. Los procedimientos de programas informáticos preferentes para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas GCG (Devereux, J *et al.* (1994)) BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, SF *et al.* (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, SF *et al.*, Altschul, SF *et al.* (1990)). Cada programa de análisis de secuencias tiene una matriz de puntuación predeterminada y penalizaciones por huecos predeterminadas. En general, se esperaría que un biólogo molecular usara la configuración predeterminada establecida por el programa informático usado.

30 Las proteínas de factor antiselector (AF), o un péptido o un homólogo, derivado y/o fragmento de las mismas que tiene una actividad equivalente como se define en el presente documento, pueden comprender 6 aminoácidos o más, tales como 6-16 aminoácidos, tales como 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos o más. En otros modos de realización preferentes, el factor antiselector consiste en 42, 43, 45, 46, 51, 80, 128, 129 o 163 aminoácidos. En modos de realización preferentes, la proteína de factor antiselector (AF), un homólogo, derivado, péptido y/o fragmento de la misma, de acuerdo con la presente invención, consiste en 6, 7, 8 o 16 aminoácidos.

35 En particular, una proteína de factor antiselector (AF) es una proteína con una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO:2, o un homólogo, derivado y/o fragmento de la misma que comprende los aminoácidos 37-42 de la SEQ ID NO:2.

40 AF-16 es un fragmento de una proteína de factor antiselector (AF) con una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO:1, que comprende, por tanto, los aminoácidos 37-42 de la SEQ ID NO:2.

55 **Indicaciones médicas**

Se ha demostrado que una proteína de factor antiselector (AF), tal como en particular AF-16, tiene un efecto de control general sobre el flujo de fluidos corporales sobre las membranas de las células vivas, por lo que no solo se pueden aliviar, curar o prevenir las afecciones de diarrea, sino también el malestar debido a un desequilibrio fisiológico o afecciones similares a una enfermedad causadas por una descarga extrema de fluidos corporales.

60 Los productos alimenticios y los productos farmacéuticos de acuerdo con la invención se pueden usar para el tratamiento y/o profilaxis de la diarrea y/o deshidratación.

Se ha divulgado previamente que las proteínas y péptidos de factor antiselector (AF) normalizan el transporte de fluidos patológico y/o reacciones inflamatorias, tal como en el intestino y el plexo coroideo en el sistema nervioso central después de la exposición a la toxina del cólera (documento WO 97/08202).

5 En el documento WO 97/08202 se ha sugerido que los alimentos y piensos con la capacidad de inducir la síntesis endógena de AF o bien la captación de AF añadido son útiles para el tratamiento del edema, diarrea, deshidratación e inflamación.

10 También se ha demostrado que las proteínas de factor antiselector (AF) y fragmentos de las mismas mejoran la reparación del tejido nervioso y la proliferación, apoptosis, diferenciación y/o migración de células madre y progenitoras y células derivadas de las mismas en el tratamiento de afecciones asociadas con pérdida y/o ganancia de células (documento WO 05/030246) y para que sean eficaces del mismo modo en el tratamiento y/o prevención de la hipertensión intraocular (documento WO 07/126364), como para el tratamiento y/o prevención del síndrome compartimental (documento WO 07/126363).

15 Además, los autores de la presente invención han demostrado recientemente que el AF puede monitorizar y/o afectar de forma beneficiosa la estructura, distribución y múltiples funciones de balsas lipídicas, receptores y/o caveolas en membranas y, por tanto, se podría emplear para el tratamiento y/o prevención de la desorganización estructural y disfunción de balsas lipídicas y/o caveolas en las membranas celulares (documento WO 07/126365).

20 Los autores de la presente invención han podido demostrar además que la misma proteína de factor antiselector (AF), péptidos y fragmentos de la misma pueden intervenir en la activación biológica de proteínas transmembranarias, por ejemplo, NKCC1 a través de FAK y CAP, y que, por tanto, pueden regular directamente la actividad patológica del canal iónico en células patológicas y/o perturbadas, normalizando eficazmente la presión intracelular y la función de la proteína transmembranaria en dicha célula y permitiendo, por tanto, una captación mejorada de los fármacos usados, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer (documento WO 2010/093324).

25 El documento WO 2014/096384 divulga que las proteínas de factor antiselector (AF), péptidos, homólogos y/o fragmentos de las mismas se pueden usar además en tratamientos sintomáticos, curativos y paliativos del glioblastoma. En particular, se pueden usar como adyuvantes y/o para optimizar la administración de fármacos y la transferencia de genes, así como la quimioterapia, inmunoterapia y radioterapia en el tratamiento del glioblastoma.

35 Procedimiento

Un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para proporcionar yema de huevo de huevos de aves con un contenido muy alto de proteínas de factor antiselector (AF), en particular con un contenido muy alto de fragmento de proteína AF que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ.ID.NO.1 (AF-16) y/o en la SEQ.ID.NO. 2 (AF-8), comprendiendo dicho procedimiento durante al menos 12 semanas alimentar a un ave, tal como una gallina, con un pienso, preferentemente granulado, inductor de AF-16 y/o AF-8 para aves de corral que comprende al menos un 0,14 % de triptófano libre, tal como al menos un 0,4 % de triptófano libre, y, después de esto, recoger un huevo de dicha ave, separar la yema del huevo de la clara del huevo y, de forma alternativa, secar por pulverización, secar en lecho fluido, triturar, lixiviar, extraer, evaporar, filtrar por membrana y/o liofilizar dicha yema de huevo.

45 En particular, el procedimiento de la invención es aplicable cuando se alimentan aves gallináceas con un pienso granulado inductor de AF-16 y/o AF-8 para aves de corral como se describe por primera vez en el presente documento durante al menos 12 semanas, preferentemente entre 12-20 semanas, tal como entre 12-18 semanas, tal como al menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 semanas. Proporcionando a las gallinas, por medio del pienso, durante al menos 12 semanas, distintas combinaciones de aminoácidos, glúcidos y amidas, se pueden inducir niveles muy altos de proteínas de factor antiselector (AF) y, en particular, AF-16 y/o AF-8, preferentemente en la yema de huevo.

50 En otro modo de realización, el procedimiento de la invención es aplicable cuando se alimentan aves gallináceas con un pienso granulado inductor de AF-16 y/o AF-8 para aves de corral como se describe por primera vez en el presente documento durante al menos 4 semanas, tal como por ejemplo al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 semanas, tal como preferentemente entre 4-12 semanas. Proporcionando a las gallinas, por medio del pienso, durante al menos 4 semanas, distintas combinaciones de aminoácidos, glúcidos y amidas, se pueden inducir niveles muy altos de proteínas de factor antiselector (AF) y, en particular, AF-16 y/o AF-8, preferentemente en la yema de huevo.

55 Los niveles muy altos de proteínas de factor antiselector (AF) logrados en el presente documento, y en particular AF-16 y/o AF-8, no tienen precedentes y son sorprendentes.

60 La invención se ilustra a continuación por medio los siguientes ejemplos no limitantes.

Pienso granulado inductor de AF-16 y/o AF-8 para aves de corral

En el procedimiento descrito en el presente documento para proporcionar yema de huevo de huevos de aves con un contenido muy alto de proteínas de factor antiselector (AF), en particular con un contenido muy alto de fragmento de proteína AF que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ.ID.NO.1 (AF-16) y/o SEQ.ID.NO. 2 (AF-8), dicho procedimiento comprende durante al menos 4, tal como al menos 12 semanas, alimentar a un ave, tal como una gallina, con un pienso granulado inductor de AF-16 y/o AF-8 para aves de corral que comprende al menos un 0,14 % de triptófano libre o entre 1-2 gramos de triptófano/kg de pienso.

En un modo de realización de la presente invención, dicho pienso inductor de AF-16 y/o AF-8 para aves de corral comprende al menos un 0,14-1 % de triptófano libre, tal como al menos un 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1 % de triptófano libre.

En un modo de realización de la presente invención, dicho pienso inductor de AF-16 y/o AF-8 para aves de corral comprende al menos 0,5 gramos de triptófano/kg de pienso, tal como al menos un 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 o 3 % de triptófano/kg de pienso.

El pienso está preferentemente en forma granulada. El término "pienso granulado" se usa en el presente contexto para describir piensos concentrados elaborados en gránulos. Los gránulos tienen las ventajas de facilidad de manipulación, ausencia de polvo y residuos, y ofrecen una composición estándar de los gránulos.

En el presente contexto, el término "pienso" se usa para describir materiales de valor nutricional con los que se alimenta a los animales. Cada especie tiene una dieta normal compuesta por piensos que son adecuados a su tipo de tracto alimentario y que son económicamente razonables, además de nutritivos y agradables. Los animales agrícolas en pastos tienen una dieta que es muy variable y está sujeta a deficiencias nutricionales naturales.

Un procedimiento de suministro de triptófano libre y otros complementos y aditivos es preparar una mezcla de estas sustancias que se añade a la ración básica. Estas mezclas se denominan concentrados o premezclas y, debido a que suelen tener un alto contenido de cereales en grano, las mezclas que contienen solo grano también se denominan concentrados. En el presente contexto, dicha premezcla comprende típicamente al menos un 2,5 % de triptófano libre, un 70-75 % de glúcidos, como dextrosa y un 25-30 % de sustrato basado en cereales, por ejemplo, trigo.

El pienso puede comprender además pienso forrajero, tal como heno, ensilaje, forraje verde. Es decir, cualquier pienso con un alto contenido en celulosa en relación con otros nutrientes.

El pienso actualmente divulgado puede comprender además grano para pienso, tal como cereales y otros granos y legumbres usados como pienso para animales, incluyendo trigo, cebada, avena, centeno, maíz, guisantes, colza, harina de colza, harina de soja y sorgo.

El pienso puede comprender además complementos alimenticios, es decir, materiales nutritivos que son piensos por derecho propio y que se añaden a una dieta básica como pastos para complementar sus deficiencias, como minerales y compuestos aromáticos. Los complementos alimenticios generalmente incluyen oligoelementos y macroalimentos, tal como complementos proteicos.

Bibliografía

1. Lange S. A rat model for an in vivo assay of enterotoxic diarrhea. FEMS Microbiol Lett 1982;15:239-42.
2. Bjorck S, Bosaeus I, Ek E, Jennische E, Lonroth I, Johansson E, Lange S. Food-induced stimulation of the antiselector factor can improve symptoms in human inflammatory bowel disease: a study of a concept. Gut 2000;46:824-9.
3. Goransson L, Lange S, Lonroth I. Postweaning diarrhea: focus on diet. Pigs News and Information 1995;16:89N-91N.
4. Lange S, Lonroth I. The antiselector factor: synthesis, anatomical and cellular distribution, and biological action in experimental and clinical studies. Int Rev Cytol 2001;210:39-75.
5. Zaman S, Aamir K, Lange S, Jennische E, Silferdal SA, Hanson LA. Antiselector factor effectively and safely stops childhood diarrhoea: a placebo-controlled, randomized study. Acta Paediatr 2014;103:659-664.
6. Zaman S, Mannan J, Lange S, Lonroth I, Hanson LA. B 221, a medical food containing antiselector factor reduces child diarrhoea: a placebo controlled trial. Acta Paediatr 2007;96:1655-9.

7. Lange S, Lonroth I, Martinsson K. Concentrations of antisecretory factor in eggs and in chicken blood plasma. Br Poult Sci 1994;35:615-620.

Experimentos

Experimento 1

Detección y cuantificación relativa de AF-16 en Salovum® usando ELISA y MALDI-MS

Procedimientos y materiales

Producción de Salovum®, aspectos técnicos

Después de haber determinado *in vivo* una concentración antisecretora adecuada de actividad de AF en la yema de huevo por medio del ensayo de bucle ligado en rata, se recogieron huevos y se almacenaron a +4 °C. A continuación, la yema se separó de la clara, se pasteurizó y, a continuación, se almacenó en cámaras estériles y, a continuación, se secó por pulverización en una sala con aire filtrado. Todo el procedimiento tuvo lugar en condiciones que aseguraban la exclusión de la desnaturalización de proteínas. En un momento final, la yema de huevo secada por pulverización se envasó en sobres, cada uno de los cuales contenía 4 gramos de yema de huevo en polvo. **Salovum®** se puede disolver fácilmente a temperatura ambiente en agua o zumo, y preferentemente se puede administrar en zumo de piña que elimina por completo el sabor de los huevos.

Preparación de yema de huevo-AF

Se disolvieron yema de huevo **Salovum®**, después de la inducción de AF en serie, y también yema de huevo preparada a partir de gallinas control con un bajo contenido de AF, (mezcla de cuatro yemas) en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se centrifugaron a 1000 x g durante 5 min y se recogió el sobrenadante. Se purificó el AF de la yema de huevo usando cromatografía de afinidad (Bjorck *et al.*, 2000). En resumen, después del paso del sobrenadante de yema de huevo a través de una columna de agarosa de 3 ml (Sephacrose 6B, GE Healthcare Bio-sciences AB) y lavado en PBS, el AF absorbido en agarosa se eluyó con metil- α -D-glucósido 1 M. Se dializó el eluido frente a PBS durante 24 h a 4 °C y, a continuación, se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Determinación *in vivo* de la actividad del AF en la yema de huevo

La actividad de AF de la fracción de yema de huevo purificada se determinó mediante el ensayo de bucle ligado en ratas usando la toxina del cólera (CT) como secretagogo (1). Por tanto, a una preparación de AF que mediaba una inhibición de un 50 % de la secreción de fluido inducida por CT en un asa yeyunal de rata se le asignó un valor de "unidad de AF" de 0,5. Estudios previos en humanos (2) y animales (3) han demostrado que los valores de AF >0,5 unidades de AF se correlacionan con la reducción de la secreción de diarrea (2).

Anticuerpo contra AF-16

Se generó anticuerpo policlonal primario contra el péptido AF ³⁶-VCHSKTRSNPENNVGL-⁵¹ en conejo (aP8). Se produjo el péptido mediante síntesis química orgánica en fase sólida y la siguiente producción de antisero fue realizada por Innovagen AB (Lund, Suecia).

Prueba DE ELISA de AF-16 inmunógeno.

Se analizó el contenido de AF-16 en la yema de huevo en un ensayo de inmuoadsorción enzimática (ELISA). Las muestras de yema de huevo purificada por afinidad se valoraron en placas de microtitulación Maxisorp (Nunc) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después del bloqueo con seroalbúmina bovina (BSA) al 0,2 % en PBS durante 45 min a 37 °C, las placas se lavaron con PBS + Tween 20 al 0,05 % (PBS-T). Se añadió el anticuerpo policlonal generado contra el péptido de AF AF-16, AP8 (diluido 1/500 en PBS + de Tween 20 al 0,05 % + BSA al 0,2 %) y se incubaron las placas durante 2 h a temperatura ambiente (TA). Después del lavado, se añadió anticuerpo de cabra contra inmunoglobulina IgG de conejo conjugada con fosfato alcalino (AP) (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.) durante 1 hora a TA. Después del lavado, se añadió a las placas el sustrato 4-nitrofenil fosfato (Sigma-Aldrich Sweden AB) en tampón de dietanolamina (pH 9,8) con MgCl₂ 1 mM y se reveló la enzima unida leyendo la absorbancia a 405 nm. Se usó suero preimmune de conejo como fondo y los valores se dedujeron para dar la absorbancia neta.

Detección por espectrometría de masas MALDI de AF-16

La cuantificación relativa del péptido AF-16 en muestras de yema de huevo purificada por afinidad se sometió a prueba mediante espectrometría de masas de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-MS). Se usaron 2 procedimientos AutoXecute diferentes con 30000 y 10000 satisfactorios para recoger datos de cada muestra depositada en la placa de acero molido de MALDI con un 80 % de intensidad de láser y movimiento de

ráster hexagonal. Se usó HCCA como solución de la matriz y se normalizaron las intensidades de señal de AF-16 a la señal de matriz 568,2 (3HCCA+H). Para someter a prueba el procedimiento, añadimos una serie de diluciones de AF-16 en muestras de yema de huevo después de la cromatografía de afinidad y aplicamos el mismo procedimiento recogiendo 30000 disparos satisfactorios.

5

Resultados

Yema de huevo sometida a prueba para determinar la actividad biológica

Se sometieron a prueba las muestras de yema de huevo purificada para determinar la actividad de AF en el ensayo de bucle ligado en rata. Se recogió la yema de los huevos cada semana durante el aporte a las gallinas de una dieta que estimulaba la producción alta de AF endógeno. Los resultados de la tabla 1 demuestran un aumento de la actividad del AF durante hasta 14-15 semanas de aporte en la dieta, después de lo cual no se pudo registrar ningún otro incremento de la actividad de AF por medio del ensayo *in vivo*. Finalmente, se recogieron los huevos después de un aporte continuo durante 18 semanas del pienso estimulante del AF. En estos huevos se pudo determinar una actividad de AF significativa en muestras de yema diluidas 1:1000 (Tabla 1).

15

Tabla 1. Actividad de AF en muestras de yema de huevo purificada recogidas de gallinas después de 2-3, 8-9 y 14-18 semanas después del aporte de una dieta inductora de AF. Un valor de >0,5 unidades de AF se correlaciona con una disminución significativa de la producción de diarrea.

20

Grupo de prueba	Semanas de dieta inductora de AF	N	Unidades de AF Medias \pm SFM*	Dilución de yema en la prueba
A	2-3	6	0,2 \pm 0,01	
B	8 - 9	6	0,6 \pm 0,02	
	14 - 18	8	0,5 \pm 0,02	1:1000

- Significación: A frente a B, $p = 0,0025$

25

- A frente a B, $p = 0,0123$

- B frente a C, $p = NS$

Yema de huevo sometida a prueba por ELISA

30

Para evaluar el efecto de la inducción de AF después de diferentes puntos temporales, se determinó el contenido de AF-16 con aP8. Como se muestra en la figura 1, el nivel fue bajo en las muestras preparadas después de hasta 10 semanas de inducción para alcanzar un incremento del nivel de más del doble después de 18 semanas.

35

Fig. 1. El nivel de AF-16 en la yema de huevo purificada por afinidad como se sometió a prueba por ELISA usando aP8. Se analizaron muestras de yemas de huevo mezcladas ($n=4$) y se determinó la absorbancia neta.

La cuantificación relativa del péptido AF-16 en muestras de yema de huevo purificada por afinidad se realizó con MALDI-MS como se puede observar en la FIG. 2. Los dos procedimientos de adquisición diferentes (30000 y 10000 disparos satisfactorios recogidos de cada muestra) arrojaron resultados similares y mostraron una intensidad de señal normalizada creciente de 3 a 5 semanas, 5 a 9 semanas y 9 a 12 semanas, respectivamente. Dado que se usó HCCA como solución de la matriz, se normalizaron las intensidades de señal de AF-16 a la señal de matriz 568,2 (3HCCA+H). Se observó un incremento de aproximadamente el doble en las señales de AF-16 en las muestras de 3 a 12 semanas.

45

Fig. 2. 130000 (rojo) y 10000 (azul) disparos de láser satisfactorios recogidos de cada muestra que muestran la intensidad de señal normalizada promedio del péptido AF-16 de muestras de yema de huevo purificada que van de 3-12 semanas.

50

Para evaluar la cantidad relativa del péptido AF-16 en la yema de huevo, se añadió una serie de diluciones del péptido AF-16 a muestras de yema de huevo purificada por cromatografía de afinidad y se analizaron con MALDI. Los resultados se pueden ver en la FIG. 3. Se normalizaron los resultados a 3 picos de masa interna diferentes y los autores observaron que la normalización a tres señales de matriz diferentes dio resultados similares.

55

Fig. 3. Cantidad relativa del péptido AF-16 en la yema de huevo como se analizó con MALDI. Se normalizaron los resultados a 3 picos de masa interna diferentes. En base a la intensidad de la señal normalizada en la serie de diluciones, los autores pudieron estimar que la cantidad relativa de péptido AF-16 en las muestras de yema de huevo estaba en el intervalo de 0,05 ng/ml después de 12 semanas.

En base a la intensidad de la señal normalizada en la serie de diluciones, los autores pudieron estimar que la cantidad relativa de péptido Af-16 en las muestras de yema de huevo estaba en el intervalo de 0,05 ng/ml después de 12 semanas.

5

Experimento 2

El factor antisecretor detiene la diarrea en menos de tres horas, sin efectos secundarios.

10 El factor antisecretor (AF) es parte del sistema de defensa innato del huésped en el ser humano y los animales. El AF actúa en combinación con proteasomas y complejos de proteasoma-complemento C3, previniendo la hipersecreción y la inflamación sin efectos secundarios.

15 El AF se puede proporcionar por vía oral como yema de huevo en polvo, Salovum®.

En niños paquistaníes, que sufrían de diarrea aguda, se demostró previamente que el tratamiento con Salovum® reducía el número de deposiciones y mejoraba su consistencia en 10 horas frente a las 18 horas del grupo del placebo.

20 Se produjo un lote nuevo de Salovum® (New Salovum) con un efecto antisecretor $10^2/10^3$ veces más potente que la preparación anterior tratando de lograr un tratamiento de la diarrea aún más eficaz. Se usó este lote para el tratamiento de niños que sufrían de diarrea líquida y deshidratación de moderada a grave, seleccionados en la Clínica Pediátrica de Pacientes Ambulatorios, Hospital Infantil, Lahore, Pakistán. Ocho pacientes recibieron un sobre de (New Salovum) (4 gramos, grupo 1) mientras que otros ocho recibieron dos sobres (New Salovum) (8 gramos, grupo 2).

25 El protocolo para el manejo de la diarrea se mantuvo uniforme para todos los pacientes excepto para la dosis de (New Salovum). En el momento de la inclusión, el número medio de deposiciones desde la mañana fue similar en ambos grupos con $15 \pm 4,6$ en el grupo 1 y $13 \pm 4,5$ en el grupo 2, $p = 0,429$. Después de la bebida de (New Salovum), el grupo 1 registró una media de 4 deposiciones durante las siguientes 3 horas (reducción de un 65 %, $p < 0,001$), mientras que en el grupo 2 se observó una media de 2,7 deposiciones (reducción de un 68 %, $p < 0,000$). La consistencia de las heces mejoró de forma similar en ambos grupos desde inicialmente acuosas (8, es decir, 100 %) a acuosas (2, es decir, 25 %) o semisólidas (6, es decir, 75 %). Ningún paciente del grupo 2 mostró signos de deshidratación después del aporte de (New Salovum), mientras que seis (75 %) del grupo 1 presentaron algunos signos y dos (25 %) signos graves.

30 Se observó una reducción en el número de heces y una mejor consistencia en un plazo de 91 minutos después de las bebidas de (New Salovum) en el grupo 1 y después de 68 minutos. en el grupo 2 ($p = 0,3302$). No se observaron efectos secundarios.

40 Se podría proporcionar la administración de New Salovum poco después de la aparición de la diarrea en zonas desfavorecidas, por ejemplo, por personal de enfermería de las aldeas, preferentemente comenzando poco después de la aparición de la enfermedad. Esto reduciría la necesidad de aplicar una atención médica más cualificada. El tratamiento con New Salovum de la diarrea infantil podría, por tanto, dar como resultado una mejora de la salud infantil que favorezca el crecimiento y el desarrollo, a bajo coste y sin el riesgo de efectos secundarios.

45 **Tabla 2.** Respuesta a la dosis del tratamiento con New Salovum en niños que padecen enfermedades diarreicas. El grupo 1 recibió un sobre (4 gramos) y el grupo 2 dos sobres (8 gramos) en el momento de la inclusión. La respuesta clínica al tratamiento con New Salovum se registra al final del primer período de registro de 3 horas con los cambios registrados durante este tiempo.

50

Tabla 2

Variabes	Grupo 1	Grupo 2	Valor de p
Media de edad (meses) \pm DE	14,4375 \pm 8,898	16,5 \pm 5,318	0,5816
Frecuencia de las deposiciones:			
Deposiciones desde la mañana (media \pm DE)	15 \pm 4,62*	13 \pm 4,50**	0,4291
Deposiciones en 3 h			
(media \pm DE)	4,75 \pm 2,91*	2,75 \pm 2,18**	0,1430
Reducción porcentual:	64,47 %	68,11 %	

Variables	Grupo 1	Grupo 2	Valor de p
	(p <0,0001)	(p <0000)	
Consistencia al ingreso:			
Acuosas	8/8 100 %	8/8 100 %	
Después del tratamiento:			
acuosas	2/8 (25 %)	2/8 (25 %)	0,0035
Semisólidas	6/8 (75 %)	6/8 (75 %)	
Deshidratación, signos clínicos en el momento de la presentación			
Algunos	4 (50 %)	2 (25 %)	
Moderados	1 (12,5 %)	5 (62,5 %)	
Graves	3 (37,5 %)	1 (12,5 %)	
Deshidratación, signos clínicos después del tratamiento			
Ninguno	0	8 (100 %)	
Algunos	6 (75 %)	0	
Moderados	0	0	
Graves	2 (25 %)	0	
Tiempo medio necesario para responder reduciendo el número de heces y mejorando la consistencia:			
	91 minutos	68 minutos	0,3302

_Nota: La duración total del tratamiento con OPD no se extendió a más de 3 horas durante las cuales todos los enviados a casa informaron de ausencia de todos los síntomas.
Se realizaron pruebas de la t y chi cuadrado para comparaciones entre medias y proporciones.
* Las comparaciones de antes y después del número medio de deposiciones en el grupo 1 fueron significativas (p <0,0001)
** Las comparaciones de antes y después del número medio de deposiciones 2 fueron significativas (p <0,0000)

Experimento 3

Procedimiento para la estimación de proteínas antisecretoras naturales en huevos.

5

Se disuelven 1,75 gramos de yema de huevo en polvo en 6,4 ml de solución tamponada con fosfato (PBS), lo que representa un 20 % de la materia seca de una yema de huevo. Se añaden 4 ml de esta solución a 6 ml de PBS. (50 % del contenido de NASP original). Se centrifuga la muestra diluida a 2000 g durante diez minutos; se transfiere el sobrenadante a una columna de agarosa (Sephacrose). Se eluye el NASP absorbido con alfa-metilglucósido y se recoge el eluido de 1 ml que contiene el NASP y se dializa. (Rendimiento 100 %) La presente solicitud de patente establece:

10

Se diluye 500 o 1000 veces la muestra preparada como se indica anteriormente, antes de someterla a prueba en el modelo de intestino de rata. Se inyecta por vía intravenosa una alícuota de 1 ml de la muestra diluida antes de exponer el intestino a la toxina del cólera. Se calcula el número de unidades de FIL a partir del peso del intestino por centímetro en los grupos de prueba y control de ratas.

15

El contenido de NASP en huevos es igual al resultado, como se determina anteriormente y se multiplica por la tasa de dilución inversa.

20

Por tanto, el contenido analizado de NASP en las muestras es igual al resultado multiplicado por 1000 o 2000.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Lantmännen AS-Faktor AB
- 5 <120> Procedimiento para producir yema de huevo con alto contenido de AF-16
- <130> PS54728PC00
- <140> PCT/
- 10 <141> 14-06-2016
- <150> SE 1551018-3
- <151> 10-07-2015
- 15 <160> 4
- <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- <210> 1
- 20 <211> 16
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220> Péptido activo
- 25 <221> VARIANTE
- <222> 6
- <223> se puede reemplazar con A
- <221> VARIANTE
- 30 <222> 3
- <223> se puede reemplazar con R o K
- <221> VARIANTE
- <222> 4
- 35 <223> se puede reemplazar con L
- <221> VARIANTE
- <222> 2
- 40 <223> se puede reemplazar por S
- <400> 1
- Val Cys His Ser Lys Thr Arg Ser Asn Pro Glu Asn Asn Val Gly Leu
- 1 5 10 15
- <210> 2
- 45 <211> 7
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220> Péptido activo
- 50 <221> VARIANTE
- <222> 6
- <223> se puede reemplazar por A
- <221> VARIANTE
- 55 <222> 3
- <223> se puede reemplazar por R o K
- <221> VARIANTE
- <222> 4
- 60 <223> se puede reemplazar por L
- <221> VARIANTE
- <222> 2
- 65 <223> se puede reemplazar por S

ES 2 887 086 T3

<400> 2

Val Cys His Ser Lys Thr Arg
1 5

5 <210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220> Péptido activo
<221> VARIANTE
<222> 5
<223> se puede reemplazar por A

15 <221> VARIANTE
<222> 2
<223> se puede reemplazar por R o K

20 <221> VARIANTE
<222> 3
<223> se puede reemplazar por L

25 <221> VARIANTE
<222> 1
<223> se puede reemplazar por S

<400> 3

Cys His Ser Lys Thr Arg
1 5

30 <210> 4
<211> 382
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 4

Met	Val	Leu	Glu	Ser	Thr	Met	Val	Cys	Val	Asp	Asn	Ser	Glu	Tyr	Met
1				5				10						15	
Arg	Asn	Gly	Asp	Phe	Leu	Pro	Thr	Arg	Leu	Gln	Ala	Gln	Gln	Asp	Ala
			20					25					30		
Val	Asn	Ile	Val	Cys	His	Ser	Lys	Thr	Arg	Ser	Asn	Pro	Glu	Asn	Asn
		35					40					45			
Val	Gly	Leu	Ile	Thr	Leu	Ala	Asn	Asp	Cys	Glu	Val	Leu	Thr	Thr	Leu
	50					55				60					
Thr	Pro	Asp	Thr	Gly	Arg	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	His	Thr	Val	Gln	Pro
65					70					75					80
Lys	Gly	Lys	Ile	Thr	Phe	Cys	Thr	Gly	Ile	Arg	Val	Ala	His	Leu	Ala
				85					90					95	
Leu	Lys	His	Arg	Gln	Gly	Lys	Asn	His	Lys	Met	Arg	Ile	Ile	Ala	Phe
			100					105					110		
Val	Gly	Ser	Pro	Val	Glu	Asp	Asn	Glu	Lys	Asp	Leu	Val	Lys	Leu	Ala
		115					120					125			
Lys	Arg	Leu	Lys	Lys	Glu	Lys	Val	Asn	Val	Asp	Ile	Ile	Asn	Phe	Gly
	130						135					140			

ES 2 887 086 T3

Glu Glu Glu Val Asn Thr Glu Lys Leu Thr Ala Phe Val Asn Thr Leu
 145 150 155 160
 Asn Gly Lys Asp Gly Thr Gly Ser His Leu Val Thr Val Pro Pro Gly
 165 170 175
 Pro Ser Leu Ala Asp Ala Leu Ile Ser Ser Pro Ile Leu Ala Gly Glu
 180 185 190
 Gly Gly Ala Met Leu Gly Leu Gly Ala Ser Asp Phe Glu Phe Gly Val
 195 200 205
 Asp Pro Ser Ala Asp Pro Glu Leu Ala Leu Ala Leu Arg Val Ser Met
 210 215 220
 Glu Glu Gln Arg His Ala Gly Gly Gly Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ala
 225 230 235 240
 Ser Ala Ala Glu Ala Gly Ile Ala Thr Thr Gly Thr Glu Asp Ser Asp
 245 250 255
 Asp Ala Leu Leu Lys Met Thr Ile Ser Gln Gln Glu Phe Gly Arg Thr
 260 265 270
 Gly Leu Pro Asp Leu Ser Ser Met Thr Glu Glu Glu Gln Ile Ala Tyr
 275 280 285
 Ala Met Gln Met Ser Leu Gln Gly Ala Glu Phe Gly Gln Ala Glu Ser
 290 295 300
 Ala Asp Ile Asp Ala Ser Ser Ala Met Asp Thr Ser Glu Pro Ala Lys
 305 310 315 320
 Glu Glu Asp Asp Tyr Asp Val Met Gln Asp Pro Glu Phe Leu Gln Ser
 325 330 335
 Val Leu Glu Asn Leu Pro Gly Val Asp Pro Asn Asn Glu Ala Ile Arg
 340 345 350
 Asn Ala Met Gly Ser Leu Pro Pro Arg Pro Pro Arg Thr Ala Arg Arg
 355 360 365
 Thr Arg Arg Arg Lys Thr Arg Ser Glu Thr Gly Gly Lys Gly
 370 375 380

REIVINDICACIONES

- 5 1. Yema de huevo que comprende un fragmento de proteína de factor antiseoretor (AF) de al menos 0,05 ng/ml con una secuencia de aminoácidos como se divulga en la SEQ.ID.NO.1 y/o en la SEQ.ID.NO.2.
2. Yema de huevo de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la yema de huevo se seca por pulverización.
- 10 3. Yema de huevo de acuerdo con la reivindicación 2, que se **caracteriza** además **por** inducir al menos 0,5 unidades de AF en un paciente que lo necesita entre 60-120 min después del aporte de al menos 4 gramos de dicha yema de huevo liofilizada.
4. La yema de huevo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que se origina a partir de huevos de aves de corral, tales como aves gallináceas, incluyendo gallinas.
- 15 5. Un procedimiento para producir una yema de huevo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, comprendiendo dicho procedimiento:
 - 20 a. durante al menos 4 semanas, tal como durante al menos 12 semanas, alimentar a las aves de corral con un pienso inductor de AF-16 y/o AF-8 para aves de corral que comprenda al menos 1-2 gramos de triptófano/kg de pienso y en el que dicho alimento se proporcione en forma granulada, en el que dicho pienso comprende además de forma alternativa aminoácidos, glúcidos y amidas en cantidades y proporciones de modo que se estimule la formación de AF-16 en las aves de corral después del consumo de dicho pienso, o en el que dicho pienso comprende además de forma alternativa cereales malteados en cantidades y proporciones de modo que se estimule la formación de AF-16 y/o AF-8 n las
 - 25 b. recoger huevos de dichas aves de corral,
 - 30 c. separar la yema de huevo de la clara de huevo, y, de forma alternativa,
 - d. liofilizar, secar en lecho fluido, triturar, lixiviar, extraer, evaporar, filtrar por membrana y/o secar dicha yema de huevo, en el que dicha ave de corral es un ave gallinácea, incluyendo gallinas.
- 35 6. Yema de huevo producida de acuerdo con la reivindicación 5.
7. Yema de huevo de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicha yema de huevo comprende un fragmento de proteína de factor antiseoretor (AF) de al menos 0,05 ng/ml con una secuencia de aminoácidos como se divulga en la SEQ.ID.NO.1 y/o SEQ.ID.NO.2.
- 40 8. Yema de huevo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6-7, para su uso en medicina.
9. Yema de huevo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6-7, para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de la diarrea y/o deshidratación.
- 45 10. Uso de yema de huevo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6-7 para la preparación de productos alimenticios funcionales enriquecidos con proteínas de factor antiseoretor (AF), tales como piensos, alimentos y/o complementos alimenticios.
- 50 11. Un alimento, pienso y/o complemento alimenticio que comprende yema de huevo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6-7.
12. Un alimento que comprende yema de huevo de acuerdo con la reivindicación 11 seleccionado del grupo que consiste en tortita, tortilla, helado, huevo duro o pasado por agua, refrescos, yogur, pan, galletas, pasta, granos, copos, papilla, gachas, composiciones de bebidas con o sin electrolitos, una preparación de alimentos
 - 55 que contiene carne y productos cárnicos, grasas y productos grasos, leche y productos lácteos y barras de alimentos.
13. Una composición farmacéutica que comprende yema de huevo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6-7 y un vehículo farmacéutico adecuado.
- 60 14. Una composición farmacéutica que comprende yema de huevo de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el vehículo farmacéutico adecuado se selecciona del grupo que consiste en agua y PBS.
- 65 15. Una composición farmacéutica que comprende yema de huevo de acuerdo con la reivindicación 13, que se **caracteriza** además **por** inducir al menos 0,5 unidades de AF en un paciente que lo necesita.

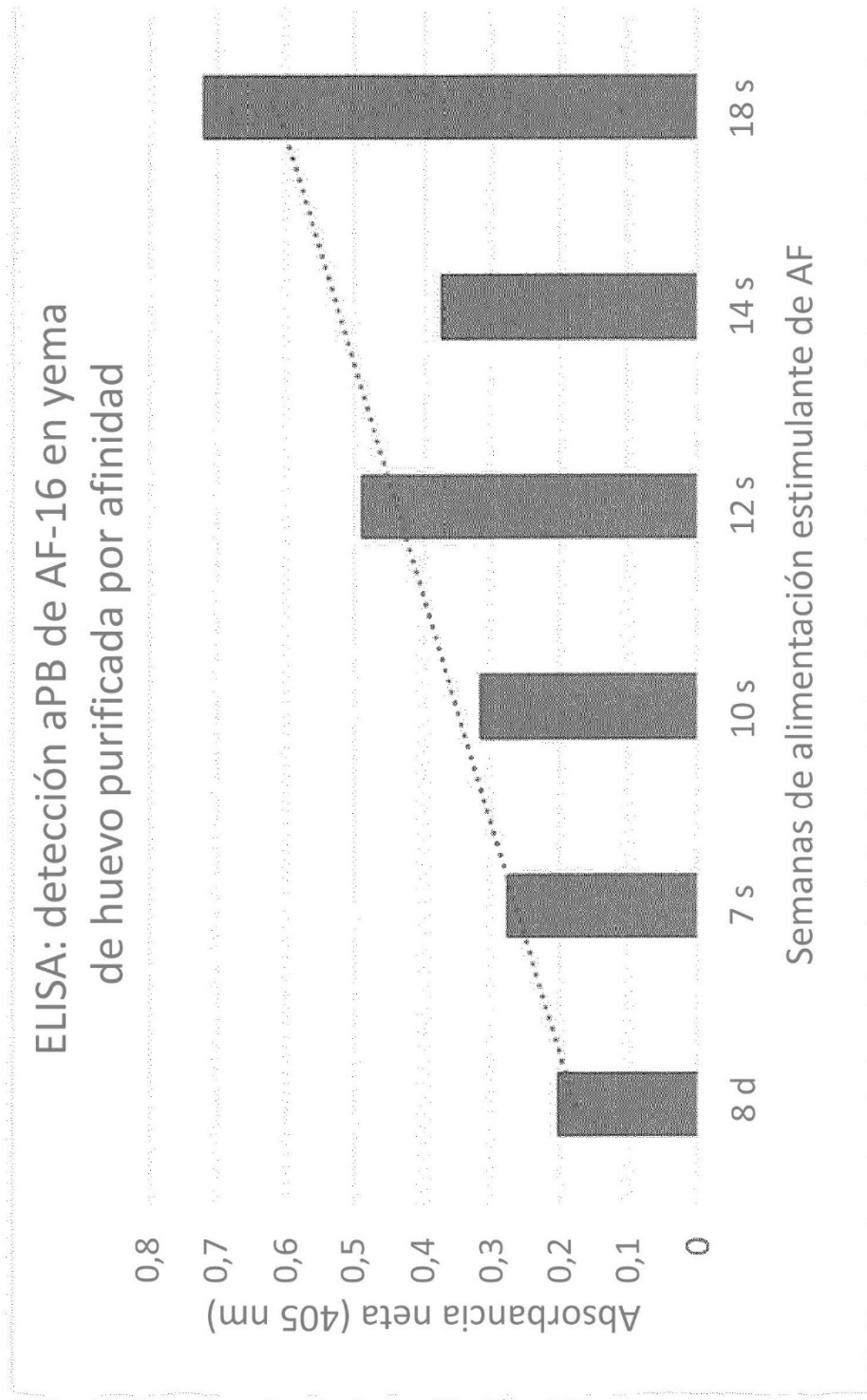


Fig.1

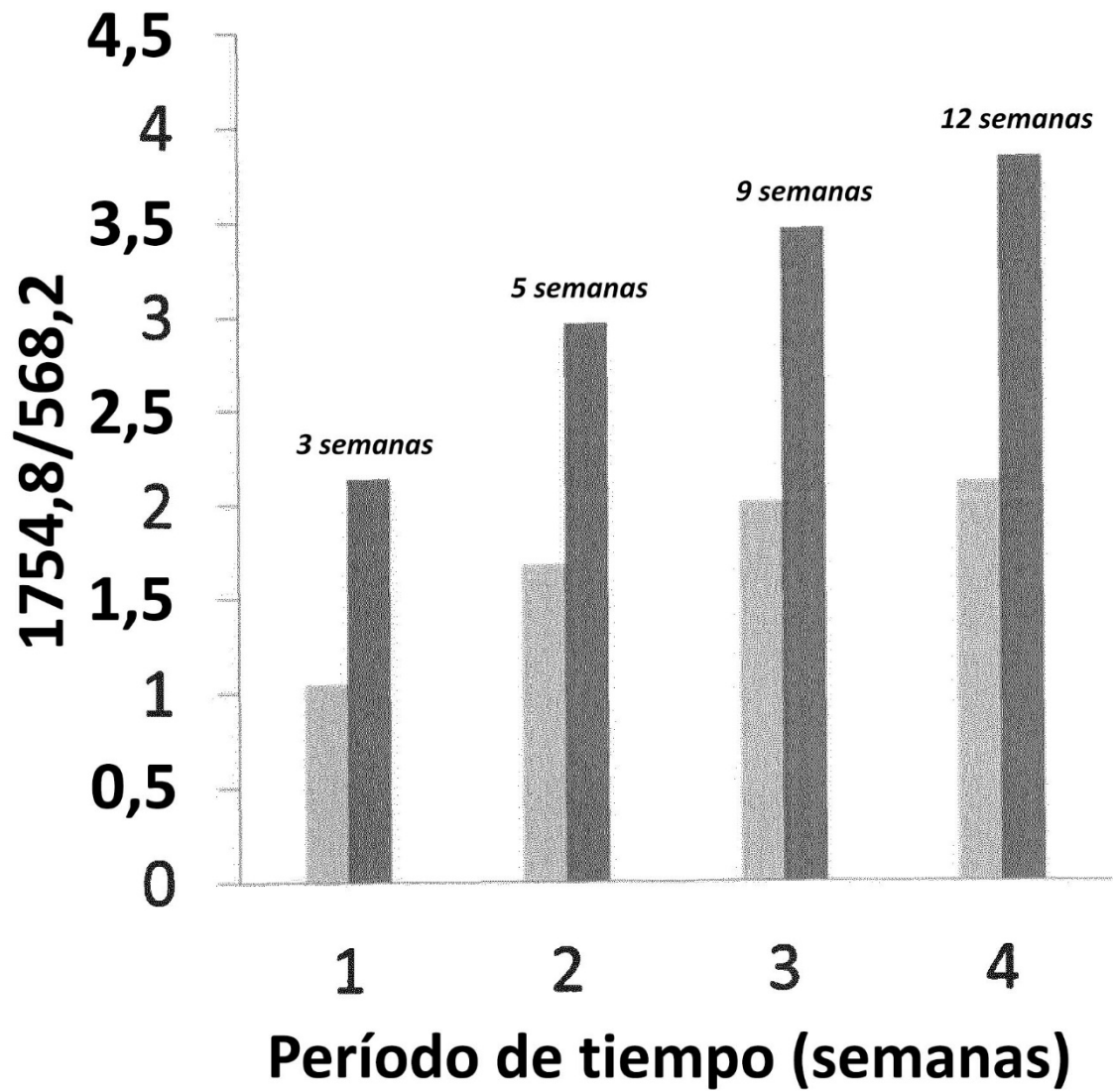


Fig.2

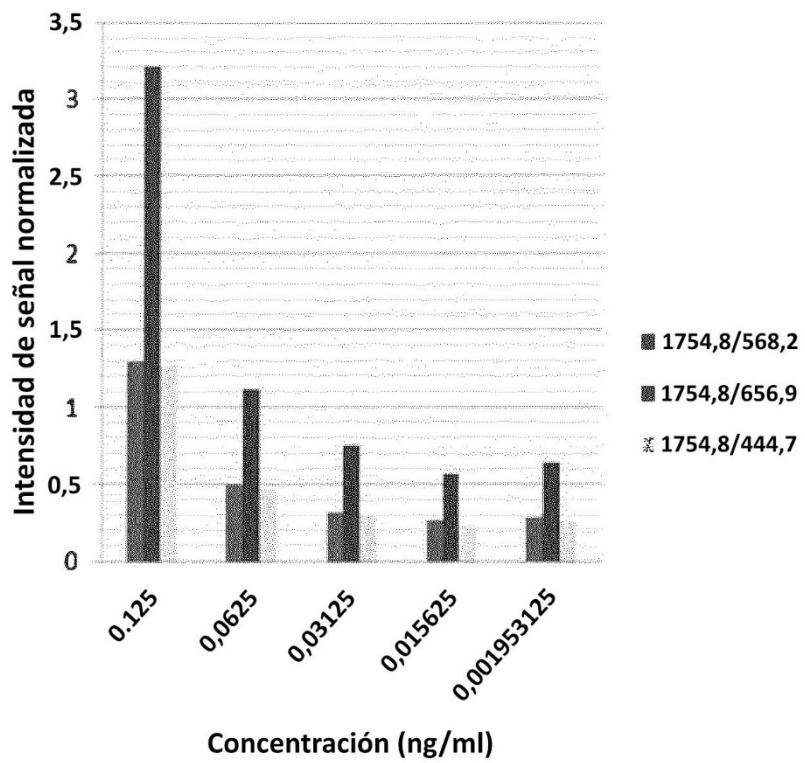
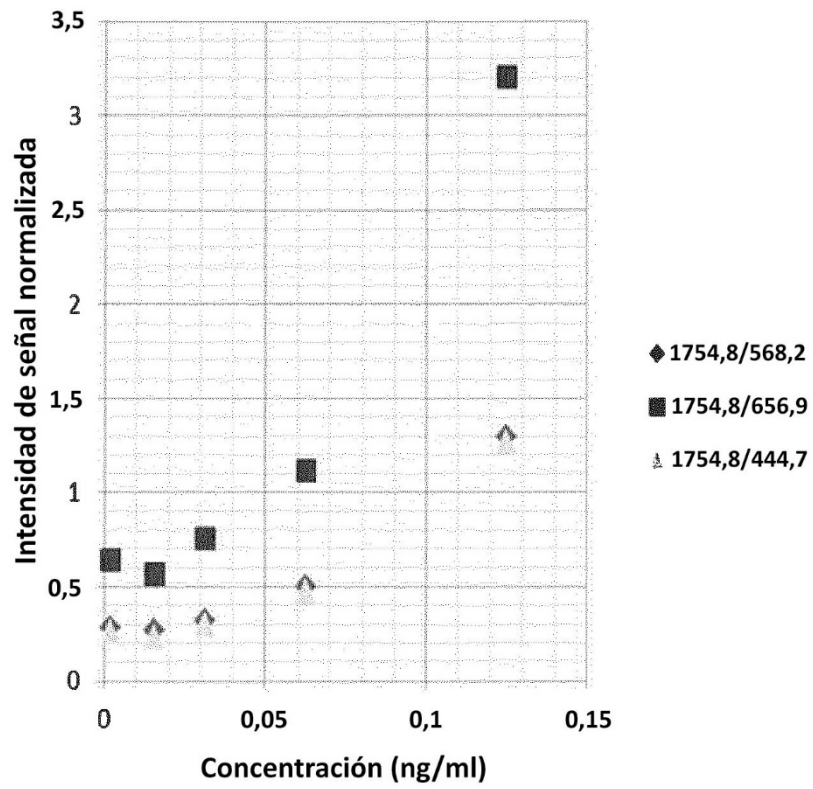


Fig.3