

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 913 336**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2014** **PCT/US2014/054903**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015** **WO15047729**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2014** **E 14772520 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2022** **EP 3049436**

54 Título: **Métodos de uso de IgA secretora**

30 Prioridad:

**24.09.2013 US 201314034633**

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

**01.06.2022**

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION  
(100.0%)**

**614 Walnut Street  
Madison, WI 53726, US**

72 Inventor/es:

**COOK, MARK E.;  
SAND, JORDAN MARSHALL;  
KRUGNER-HIGBY, LISA ANN y  
NTAMBI, JAMES MUKASA**

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 2 913 336 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

Métodos de uso de IgA secretora

## 5 CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN

La presente descripción está relacionada con los métodos de uso de la IgA secretora para tratar ciertas condiciones inflamatorias en humanos y animales, particularmente la dermatitis, incluyendo dermatitis atópica y ulcerosa.

## 10 ANTECEDENTES

Dermatitis es un término general que describe una inflamación de la piel. La dermatitis atópica, por ejemplo, es un trastorno inflamatorio prurítico de la piel que afecta a niños y adultos humanos, así como a animales. Se cree que en la dermatitis atópica, la exposición a irritantes y alérgenos involucra tanto las vías inmunológicas como inflamatorias, dando como resultado lesiones cutáneas y prurito. En los seres humanos, la dermatitis atópica a veces se llama eccema atópico. La dermatitis atópica en los lactantes, también llamada eccema del lactante, causa un aumento en la tendencia a desarrollar asma y reacción alérgica más adelante en la vida, una progresión llamada la marcha atópica. El tratamiento temprano y eficaz de la dermatitis atópica en los lactantes podría dar lugar a una reducción de los problemas más adelante en la vida.

En los perros, la dermatitis atópica también se presenta como prurito, donde se observa que el perro se rasca, se mastica, se frota o se lame la cara y las patas. Los parches calientes en los perros, también conocidos como dermatitis húmeda, son puntos localizados de inflamación de la piel que son una fuente de gran agitación para los perros, haciendo que el perro se fije en el sitio que pica, molestando constantemente hasta que se desarrolla una herida. A menudo, los parches calientes se infectan y requieren tratamiento con antibióticos. Al igual que los perros, los gatos también pueden sufrir de dermatitis atópica y parches calientes.

La dermatitis ulcerosa (DU) es una forma grave de dermatitis atópica caracterizada por lesiones cutáneas ulcerosas. Se ha observado que la DU es un problema en ratones de laboratorio, en particular en ratones con fondo C57BL/6 (B6), lo que lleva a la eutanasia de los animales afectados debido al agrandamiento de la úlcera estable y/o a un autotraumatismo extremo en las zonas afectadas. Dado el costo de producir cepas especializadas de ratones de laboratorio, la eutanasia de un solo animal de laboratorio debido a la DU es un resultado inaceptable.

EP 2138186 describe el uso de SIgA y probióticos para tratar o prevenir la inflamación.

Se necesitan nuevos tratamientos para los trastornos inflamatorios crónicos, como la dermatitis.

## BREVE RESUMEN

En un aspecto la invención proporciona una composición de IgA secretora formulada para la administración oral que comprende una cantidad antiinflamatoria de IgA secretora para el uso en un método para prevenir y/o tratar la inflamación en una estructura superficial de barrera en un individuo que lo necesita, comprendiendo dicho método la administración oral de la composición al individuo, en donde la IgA secretora es aislada del líquido luminal intestinal o de la mucosa intestinal de un animal, preferentemente un animal que ha sido expuesto a una variedad de antígenos, o del líquido luminal intestinal o de la mucosa intestinal de un cerdo, una oveja, un pollo, un pavo o una vaca, y en donde la inflamación en una estructura superficial de barrera es dermatitis.

También se describe un método para prevenir y/o tratar la inflamación en una estructura superficial de barrera en un individuo que lo necesita que comprende la administración por vía oral al individuo de una cantidad antiinflamatoria de IgA secretora.

También se describe un método de prevención y/o tratamiento de la dermatitis ulcerosa en un ratón de laboratorio con fondo C57BL/6 que comprende administrar oralmente al ratón de laboratorio con fondo C57BL/6 una cantidad antiinflamatoria de IgA secretora.

También se describe un aditivo alimentario para perros o gatos que comprende un excipiente e IgA secretora.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra la especificidad de anticuerpos de huevo anti-IgA de ratón creados utilizando un anticuerpo de huevo anti-IgA de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) en un ELISA. Se adhirió IgA de ratón a placas que luego se analizaron utilizando uno de los tres tratamientos siguientes: 1) anticuerpo de huevo anti-IgA de ratón conjugado con HRP solamente (HRP; línea de puntos), 2) anticuerpo de huevo anti-IgA de ratón conjugado con HRP más anticuerpo de huevo anti-IgA de ratón sin marcar (HRP con competencia; línea continua), y 3) anticuerpo de huevo anti-IgA de ratón conjugado con HRP más anticuerpo de huevo no específico de

control sin marcar (HRP con anticuerpo control; línea discontinua). Los resultados demuestran que el anticuerpo de huevo es específico para el sustrato de IgA murina porque se une al sustrato y la unión compite con un anticuerpo de huevo anti-IgA murina sin marcar, pero no con un anticuerpo de huevo no específico de control.

La Figura 2 muestra la IgA secretora luminal de base en control y ratones SCD1<sup>-/-</sup> cuantificados utilizando un ELISA que involucra los anticuerpos de huevo anti-IgA de ratón descritos en la Figura 1. Hay un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de IgA luminal en los ratones SCD1<sup>-/-</sup>. \* P<0,07.

La Figura 3 muestra las puntuaciones de dermatitis ulcerosa (DU) para ratones SCD<sup>-/-</sup> alimentados con una dieta semipurificada basada en caseína suplementada con mucosa intestinal porcina cruda que contiene SIgA. Los números reportados son un promedio de la puntuación de DU total semanal/número de días/ número de animales. Hay una disminución significativa en las puntuaciones de DU de la semana uno a la semana seis en los ratones que consumen mucosa intestinal porcina cruda. \* = P<0,05.

La Figura 4 muestra los datos de rascado para los animales control y para ratones SCD<sup>-/-</sup> alimentados con una dieta semipurificada basada en caseína suplementada con mucosa intestinal porcina cruda. Los datos presentados son un promedio del número total semanal de rasguños/el número de días/ el número de animales. No hay diferencia significativa entre el control o la mucosa intestinal porcina cruda.

La Figura 5 muestra las puntuaciones de DU para ratones SCD<sup>-/-</sup> alimentados con una dieta semipurificada basada en caseína suplementada con IgA secretora porcina purificada. Los números reportados son un promedio de la puntuación de DU total semanal/número de días/ número de animales. Hay una disminución significativa en la puntuación de DU con los ratones que consumen SIgA porcina purificada. \* = P<0,001.

La Figura 6 muestra los datos de rascado para los animales control y para ratones SCD<sup>-/-</sup> alimentados con una dieta semipurificada basada en caseína suplementada con IgA secretora porcina purificada. Hay una disminución significativa en el rascado con los ratones que consumen IgA secretora porcina purificada. \* = P<0,03

Las características descritas anteriormente y otras serán apreciadas y entendidas por los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos, y las reivindicaciones adjuntas.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

La IgA secretora (SIgA) es una inmunoglobulina con diversas actividades de unión a antígenos. Cuando SIgA es liberada de la mucosa intestinal al entorno externo, forma complejos inmunes con patógenos y flora intestinal comensal, antígenos alimentarios y alérgenos, evitando así su unión a la mucosa intestinal y que penetren en la misma. SIgA actúa como una molécula antiinflamatoria al bloquear las interacciones célula-antígeno inmunitarias. De hecho, la deficiencia de SIgA es la inmunodeficiencia humana más común. Las manifestaciones clínicas reportadas de deficiencia de SIgA en humanos incluyen infecciones respiratorias, trastornos gastrointestinales y trastornos alérgicos incluyendo dermatitis atópica.

Aunque ha habido alguna sugerencia de que el aumento de SIgA podría ser útil clínicamente, los resultados hasta ahora no han sido concluyentes. Por ejemplo, si bien los niveles endógenos de SIgA se han correlacionado con la disminución de los trastornos alérgicos, también se correlacionaron otros biomarcadores, lo que confunde los resultados. Además, en un estudio de administración de probióticos en niños, se midió el aumento de IgA plasmática, sin embargo, no hubo ningún efecto sobre el asma y la alergia. A pesar de la sugerencia de que SIgA podría tener alguna relación con la alergia, no ha habido ningún estudio empírico que demuestre que la concentración de SIgA endógena en el tracto intestinal esté relacionada con trastornos de la piel. Antes de la presente invención, no se sabía si SIgA administrada por vía oral podría ser utilizada para tratar trastornos crónicos de la piel tal como la dermatitis ulcerosa. Con respecto a la dermatitis, se desconocía particularmente si la SIgA administrada por vía oral, situada en el lumen del intestino, se uniría eficazmente a antígenos microbianos y/o alimentarios relacionados con la dermatitis, previniendo su filtración a la circulación y la interacción con las células inmunitarias en la piel. Inesperadamente, los inventores han demostrado en la presente invención que puede utilizarse SIgA administrada por vía oral para prevenir y revertir la dermatitis ulcerosa así como otras afecciones inflamatorias.

Específicamente, se utilizó un modelo de ratón para la inducción de la dermatitis que conduce a la dermatitis ulcerosa para estudiar los efectos de la IgA secretora sobre la dermatitis. En este modelo, ratones mutantes (knock-out) global de la esteroil-CoA-desaturasa (SCD<sup>-/-</sup>) sometidos a una dieta a base de caseína semipurificada desarrollan casi un 100% de dermatitis. En un estudio, los inventores descubrieron que la alimentación con SIgA porcina purificada extraída del contenido intestinal de cerdos o una preparación de mucosa deshidratada que contenía SIgA a ratones SCD<sup>-/-</sup> sometidos a una dieta que induce dermatitis dio como resultado una reducción en el desarrollo de dermatitis ulcerosa. La reducción de la dermatitis ulcerosa fue dependiente de la dosis. Si bien el 100% de los ratones control desarrollaron dermatitis, sólo el 50% de los ratones alimentados con 0,33 gramos y el 14% de los ratones alimentados con 1 gramo de la dieta de SIgA/Kg desarrollaron dermatitis.

En un estudio adicional, ratones que ya habían desarrollado dermatitis ulcerosa (una afección que a menudo hace que sea necesaria la eutanasia de los ratones afectados) fueron alimentados con 1 gramo de SIgA (o mucosa que contiene SIgA, con la misma capacidad de unión a LPS que 1 gramo de SIgA pura). Los síntomas de la dermatitis ulcerosa se redujeron o eliminaron dramáticamente en los cuatro ratones tratados que tenían dermatitis ulcerosa.

Como se utiliza en la presente invención, las “estructuras superficiales de barrera” en un individuo son aquellas células, secreciones y matrices que impiden la translocación de antígenos ambientales a procesos sistémicos. Las estructuras superficiales de barrera se encuentran en el ojo, oído, piel, intestino, vías respiratorias, tracto reproductivo y tracto urinario. SIgA es una inmunoglobulina antiinflamatoria secretada desde estas estructuras de barrera a la superficie del entorno o al medio asociado (por ejemplo, contenido de lumen intestinal y orina). Las investigaciones muestran que la disfunción en una estructura superficial de barrera puede inducir inflamación en otra debido a la translocación de antígenos y/o interacción inmunitaria en otra estructura superficial de barrera.

En un aspecto de la invención, se proporciona una composición de IgA secretora formulada para la administración oral que comprende una cantidad antiinflamatoria de IgA secretora para el uso en un método para prevenir y/o tratar la inflamación en una estructura superficial de barrera en un individuo que lo necesita, comprendiendo dicho método la administración oral de la composición al individuo, en donde la IgA secretora es aislada del líquido luminal intestinal o de la mucosa intestinal de un animal, preferentemente un animal que ha sido expuesto a una variedad de antígenos, o del líquido luminal intestinal o de la mucosa intestinal de un cerdo, una oveja, un pollo, un pavo o una vaca, y en donde la inflamación en una estructura superficial de barrera es dermatitis.

También se describe un método para prevenir y/o tratar la inflamación en una estructura superficial de barrera en un individuo que lo necesita, que comprende la administración por vía oral al individuo de una cantidad antiinflamatoria de IgA secretora. La SIgA puede administrarse directamente a la estructura superficial de la barrera intestinal, protegiendo así la estructura superficial de la barrera intestinal u otra estructura superficial de barrera (por ejemplo, la piel). La IgA secretora se puede administrar oralmente como una composición farmacéutica o como una composición alimenticia.

Como se utiliza en la presente invención, el término individuo incluye a seres humanos y animales, incluyendo mamíferos no humanos y especies no mamíferas. Los mamíferos no humanos que pueden mencionarse a modo de ejemplo incluyen perros, gatos, ratones y ratas, incluyendo animales de laboratorio, primates no humanos, cerdos, ovejas, ganado, y caballos. Las especies no mamíferas que pueden mencionarse a modo de ejemplo incluyen pollos, pavos y patos que tienen dermatitis, así como anfibios y peces con enfermedad cutánea ulcerosa.

Como se utiliza en la presente invención, la expresión cantidad antiinflamatoria significa una cantidad de SIgA administrada oralmente que puede prevenir y/o reducir la inflamación de una estructura superficial de barrera en la especie objetivo. La expresión prevenir la inflamación significa reducir la incidencia de al menos un síntoma de un trastorno inflamatorio caracterizado por la inflamación de una estructura superficial de barrera en un individuo en riesgo de desarrollar el trastorno inflamatorio, es decir, un individuo que no evidencia todos los síntomas del trastorno inflamatorio en el momento de la administración de SIgA. Por ejemplo, un individuo puede presentar rasguños sin más evidencia de trastornos inflamatorios. Tras el tratamiento con SIgA, el individuo mostrará alivio de la peor evidencia de prurito (picor) y se evitarían las peores consecuencias, como el autotraumatismo y la dermatitis ulcerosa. En un aspecto, un animal con riesgo de desarrollar un trastorno inflamatorio caracterizado por la inflamación de una estructura superficial de barrera junto con prurito es un ratón de laboratorio con fondo C57BL/6, o un perro o gato que es propenso a desarrollar parches calientes. Debido a que se sabe que los ratones de laboratorio con fondo C57BL/6 y los perros/gatos propensos a los parches calientes son extremadamente susceptibles a la inflamación de la superficie de barrera, el tratamiento de tales animales en ausencia de signos visibles de inflamación puede estar justificado para prevenir futuros brotes inflamatorios. El término “tratar” o “reducir” la inflamación significa una reducción visible y/o mensurable en al menos un síntoma del trastorno inflamatorio caracterizado por la inflamación de una estructura superficial de barrera. Por ejemplo, para un individuo con dermatitis ulcerosa, una reducción en los síntomas significa una disminución de la gravedad y/o frecuencia de las lesiones ulcerosas y/o prurito.

Las cantidades antiinflamatorias de IgA secretora pueden ser determinadas por una persona con conocimientos normales de la técnica. Los ejemplos de las cantidades son de 0,01 a 25 g/kg de alimento, específicamente de 1 a 10 g/kg de alimento o de 1 a 1000 mg/kg de peso corporal.

Los trastornos inflamatorios son afecciones que involucran inflamación que puede afectar muchas estructuras superficiales de barrera del cuerpo. Los trastornos inflamatorios caracterizados por la inflamación de una estructura superficial de barrera incluyen dermatitis; trastornos caracterizados por inflamación gastrointestinal tales como enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn; y gastroenteritis linfocítica o eosinófila; trastornos inflamatorios oculares; y trastornos inflamatorios de las vías respiratorias como el asma y la alergia.

La dermatitis, una inflamación de la piel, mientras que la dermatitis crónica es dermatitis persistente con síntomas que generalmente duran semanas, meses o años. La dermatitis crónica incluye dermatitis atópica (también llamada eccema atópico), dermatitis actínica crónica, dermatitis ulcerosa, dermatitis alérgica por contacto, dermatitis irritante por contacto, y psoriasis. En un aspecto, el individuo con dermatitis sufre de lesiones cutáneas resistentes a la cicatrización.

La dermatitis atópica es un trastorno cutáneo inflamatorio prurítico que afecta a niños y adultos humanos, así como a animales. La dermatitis atópica conduce al rascado, enrojecimiento, piel escamosa, protuberancias elevadas,

erupciones cutáneas, y lesiones abiertas. En los seres humanos, la dermatitis atópica a menudo aparece en los brazos, las manos, los pies, la parte superior del pecho y detrás de las rodillas, aunque puede aparecer en otros lugares. La dermatitis atópica en los seres humanos a menudo aparece en la infancia y persiste durante la edad adulta. Un problema grave en pacientes con dermatitis atópica es que rascarse la erupción puede conducir a la ruptura de la barrera cutánea, permitiendo infecciones bacterianas tal como *Staphylococcus aureus*. Los tratamientos para la dermatitis atópica incluyen esteroides tópicos, inmunosupresores tópicos (por ejemplo, tacrolimus y compuestos similares), antihistamínicos y antibióticos para tratar infecciones.

El eccema del lactante es un tipo de dermatitis atópica que se presenta en los lactantes. En algunos casos, el eccema del lactante continúa durante la infancia, la adolescencia y la edad adulta. El eccema del lactante se caracteriza generalmente por una erupción seca con picazón en la cara y el cuero cabelludo. Los niños con eccema del lactante tienen una alta sensibilidad a la picazón y tienen un mayor riesgo de desarrollar otras afecciones inflamatorias tales como asma y alergias.

La dermatitis atópica también es problemática en animales, particularmente perros y gatos. La dermatitis atópica generalmente comienza en los perros a partir de los 1-3 años de edad y, aunque prevalece en ciertas razas, puede afectar a cualquier raza de perros y perros de raza mixta. Se estima que la dermatitis atópica afecta al 10% de los perros. El trastorno se evidencia por picazón, lamido y frotamiento facial, incluyendo lamido de las patas. Los "parches calientes" son áreas localizadas de lesiones cutáneas rojas, húmedas, calientes e irritadas. Clínicamente, las lesiones parecen ser el resultado de un autotraumatismo. El autotraumatismo extremo en el lugar afectado puede conducir a infecciones de la piel, requiriendo tratamiento con antibióticos. El tratamiento estándar actual para los parches calientes es la prednisona oral, sin embargo, muchos perros son intolerantes a la prednisona. Además, el tratamiento con prednisona en perros puede llevar a sed excesiva, micción excesiva, diarrea y fluctuaciones de peso. En una forma de realización, el individuo es un perro con intolerancia a la prednisona o un perro para el cual la prednisona está contraindicada debido a sus efectos secundarios. En otro aspecto, el perro es coadministrado con una medicación que es incompatible con la administración de esteroides. Por ejemplo, los medicamentos corticosteroides como la prednisona no se pueden administrar conjuntamente con medicamentos antiinflamatorios no esteroides (AINE) como el carprofeno o el meloxicam porque los corticosteroides aumentan enormemente el riesgo de hemorragia gastrointestinal debido a los AINE.

La dermatitis actínica crónica, conocida como dermatitis de fotosensibilidad o síndrome reticuloide actínico (PD/AR), es una afección en la que la piel se inflama, particularmente en áreas que han estado expuestas a la luz solar o a la luz artificial. La dermatitis actínica crónica se encuentra generalmente en hombres mayores de 50 años, pero también pueden verse afectadas las mujeres y los individuos más jóvenes. El diagnóstico de la dermatitis actínica crónica puede ser difícil porque las longitudes de onda de la luz involucrada no causan quemaduras solares, por lo que los individuos pueden tener problemas en los días nublados y a través de la ropa y las ventanas. Los tratamientos tópicos como los esteroides tópicos son los tratamientos actuales para este trastorno.

La dermatitis ulcerosa es una forma grave de dermatitis atópica caracterizada por lesiones cutáneas ulcerosas. Se ha observado que la DU es un problema en ratones de laboratorio, en particular en ratones con fondo C57BL/6 (B6), lo que puede derivar en la eutanasia de los animales afectados, debido al agrandamiento de la úlcera estable o a un auto-traumatismo extremo en las zonas afectadas. En un aspecto, el individuo es un ratón de laboratorio con un fondo C57BL/6. En otros aspectos, el individuo es un gato con dermatitis ulcerosa felina, un pavo con dermatitis ulcerosa focal, un pollo con dermatitis gangrenosa, un cerdo con dermatitis ulcerosa porcina, dermatitis ulcerosa en reptiles, y peces y ranas como las ranas *Xenopus*.

Tanto la dermatitis alérgica como la irritante por contacto son afecciones en las que la piel se enrojece, duele, pica y/o se inflama después del contacto con una sustancia. La dermatitis alérgica por contacto se produce cuando la piel entra en contacto con una sustancia a la que el individuo se ha vuelto especialmente sensible. Los alérgenos que pueden mencionarse a modo de ejemplo, incluyen telas o ropa, adhesivos, níquel u otros metales, plantas venenosas y látex. La dermatitis por contacto irritante generalmente es causada por el contacto con jabones y detergentes, jabones y suavizantes de ropa, disolventes y otros productos químicos. La dermatitis por contacto irritante puede parecer una quemadura.

Los trastornos inflamatorios caracterizados por la inflamación de una estructura de la superficie de barrera pueden caracterizarse adicionalmente por la inflamación gastrointestinal crónica tal como la enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un término general para la inflamación crónica de todo o parte del tracto digestivo. La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son las formas más comunes de EII en los seres humanos. La EII también se encuentra en animales domésticos tales como perros y gatos, y animales de granja (por ejemplo, ganado, ovejas, pollos, pavos, patos, especies de peces y caballos), y se caracteriza generalmente por diarrea y/o vómitos.

La colitis ulcerosa es la inflamación crónica del colon, incluyendo enterocolitis necrotizante en recién nacidos. Las úlceras se forman donde la inflamación ha matado las células que recubren el colon. La colitis ulcerosa puede

presentarse en niños, pero generalmente comienza entre los 15 y 30 años de edad. Los síntomas más comunes son dolor abdominal y diarrea sanguinolenta. Se desconoce la causa de la colitis ulcerosa.

La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria intestinal que causa inflamación del revestimiento del tubo digestivo, lo que provoca dolor abdominal, diarrea grave y, en casos extremos, desnutrición. La inflamación puede penetrar profundamente en el tejido. No existe una cura conocida para la enfermedad de Crohn, y se trata comúnmente con antiinflamatorios y supresores del sistema inmunitario, por ejemplo.

Se ha demostrado en ratones SCD<sup>-/-</sup> que puede utilizarse SIgA administrada por vía oral para tratar el prurito subyacente, previniendo la aparición de dermatitis ulcerosa. Otras poblaciones donde está indicada la prevención de trastornos inflamatorios son los individuos con deficiencia de IgA sérica y los individuos con alergias, especialmente los seres humanos con alergias al gluten, también llamadas sensibilidad al gluten. La deficiencia selectiva de IgA es la más común de las inmunodeficiencias primarias. Se define como la ausencia total o deficiencia severa de IgA. Los niveles séricos en la sangre para personas con deficiencia de IgA suelen ser de 7 mg/dl o menos, mientras que la IgA sérica en adultos normales se encuentra entre 90 y 450 mg/dl. El trastorno se llama "selectivo" porque otras inmunoglobulinas séricas, tales como IgM e IgG, están presentes en niveles normales o incluso elevados. Las infecciones recurrentes, las alergias tales como el asma y las alergias alimentarias, y las enfermedades autoinmunitarias son comunes en individuos con deficiencia selectiva de IgA en suero. Los seres humanos con una enfermedad autoinmunitaria son otra población para la cual se espera que SIgA administrada oralmente sea beneficiosa.

La SIgA utilizada en los métodos descritos en la presente invención puede ser SIgA aislada y/o pura. La SIgA puede aislarse de seres humanos o animales que han estado expuestos a diversos antígenos. La SIgA aislada o pura puede ser aislada o purificada del líquido luminal intestinal o de la mucosa intestinal de un cerdo o una vaca, oveja, pollo, pavo, caballo, o un humano (por ejemplo, de un cadáver humano o del contenido intestinal de un donante humano vivo).

Como se utiliza en la presente invención, el líquido luminal intestinal es el líquido 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 líquido luminal intestinal varía según la dieta, el estado de alimentación/ayuno y el estado de enfermedad del organismo. El líquido luminal intestinal contiene, por ejemplo, lípidos; proteínas incluyendo SIgA; bacterias; iones tales como sodio, potasio y calcio; y materiales sólidos no digeridos. La SIgA puede ser purificada hasta una pureza de aproximadamente el 98% del líquido luminal intestinal.

También como se utiliza en la presente invención, la mucosa intestinal se refiere a la pared interior (revestimiento luminal) del intestino. El intestino incluye una pared exterior llamada serosa, capas musculares medias y un interior llamado mucosa.

Como se utiliza en la presente invención, el término proteína "aislada" incluye moléculas de proteína que están separadas de al menos una fracción de las otras moléculas proteicas o no proteicas presentes en la fuente natural de la proteína. Una proteína aislada está libre de una cantidad sustancial del material celular u otros polipéptidos contaminantes de la fuente de células, tejidos o fluidos corporales de los que se deriva la proteína. La SIgA aislada puede tener una concentración de SIgA dos veces la concentración en el material de origen, es decir, dos veces la concentración de SIgA en la mucosa intestinal de origen o en el líquido luminal. En otras formas de realización, la SIgA aislada tiene una concentración tres, cuatro, cinco, diez o más veces superior a la concentración en la mucosa intestinal de origen.

En una forma de realización, la IgA secretora de uso en la invención es aislada de una fuente que es mucosa intestinal de un cerdo o de 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, en donde el material de origen es la mucosa intestinal seca, una preparación acuosa de la mucosa intestinal, o una preparación seca de proteínas preparadas a partir de la mucosa intestinal.

En una forma de realización, una preparación de SIgA aislada de uso en la invención es una preparación seca obtenida de la mucosa intestinal, en donde 5% o más del material proteínico en la SIgA aislada comprende IgA. Sin estar sujetos a la teoría, se cree que hay 5-10 g de SIgA por cada 100 g de proteína de la mucosa. En otras formas de realización, más del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95% del material proteínico en la SIgA aislada de uso en la invención comprende IgA.

El término pura con referencia a SIgA significa que la SIgA es aislada y que los componentes de SIgA (IgA y componentes secretorios) 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 líquido luminal intestinal.

En una forma de realización, la preparación de SIgA pura de uso en la invención es pasteurizada. La pasteurización consiste en un proceso de calentamiento de un líquido hasta una temperatura específica durante un período de tiempo definido y luego la refrigeración del líquido de forma sustancial e inmediata. El objetivo de la pasteurización es reducir el número de patógenos viables en un líquido. Los ejemplos de las condiciones 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 la presente invención, la pasteurización de la SIgA aislada de la mucosa intestinal de cerdo puede ser importante en el uso de los preparados de SIgA para aumentar la eficiencia del alimento en pollitos. En una forma de realización, la composición de SIgA pura de uso en la invención tiene actividad de unión a lipopolisacárido (LPS) de IgA secretora. Un ELISA indirecto puede demostrar la actividad de unión a LPS. En un ELISA indirecto, el LPS se recubre en una placa de microtitulación. Se agrega ya sea SIgA intestinal o IgA sérica (un control) en varias diluciones al LPS unido en la placa de microtitulación. Después de retirar la SIgA no unida mediante lavado, se detecta la cantidad de SIgA que se une al LPS unido a la placa mediante un anticuerpo anti-IgA conjugado con una enzima como peroxidasa de rábano picante más sustrato.

En una forma de realización, la SIgA pura, pasteurizada de uso en la invención está en forma de una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un ejemplo de proceso para purificar una composición de SIgA comprende el tratamiento del líquido luminal intestinal de un cerdo o vaca con polietilenglicol con un peso molecular de 3000 a 30.000, y el aislamiento de la SIgA precipitada. En este ejemplo, la SIgA es enriquecida al menos dos veces en comparación con la concentración de SIgA en el líquido luminal intestinal. En otro ejemplo, el método comprende además la resuspensión de la SIgA precipitada en una solución de polietilenglicol con un peso molecular de 3000 a 30.000 para producir SIgA re-precipitada, y el aislamiento de la SIgA re-precipitada. La resuspensión y la precipitación se pueden repetir hasta que se produzca una composición de SIgA pura como se describe en la presente invención.

En un ejemplo, la composición de SIgA precipitada se pasteuriza como se describe anteriormente.

La SIgA pura precipitada puede ser sometida a tratamientos adicionales/etapas de purificación, tales como esterilización por filtración, precipitaciones usando etanol helado (inferior a 0°C para disolver el PEG y dejar sólo la proteína pura), desalado. Otros procedimientos de purificación tales como las precipitaciones con sulfato de sodio y gamma carragenina y cromatografía de exclusión por tamaño.

En una forma de realización, la SIgA pura o aislada de uso en la invención es preparada de la mucosa intestinal de un cerdo o una vaca. Un ejemplo de proceso para la preparación de dicha SIgA pura o aislada incluye la lisis de la mucosa intestinal, la eliminación de residuos mediante centrifugación, por ejemplo, y luego las proteínas en el sobrenadante son precipitadas secuencialmente usando diversas concentraciones de polietilenglicol (3,5-15% p/v) con un peso molecular de 3000 a 30.000, de manera que la SIgA será aislada de otras proteínas en la preparación de la mucosa.

Si bien la mucosa intestinal de cerdo ha sido utilizada anteriormente como fuente de aminoácidos en los alimentos para animales, se hidrolizó la mucosa intestinal para reducir las proteínas constituyentes a aminoácidos o se estabilizó para reducir el crecimiento microbiano. Al reducir la proteína a aminoácidos o incluso a péptidos pequeños se destruye la bioactividad de SIgA en la mucosa. La estabilización de la mucosa mediante agentes desnaturizantes como ácido (por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido fosfórico) o bisulfito sódico puede desnaturizar la bioactividad de SIgA. La mucosa intestinal de cerdo, pollo, pavo, oveja o vaca, seca, sin hidrolizar y sin estabilizar, es una fuente útil de SIgA funcional. Como se utiliza en la presente invención, la expresión "sin hidrolizar" significa que una preparación no ha sido tratada con enzimas, calor (superior a 90°C) o productos químicos en condiciones que se espera que reduzcan las proteínas constituyentes a aminoácidos. Como se utiliza en la presente invención, la expresión "sin estabilizar" significa que no se han utilizado aditivos químicos, en concentraciones que inhiben la bioactividad de SIgA, para inhibir el crecimiento microbiano.

La mucosa intestinal seca puede ser liofilizada, secada en tambor o secada por pulverización.

En una forma de realización, la composición de SIgA de uso en la invención es una composición alimenticia. Por ejemplo, se espera que una concentración de SIgA superior a 0,1 mg/Kg de alimento animal o humano basal produzca resultados beneficiosos.

La expresión "composición alimenticia basal" se refiere a una composición alimenticia combinable con aditivos tales como las composiciones de SIgA descritas en la presente invención. Las composiciones alimenticias basales pueden ser adecuadas para la ingestión por un humano o un animal. Los ejemplos de composiciones alimenticias adecuadas para la ingestión por un humano incluyen una fórmula nutricionalmente completa, un producto lácteo, una bebida refrigerada o a temperatura ambiente, una sopa, un suplemento dietético como una vitamina, un sustituto de la comida, una barra nutricional, dulces u otra composición alimenticia.

La expresión "composición alimenticia basal para animales" se refiere a un alimento para animales combinable con aditivos tales como las composiciones de SIgA descritas en la presente invención. Las composiciones alimenticias

basales pueden incluir componentes tales como proteínas, granos, composiciones de sabor, vitaminas, minerales, conservantes, y similares. En formas de realización específicas, la composición alimenticia basal para animales es para un animal aviar, porcino, bovino, ovino, cabra, pez, reptil, molusco, invertebrado, caballo, perro o gato.

5 En una forma de realización, la IgA secretora de uso en la invención está en forma de una composición de IgA pura, secretora opcionalmente pasteurizada aislada del líquido luminal intestinal de un cerdo. En una forma de realización específica, la composición de IgA secretora pura, pasteurizada de uso en la invención comprende más de 0,1 mg/ Kg de composición alimenticia basal.

10 También se describe en la presente invención una composición alimenticia basal para animales tal como un perro o un gato en donde la composición alimenticia para animales incluye una cantidad antiinflamatoria de SIgA.

Se puede agregar la SIgA a una composición alimenticia basal en forma de mucosa intestinal seca de un cerdo o una vaca, en donde la mucosa intestinal seca no se hidroliza. En algunos casos, la concentración es de 1 mg/Kg a 10 gramos/Kg de la mucosa intestinal seca a la composición alimenticia basal para animales. En un caso específico, la  
15 composición alimenticia basal es para un perro o un gato y en donde la composición alimenticia para animales tiene eficacia antiinflamatoria.

También se describe un aditivo alimentario para perros o gatos que comprende un excipiente e IgA secretora.

20 También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden SIgA pura, pasteurizada y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en la presente invención, "composición farmacéutica" significa cantidades terapéuticamente eficaces del compuesto junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tales como diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, y adyuvantes. Como se utiliza en la presente invención,  
25 los "excipientes farmacéuticamente aceptables" son bien conocidos por los expertos en la técnica.

La invención es ilustrada adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

## 30 EJEMPLOS

### Métodos

#### Modelo Murino para Dermatitis Ulcerosa

35 La dermatitis ulcerosa afecta a ratones de laboratorio con un fondo C57BL/6J (B6), causando escoriación de la cara, oídos o piel cervicotorácica dorsal, acompañada de prurito. Ratones SCD1<sup>-/-</sup>, carentes de esteroil-Co-A desaturasa-1, tienen expresión reducida de genes que codifican enzimas utilizadas para sintetizar lípidos y expresión aumentada de genes que codifican enzimas que oxidan ácidos grasos. Se ha demostrado (Krugner-Higby et al., Ulcerative  
40 Dermatitis in C57BL/6 Mice lacking Stearoyl CoA Desaturase I, Comparative Medicine, 62, pp. 257-263 (2012)) que los ratones SCD1<sup>-/-</sup> alimentados con una dieta semipurificada basada en NIH AIN76A desarrollan úlceras cutáneas y pueden ser utilizados como modelo de dermatitis ulcerosa. Las dietas semipurificadas son derivadas de componentes de una sola fuente para que la fuente de lípidos, proteínas o carbohidratos pueda cambiarse variando un solo componente.

45 La dieta basada en NIH AIN76A incluye aceite de maíz como fuente de lípidos, caseína como fuente de proteínas, y sacarosa y almidón de maíz como principales fuentes de carbohidratos. La composición de AIN76A es proporcionada en la Tabla 1:

Tabla 1: Composición de la dieta basada en NIH AIN76A

Componente	g/kg
Caseína	200,0
DL-metionina	3,0
Sacarosa	499,99
Almidón de maíz	150,0
Aceite de maíz	50,0
Celulosa	50,0
Mezcla de minerales, AIN-76	35,0
Mezcla de vitaminas, AIN-76A	10,0



(continuación)

Componente	g/kg
Bitartrato de colina	2,0
Etoxiquina (antioxidante)	0,01

Los ratones de control son ratones de tipo salvaje con SCD funcional que, cuando se cambian a la dieta AIN, rara vez desarrollan DU.

Como se informó en Krugner-Higby, todos los ratones SCD1<sup>-/-</sup> con la dieta NIH AIN76A desarrollan lesiones cutáneas espontáneamente dentro de las 4 semanas de inicio de la dieta NIH AIN76A, mientras que pocos o ningún ratón de tipo salvaje alimentado con la dieta AIN desarrollan lesiones cutáneas. La dermatitis ulcerosa incluye ulceración sobre el cuello o el dorso, con formación de costras, escaras o supuración. Los ratones también tenían prurito, con autotraumatismo y ocasional cojera.

#### Preparación de mucosa intestinal porcina cruda

Se homogeniza la mucosa con hasta un 50% (del volumen total) de agua para diluir el material y favorecer la lisis celular. Luego se puede filtrar la mucosa utilizando un filtro de 800µm y/o se puede centrifugar a 4000 x g durante 10 minutos. Se homogeniza la mucosa utilizando un homogeneizador de lácteos estándar de dos etapas a una presión final de 13789,51 kPa (2000 psi). Se pasteuriza la mucosa 71,1°C (160°F) durante 20 segundos. Se seca la mucosa por pulverización a 13789,51 kPa (2000 psi) y 176,66°C (350°F) en un secador por pulverización estándar (4 pisos de altura). Se prueba el material para determinar la actividad mediante ELISA(s) (descrito a continuación).

#### Preparación de IgA intestinal porcina purificada

Se recolectó líquido luminal de cerdos sacrificados comercialmente. Se combinó el líquido luminal con 3,5% de PEG 8000 p/v (polietilenglicol con un peso molecular de 6000-8000) y se centrifugó a 14.000 x g, 4°C durante 10 minutos. Se recogió el líquido clarificado y se filtró a través de lana de vidrio para eliminar cualquier resto de grasas. Se combinó el líquido clarificado con 8,5% de PEG 8000 p/v y se centrifugó a 14.000 x g, 4°C durante 10 minutos. Se vertió el sobrenadante separándolo y se resuspendió el pellet dentro del tubo en 12% PEG 8000 p/v en agua desionizada. Se centrifugó la mezcla a 14.000 x g, 4°C durante 10 minutos. Se vertió el sobrenadante separándolo y se congeló el pellet restante a -80°C y luego se liofilizó.

La pureza del pellet y la actividad de la mucosa se determinaron mediante ELISA. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos con anticuerpo de cabra anti-IgA porcina (120µL) de Bethyl Laboratories (Montgomery TX) disueltos en amortiguador de recubrimiento (1,59g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,93g de NaHCO<sub>3</sub>, 0,2g de NaN<sub>3</sub>, pH 9,6, volumen total de 1000mL) durante la noche para permitir la unión del anticuerpo a la placa Nunc Maxisorp® F (Thermo-Fisher Scientific, Rochester NY). Se bloquearon las placas con amortiguador de bloqueo libre de proteína (Pierce, Rockford IL) durante 1 hora. Se lavaron las placas 3 veces con PBS-0,05% Tween (Fisher-Scientific, Pittsburgh PA). Se agregaron muestras a la placa en diluciones de 10 veces de 1:10-1:1.000.000.000 durante 1 hora para determinar la cantidad de IgA presente. Se proporcionó suero de referencia de cerdo como control. Se lavaron las placas 3 veces con PBS-0,05% Tween. Se agregó anticuerpo secundario de cabra anti-IgA porcina (Bethyl Laboratories, Montgomery TX) en amortiguador de bloqueo (5µL 2° anticuerpo: 12,5mL de amortiguador de bloqueo) durante 30 minutos. Se lavaron las placas 6 veces con amortiguador de lavado. Se agregó sustrato en amortiguador de sustrato (dietanolamina 97 mL, 100 mg de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 g de NaN<sub>3</sub>, 800mL de ddH<sub>2</sub>O, pH 9,8), se incubó durante 15 minutos, y se leyó a 450nm.

Pureza de IgA: El líquido luminal (líquido recogido del interior del tracto intestinal a través de una serie de rodillos que expresan el contenido intestinal sin alterar el recubrimiento de la mucosa) demostró una pureza superior al 90% después de la purificación. Hubo entre 193 y 199 mg de IgA/200mg del producto total.

Se utilizó pasteurización para eliminar bacterias vivas de las preparaciones de IgA. Un pasteurizador de grado comercial de la planta piloto de productos lácteos de la Universidad de Wisconsin-Madison calentó el líquido luminal que contenía IgA a 71,1°C (160°F) durante 20 segundos, y luego el material se enfrió rápidamente. Casi no hubo pérdida en la cantidad de IgA ni disminución en la actividad de unión a antígeno de la IgA después de la pasteurización.

Ejemplo 1: Desarrollo de una sIgA murina de captura con el fin de cuantificar sIgA de lumen intestinal de ratón: Especificidad de los anticuerpos anti-IgA de ratón

Brevemente, la IgA murina fue adquirida en (Bethyl Laboratories, Montgomery TX) y se emulsionó con el adyuvante completo de Freund y se inyectó en gallinas ponedoras. Las gallinas tuvieron una semana para recuperarse de la vacunación. Se emulsionó la IgA murina comercial con el adyuvante incompleto de Freund y se inyectó en las mismas gallinas ponedoras siete días después. Las gallinas fueron monitoreadas para la producción anti IgA murina. Una vez

verificada la producción con un ELISA, se purificaron anticuerpos de huevo anti-IgA murina utilizando el mismo procedimiento de PEG que se utilizó para purificar SIgA porcina. Luego, se conjugaron los anticuerpos anti-IgA murina con peroxidasa de rábano picante (HRP). Se combinaron 3 mg del anticuerpo anti-SIgA murina purificado con 3 mg de HRP (Sigma®) y luego se agregaron 40 µL de glutaraldehído al 1% durante 3 horas. La reacción se detuvo agregando 20 mg de glicina e incubando durante una hora a 21°C. Se dializó la mezcla durante la noche contra PBS (solución salina amortiguada con fosfato).

Se probó la especificidad de los anticuerpos anti-SIgA murina mediante un ELISA. Se disolvió la IgA murina en amortiguador de recubrimiento (1,59 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,93 g de NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 g de NaN<sub>3</sub>, pH 9,6, volumen total de 1000 mL), y se pipeteó en placas Nunc Maxisorp® F (Thermo-Fisher Scientific, Rochester NY) durante toda la noche para permitir la fijación de la IgA murina a las placas. Se bloquearon las placas con amortiguador de bloqueo libre de proteína (Pierce, Rockford IL) durante 1 hora. Se lavaron las placas tres veces con PBS-0,05% Tween (Fisher-Scientific, Pittsburgh PA). A continuación, se analizaron las placas utilizando uno de los tres tratamientos siguientes: 1) anticuerpos de huevo anti-IgA murina marcados con HRP (HRP), 2) anticuerpos de huevo anti-IgA murina marcados con HRP y sin marcar (HRP con competencia), y 3) anticuerpos de huevo control o no específicos y anticuerpos de huevo anti-IgA murina marcados con HRP (HRP con anticuerpo control). Se agregaron los tres tratamientos de anticuerpos a las placas en diluciones de 10 veces de 1:10-1:1.000.000.000 para determinar la cantidad de IgA murina presente. Se incubaron las placas a 21°C durante 1 hora. Luego, se lavaron las placas tres veces con PBS-0,05% Tween. Se lavaron las placas 6 veces con amortiguador de lavado. Se agregó HRP-sustrato (peróxido de hidrógeno) en amortiguador de sustrato (dietanolamina 97 mL, 100 mg de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 g de NaN<sub>3</sub>, 800 mL de ddH<sub>2</sub>O, pH 9,8), se incubó durante 15 minutos, y se leyeron las placas a 450 nm. Como se muestra en la Figura 1, hubo significativamente más unión a IgA murina medida para el anticuerpo de huevo anti-IgA murina conjugada a HRP (grupo 1) y anticuerpo de huevo anti-IgA murina conjugada a HRP más grupos de anticuerpos control de huevo no específicos (grupo 3) que con el anticuerpo de huevo anti-IgA murina conjugado a HRP y no conjugado (grupo 2). Este resultado demuestra que el anticuerpo de huevo anti IgA murina se une al sustrato de IgA murina y puede ser superado por un anticuerpo de huevo anti- IgA murina no marcado, pero no por un anticuerpo de huevo no específico de control. El anticuerpo de huevo anti-IgA murina que se ha fabricado es específico para el sustrato de IgA murina y se puede utilizar en un ELISA de captura para cuantificar SIgA luminal de ratón (véase el Ejemplo 2).

#### Ejemplo 2: IgA secretora luminal inicial en ratones control y SCD1<sup>-/-</sup>

Se examinaron ratones SCD1<sup>-/-</sup> y control C57BL/6 para determinar el contenido de IgA secretora de su líquido luminal. En cada grupo, tres ratones fueron sacrificados mediante eutanasia y se extrajo el líquido luminal. Se utilizó un ELISA de captura para detectar IgA murina en el líquido luminal extraído. Se disolvió un anticuerpo de huevo anti-IgA murina sin marcar del Ejemplo 1 en amortiguador de recubrimiento (1,59 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,93 g de NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 g de NaN<sub>3</sub>, 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). Se bloquearon las placas con amortiguador de bloqueo libre de proteína (Pierce, Rockford IL) durante 1 hora. Se lavaron las placas tres veces con PBS-0,05% Tween (Fisher-Scientific, Pittsburgh PA). Se agregaron muestras de líquido luminal de seis ratones diferentes (3 SCD1<sup>-/-</sup> y 3 control) a la placa en diluciones de 10 veces de 1:10-1:1.000.000.000 para determinar la cantidad de IgA presente. Se incubaron las placas a 21°C durante 1 hora. Se lavaron las placas 3 veces con PBS-0,05% Tween. Se agregó anticuerpo de huevo de gallina anti-IgA murina marcado con HRP en amortiguador de bloqueo (5 µL 2° anticuerpo: 12,5 mL de amortiguador de bloqueo) durante 60 minutos. Se lavaron las placas 6 veces con amortiguador de lavado. Luego se agregó sustrato en amortiguador de sustrato (dietanolamina 97 mL, 100 mg de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 g de NaN<sub>3</sub>, 800 mL de ddH<sub>2</sub>O, pH 9,8), se incubó durante 15 minutos, y se leyeron las placas a 450 nm. Como se muestra en la Figura 2, la IgA secretora luminal basal en los ratones SCD1<sup>-/-</sup> fue 500 veces mayor que en los ratones control.

Dada la mayor concentración de IgA secretora en los ratones SCD1<sup>-/-</sup>, no se esperaría que agregar IgA secretora adicional tendría un efecto significativo sobre la dermatitis ulcerosa en ratones alimentados con la dieta NIH AIN76A. Sin embargo, sin estar sujetos a la teoría, también es posible que los ratones SCD1<sup>-/-</sup> tengan una reacción excesiva al cambio en la dieta, dando como resultado el aumento en IgA secretora.

Además, la histología de los intestinos de los ratones modelo de dermatitis ulcerosa muestra un aumento de la inflamación y disminución del espesor submucoso y muscular en el duodeno (datos no mostrados). Sin estar sujetos a la teoría, se cree que el aumento de IgA en los intestinos de los ratones con dermatitis ulcerosa se debe al aumento de IgA secretora en los intestinos.

#### Ejemplo 3: Evaluación de la administración oral de mucosa intestinal porcina cruda como prevención y tratamiento de la dermatitis ulcerosa

Sin estar sujetos a la teoría, se cree que los antígenos (por ejemplo, dietarios, microbianos o caseína) inician la respuesta de la dermatitis ulcerosa en los ratones SCD1<sup>-/-</sup> con la dieta de NIH AIN76A

Se utilizaron seis ratones en el grupo control y en el grupo de prueba alimentado con mucosa intestinal porcina cruda. En el grupo control hubo cinco ratones sin evidencia alguna de dermatitis ulcerosa, y un ratón control con dermatitis

ulcerosa. En el grupo de prueba, hubo cinco ratones sin evidencia alguna de dermatitis ulcerosa, y un ratón con dermatitis ulcerosa. Los ratones control fueron alimentados con la dieta NIH AIN76A suplementada con PBS acidificada (solución salina amortiguada con fosfato) y los ratones de prueba fueron alimentados con la dieta NIH AIN76A suplementada con 1 g/kg de mucosa oral porcina cruda en PBS acidificada. Los ratones fueron monitoreados diariamente y pesados semanalmente.

En la Tabla 2 se muestran los efectos de la mucosa intestinal porcina cruda administrada oralmente en la prevención y el tratamiento de la dermatitis ulcerosa.

Tabla 2: Efecto de la mucosa intestinal porcina cruda sobre la dermatitis ulcerosa

Tiempo	Tratamiento	Número de ratones con dermatitis ulcerosa
Inicio del tratamiento- ratones con dermatitis ulcerosa (1 por grupo)	Dieta de control	1/1
	Dieta de prueba	1/1
Después de un mes de tratamiento/ratones con dermatitis ulcerosa (1 por grupo)	Dieta de control	Dermatitis ulcerosa grave por inspección visual de lesiones.
	Dieta de prueba	Mejora significativa de las lesiones ulcerosas mediante inspección visual.
Después de un mes de tratamiento/ratones sin evidencia alguna de dermatitis ulcerosa (5 por grupo)	Dieta de control	4/5
	Dieta de prueba	2/5

Como se puede observar en la Tabla 2, el ratón con dermatitis ulcerosa que se alimentó con la dieta de control se deterioró mucho durante el estudio de 4 semanas. El ratón con dermatitis ulcerosa alimentado con la dieta de prueba mejoró mucho durante el estudio de 4 semanas. Este resultado sugiere que la mucosa intestinal porcina cruda puede revertir la dermatitis ulcerosa en el modelo de ratón.

Como se puede observar en la Tabla 2, de los ratones sin dermatitis ulcerosa al comienzo del estudio de 4 semanas, 4/5 ratones con la dieta de control desarrollaron dermatitis ulcerosa, en comparación con 2/5 ratones con la dieta de prueba. Por lo tanto, la mucosa intestinal porcina cruda puede prevenir la dermatitis ulcerosa en el modelo de ratón.

Se determinó también la dermatitis ulcerosa cuantitativamente utilizando el siguiente sistema de puntuación:

1. Menos del 10% de la piel está abierta (en carne viva) sin llagas profundas o abiertas.
2. Menos del 20% de la piel está abierta (en carne viva) con una o menos llagas abiertas, o si hay más del 20% de piel en carne viva sin llagas abiertas.
3. Menos del 30% de la piel está en carne viva, con 2 o menos llagas abiertas.
4. Menos del 40% de la piel está en carne viva con 3 o menos llagas abiertas; los animales son sacrificados si permanecen en este nivel.

Como se muestra en la Figura 3, los ratones SCD1<sup>-/-</sup> con dermatitis ulcerosa que consumían mucosa intestinal porcina cruda fueron monitoreados diariamente para determinar la puntuación de DU. Los datos presentados son un promedio de la puntuación de DU total semanal/número de días/ número de animales. Hay una disminución significativa en la puntuación de DU con los ratones que consumían mucosa intestinal porcina cruda. \* = P<0,05.

También se cuantificó el rascado en los ratones control y los ratones alimentados con mucosa intestinal porcina cruda. Los ratones SCD1<sup>-/-</sup> que consumían ya sea control (sin adición de material de mucosa) o mucosa intestinal porcina cruda fueron monitoreados diariamente para la determinación del rascado. Cada ratón fue observado durante un minuto para determinar si estaba rascándose y cuántas veces se rascó durante ese período de tiempo de un minuto. Los datos reportados son un promedio del número total semanal de rasguños/el número de días/ el número de animales. Como se muestra en la Figura 4, aunque no hubo diferencia significativa entre los animales de control y los animales alimentados con mucosa intestinal porcina cruda las primeras 7 semanas, los ratones alimentados con mucosa parecían tener menos rasguños (aproximadamente un 30% menos) que los controles en la semana 8.

Ejemplo 4: Determinación del componente activo en la mucosa intestinal porcina cruda

Se planteó la hipótesis de que el componente activo de la mucosa intestinal porcina cruda es IgA secretora. Para probar esta hipótesis, los ratones fueron tratados con IgA secretora intestinal porcina purificada. 28 ratones SCD1<sup>-/-</sup> fueron alimentados con una dieta NIH AIN76A suplementada con 1 g/Kg de IgA secretora porcina o con 0,33 g/Kg de IgA secretora porcina (Control de trabajo previo con 100% de incidencia de dermatitis = 8 ratones; SIgA a 0,33 g/Kg =

14 ratones; SIgA a 1 g/Kg = 14 ratones). Se monitoreó la incidencia de dermatitis ulcerosa durante 12 semanas. En la Tabla 3 se muestran los datos:

Tabla 3: Efecto de la IgA porcina purificada sobre la dermatitis ulcerosa en el modelo de ratón

Tratamiento	Ratones con dermatitis ulcerosa	% de incidencia
Control (de Krugner-Higby)	8/8	100
0,33 g/kg**	7/14	50
1 g/kg	2/14	14
** La bioactividad se redujo a 1/3 de la actividad después de calentar hasta 80°C durante 30 minutos utilizando E. coli:55 LPS y proteína de soja aislada en un ELISA.		

Los datos de la Tabla 3 confirman que el componente activo en la mucosa intestinal porcina cruda es la IgA secretora.

Ejemplo 5: Tratamiento de la dermatitis ulcerosa con IgA secretora porcina purificada

Cuatro ratones con dermatitis ulcerosa (ratones SCD1<sup>-/-</sup> alimentados con la dieta NIH AIN76A) fueron alimentados con la dieta NIH AIN76A suplementada con 1g/kg de IgA secretora porcina purificada.

Como se muestra en la Figura 5, los ratones SCD1<sup>-/-</sup> con dermatitis ulcerosa que consumían SIgA porcina purificada fueron monitoreados diariamente para determinar la puntuación de DU. Los datos presentados son un promedio de la puntuación de DU total semanal/número de días/ número de animales. Hay una disminución significativa en la puntuación de DU con los ratones que consumían mucosa intestinal porcina cruda. \* = P<0,001. En los cuatro casos, se redujo la gravedad de la dermatitis ulcerosa. Por lo tanto, la IgA secretora porcina purificada revierte la dermatitis ulcerosa en el modelo de ratón.

Como evidencia adicional de que SIgA reduce la dermatitis ulcerosa, se determinó el rascado en los ratones control y en los ratones alimentados con SIgA porcina purificada. Los ratones SCD1<sup>-/-</sup> consumieron ya sea control sin SIgA agregada, SIgA porcina purificada con 1/3 de la actividad (0,33 gramos de SIgA/Kg) o SIgA porcina purificada de actividad completa (1 gramo de SIgA/Kg) y se monitorearon diariamente para determinar el rascado. Cada ratón fue observado durante un minuto para determinar si se rascaba y cuántas veces se rascó durante ese período de tiempo de un minuto. Los datos reportados son un promedio del número total semanal de rasguños/el número de días/ el número de animales. (Figura 6) Hay una disminución significativa del rascado en el caso de los ratones que consumieron SIgA porcina purificada. \* = P<0,03

Se ha demostrado en la presente invención, utilizando el modelo de dermatitis de ratón SCD1<sup>-/-</sup>, que la mucosa intestinal porcina administrada oralmente o la SIgA porcina purificada dio como resultado una reducción dosis-dependiente en el desarrollo de la dermatitis ulcerosa. Además, en ratones con dermatitis ulcerosa, la mucosa intestinal porcina administrada oralmente o SIgA porcina purificada redujeron drásticamente o eliminaron los síntomas de la dermatitis ulcerosa en los cuatro ratones tratados que tenían dermatitis ulcerosa. Los métodos descritos en la presente invención son particularmente útiles para tratar la inflamación de las estructuras superficiales de barrera, incluyendo la dermatitis ulcerosa y los trastornos gastrointestinales.

El uso de los términos "un", "una", "el" y "la" y referentes similares (especialmente en el contexto de las reivindicaciones que siguen) deben interpretarse tanto en singular como en plural, a menos que se indique lo contrario o que el contexto lo contradiga claramente. Los términos primero, segundo, etc. como se utilizan en la presente invención no pretenden denotar ningún orden en particular, sino simplemente, por cuestiones de conveniencia, pretenden denotar una pluralidad de, por ejemplo, capas. Las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significan "incluyendo, pero sin limitarse a") a menos que se indique lo contrario. La mención de los rangos de valores tiene como finalidad meramente servir como método abreviado de referencia individual a cada valor separado que cae dentro del rango, a menos que se indique lo contrario en la presente invención, y cada valor separado es incorporado a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en la presente invención. Los valores extremos de todos los rangos están incluidos dentro del rango y se pueden combinar de forma independiente. Todos los métodos descritos en la presente invención pueden llevarse a cabo en un orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en la presente o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o de un lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como"), tiene por objeto ilustrar mejor simplemente la invención y no implica ninguna limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique otra cosa.

Si bien la invención ha sido descrita con referencia a una forma de realización proporcionada a modo de ejemplo, se pretende que la invención no se esté limitada a la forma de realización particular descrita como el mejor modo contemplado para llevar a cabo esta invención, sino que la invención incluirá todas las formas de realización que se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición de IgA secretora formulada para la administración oral que comprende una cantidad antiinflamatoria de IgA secretora para utilizar en un método para prevenir y/o tratar la inflamación en una estructura superficial de barrera en un individuo que lo necesita, comprendiendo dicho método la administración oral de la composición al individuo, en donde la IgA secretora es aislada del líquido luminal intestinal o de la mucosa intestinal de un animal, preferentemente un animal que ha sido expuesto a una variedad de antígenos, o del líquido luminal intestinal o de la mucosa intestinal de un cerdo, una oveja, un pollo, un pavo o una vaca, y en donde la inflamación en una estructura superficial de barrera es dermatitis.
2. La composición de IgA secretora para el uso de la reivindicación 1, en donde el individuo es un humano, un mamífero no humano, o una especie no mamífera, preferentemente un humano con una enfermedad autoinmunitaria.
3. La composición de IgA secretora para el uso de la reivindicación 1, en donde la dermatitis es dermatitis atópica, dermatitis actínica crónica, dermatitis ulcerosa, dermatitis alérgica por contacto, o dermatitis irritante por contacto, preferentemente dermatitis ulcerosa.
4. La composición de IgA secretora para el uso de la reivindicación 3, en donde la dermatitis atópica es eccema del lactante y el individuo es un lactante diagnosticado con eccema del lactante.
5. La composición de IgA secretora para el uso de la reivindicación 3, en donde la dermatitis es dermatitis atópica y el individuo es un perro diagnosticado con dermatitis atópica.
6. La composición de IgA secretora para el uso de la reivindicación 5, en donde el perro tiene parches calientes, preferentemente en donde el perro es intolerante a la prednisona, la prednisona está contraindicada debido a efectos secundarios, o el perro recibe en forma conjunta una medicación incompatible con la administración de esteroides.
7. El uso de la reivindicación 3, en donde la dermatitis es dermatitis ulcerosa y el individuo es:
  - (i) un ratón de laboratorio con fondo C57BL/6,
  - (ii) un gato con dermatitis ulcerosa felina,
  - (iii) un pavo con dermatitis ulcerosa focal,
  - (iv) un pollo con dermatitis gangrenosa,
  - (v) un cerdo con dermatitis ulcerosa porcina, o
  - (vi) un reptil con dermatitis ulcerosa.
8. La composición de IgA secretora para el uso de la reivindicación 1, en donde el individuo sufre de lesiones cutáneas que son resistentes a la cicatrización.
9. La composición de IgA secretora para el uso de la reivindicación 1, en donde
  - (i) el individuo tiene deficiencia de IgA sérica selectiva, y la administración por vía oral de IgA previene o reduce el desarrollo de dermatitis en el individuo, o
  - (ii) el individuo tiene alergias, y la administración por vía oral de IgA previene o reduce el desarrollo de dermatitis en el individuo.
10. La composición de IgA secretora para el uso de la reivindicación 9, en donde el individuo con una alergia es un ser humano con una alergia al gluten.
11. La composición de IgA secretora para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho uso previene y/o trata la dermatitis ulcerosa en un ratón de laboratorio con fondo C57BL/6.

Figura 1

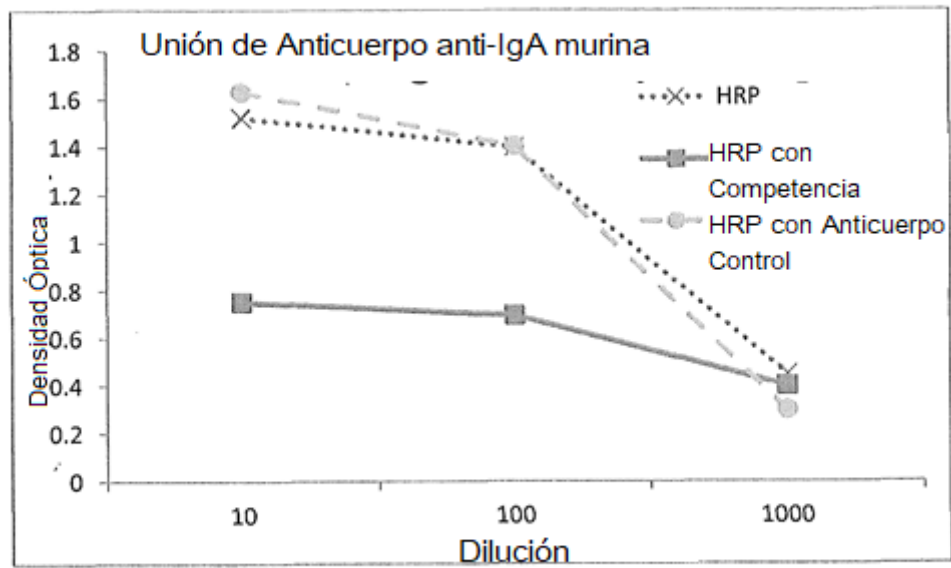


Figura 2

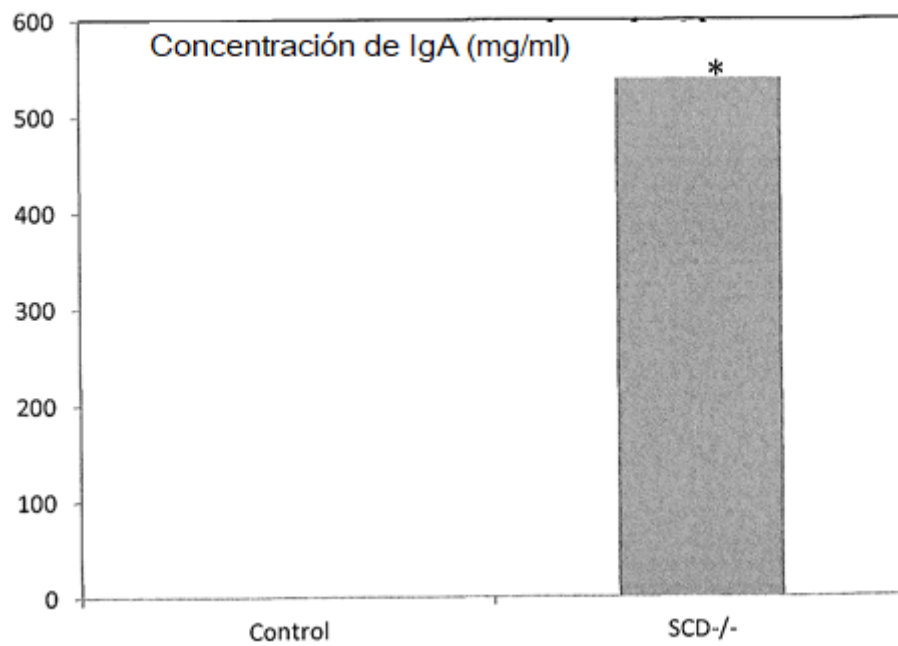


Figura 3

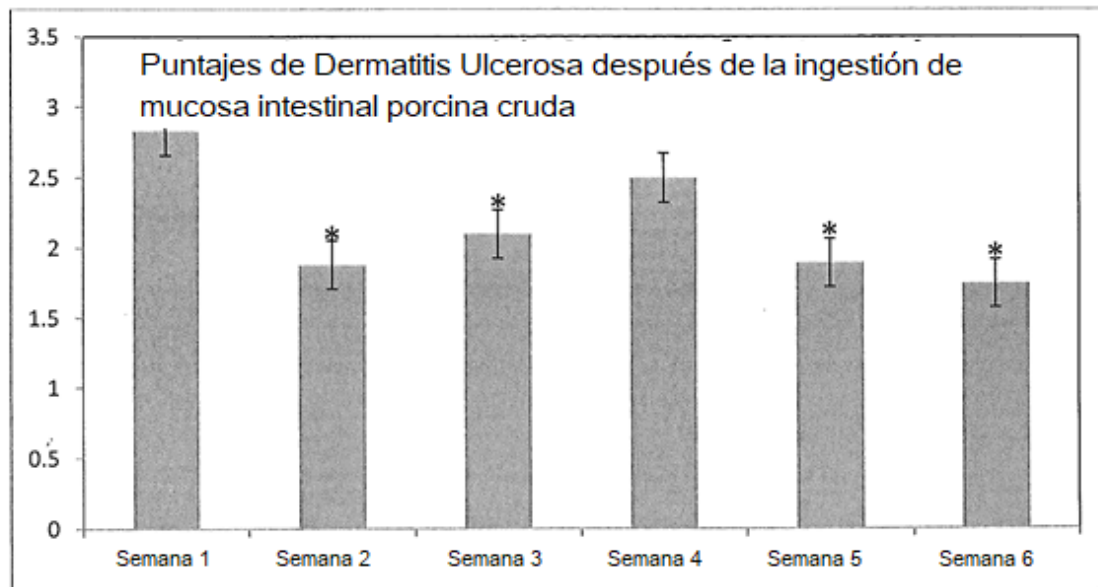


Figura 4

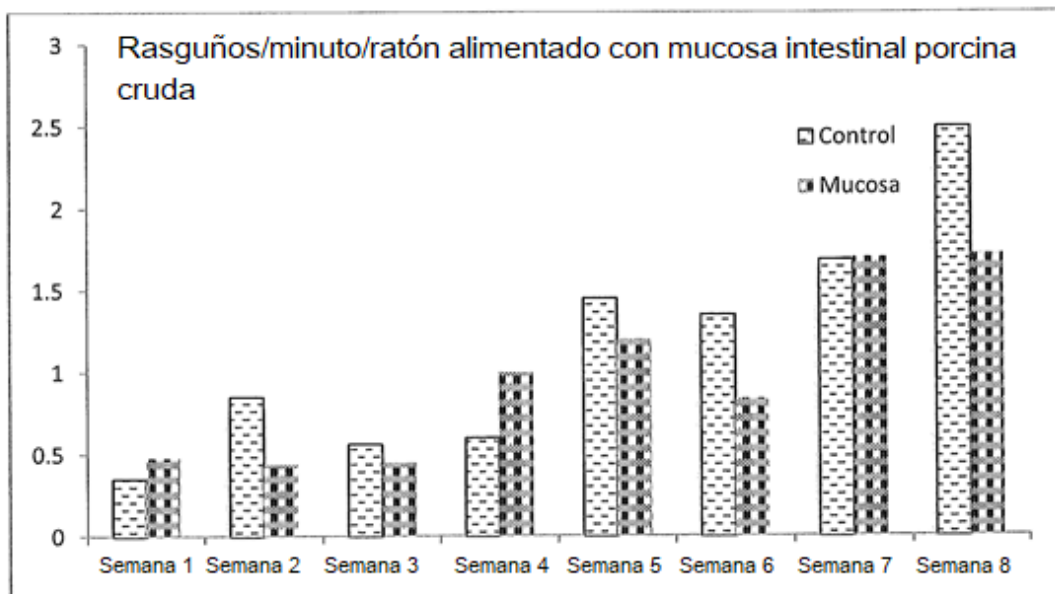


Figura 5

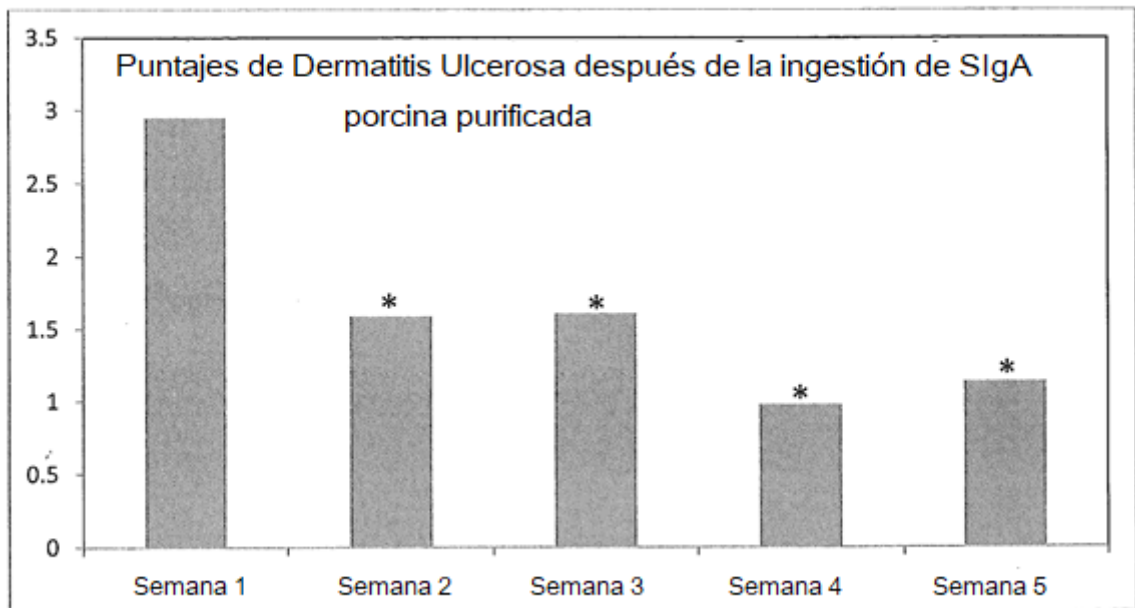


Figura 6

