



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 192**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

A61K 31/716 (2006.01)

A61K 31/736 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05784461 .5**

96 Fecha de presentación : **10.08.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1948237**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

54

Título: **Uso de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, β -1,3(4)-glucano, diatomita, mineral de arcilla y glucomanano para potenciar la función inmune.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.06.2011

73

Titular/es: **OmniGen Research, L.L.C.**
1767 NW Kings Blvd
Corvallis, Oregon 97330, US

72

Inventor/es: **Puntenney, Steven Bruce y**
Forsberg, Neil Elliott

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 362 192 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

Uso de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, β -1,3(4)-glucano, diatomita, mineral de arcilla y glucomanano para potenciar la función inmune

CAMPO DEL INVENTO

- 5 Esta descripción se refiere a métodos y composiciones para la potenciación de la función inmune en especies mamíferas y aviares.

FUNDAMENTO DEL INVENTO

- 10 El sistema inmune consiste en dos características generales. Estas son: 1) el sistema inmune innato y 2) el sistema inmune adaptativo (mediado por anticuerpos). El sistema innato representa la primera línea de defensa contra un patógeno invasor (sea bacteriano o sea fúngico) y proporciona al sistema inmune adaptativo el tiempo suficiente (3-5 días) para que genere anticuerpos que se utilicen para "luchar" contra los patógenos. Aunque los sistemas innato y adaptativo a menudo se describen separadamente, actúan en tándem intentando secuestrar y neutralizar el reto de un patógeno.

- 15 **El sistema inmune innato.** El sistema inmune innato consiste en varios componentes interesantes. Sus aspectos incluyen:

1. Barreras físicas y químicas contra los patógenos, proporcionadas por el epitelio, el ácido gástrico y las enzimas digestivas.
2. Células que engullen y digieren patógenos invasores (por ejemplo, neutrófilos).
3. Receptores sobre la superficie de estas células que reconocen y se unen a patógenos.
- 20 4. Moléculas de señalización (por ejemplo, quimiocinas y citocinas) que comunican sitios de infección y regulan la expresión de genes inmunes.

- 25 **Neutrófilos.** Los neutrófilos se encuentran entre las células más importantes del sistema inmune innato. Son las primeras células que llegan a un sitio de infección. En los mamíferos, hay miles de millones de neutrófilos de los que aproximadamente la mitad circulan libremente por la sangre (Burton y Erskine, 2003). Los restantes se mantienen como reserva en la médula ósea, donde se forman. Los neutrófilos expresan en sus membranas una proteína ligante extracelular denominada "selectina L" (también denominada CD62L). El papel de la selectina L es interactuar débilmente con la pared de células endoteliales para permitir de este modo que el neutrófilo "ruede" a lo largo de la pared de un vaso sanguíneo y "controle" la pared celular en cuanto a la presencia de señales que indiquen una infección local (Figura 1). La presencia de patógenos en tejidos periféricos causa la liberación de productos químicos locales que luego señalan la existencia de una infección a un neutrófilo rodante. En respuesta a estas señales, se desprende la selectina L de la superficie del neutrófilo (véase la Figura 1) y se expresan otras moléculas más adhesivas en la superficie de éste. Estas moléculas "pegan" esencialmente el neutrófilo al vaso sanguíneo adyacente al sitio de la infección. El neutrófilo activado migra luego a través de la pared de las células endoteliales, hacia el patógeno invasor. El neutrófilo produce interleucina 1 β como una citocina proinflamatoria. Ésta ayuda mediando en la inflamación y facilitando la contención de los patógenos invasores. Durante la migración de los neutrófilos, señales químicas que se originan en el sitio de la infección (tales como el TNF- α y el interferón γ) activan el neutrófilo para que se convierta en una "célula asesina" madura. El neutrófilo maduro migra hacia el sitio de la infección, donde interactúa con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs; del inglés, pathogen-associated molecular patterns), presentes en la superficie de los patógenos, a través de varios tipos de receptores. Estos receptores se expresan en la superficie del neutrófilo e incluyen los siguientes tipos bien identificados (Figura 2):

- a- CD18 y CD14
 - b- Receptores de tipo Toll (TLR; del inglés, Toll-like receptors)
 - c- C3b y C3bi (factores del complemento)
 - d- Fc
- 45 **Unión de neutrófilos a patógenos por medio de receptores.** Tanto el receptor CD14 como el CD18 se unen al lipopolisacárido (LPS), una estructura polisacárida común asociada con las membranas de bacterias Gram negativas. Además, los neutrófilos expresan receptores de tipo Toll (TLRs) que reconocen y se unen a estructuras adicionales asociadas con patógenos. Hasta la fecha se han identificado diez receptores de tipo Toll diferentes en mamíferos (Figura 2 y Tabla 1). Los TLRs desempeñan un papel crítico en la inmunidad innata precoz hacia los patógenos invasores al sensibilizar microorganismos. Estos receptores evolutivamente conservados reconocen unos motivos estructurales muy conservados sólo expresados por patógenos microbianos, llamados patrones moleculares asociados con patógenos (PAMPs; Invivogen, 2004). La estimulación de TLRs por PAMPs inicia una cascada de señalización que afecta a diversas proteínas, tales como MyD88 e IRAK (Figura 2). Esta cascada de señalización conduce a

la activación del factor de transcripción NF- κ B, que provoca la secreción de citocinas que dirigen la respuesta inmune adaptativa (es decir, mediada por anticuerpos). Los TLRs se expresan predominantemente en tejidos implicados en la función inmune, tales como el bazo y los leucocitos de sangre periférica, así como en aquellos expuestos al ambiente externo, tales como el pulmón y el tracto gastrointestinal. Se han caracterizado diez TLRs de ser humano y nueve de ratón, de siete de los cuales se han identificado sus ligandos. Por ejemplo, el TLR2 es esencial para el reconocimiento de una diversidad de PAMPs, incluyendo lipoproteínas peptidoglicano y ácidos lipoteicoicos bacterianos. El TLR3 está implicado en el RNA de doble cadena derivado de virus. El TLR4 es predominantemente activado por el lipopolisacárido. El TLR5 detecta la flagelina bacteriana, y el TLR9 es necesario para la respuesta al DNA CpG no metilado (Tabla 1). Recientemente, se mostró que TLR7 y TLR8 reconocen moléculas antivíricas sintéticas. Estos receptores son elementos esenciales en la defensa del huésped frente a los patógenos al activar la inmunidad innata (Invivogen, 2004).

TLRs bovinos. Se han completado relativamente pocos estudios sobre PAMPs con células bovinas. Hasta la fecha, se ha comunicado que células inmunes bovinas contienen TLR2 y TLR4 (Werling et al., 2004). Se ha informado sobre polimorfismos en el TLR4 bovino que pueden determinar una susceptibilidad a la enfermedad respiratoria bovina y la enfermedad de Johne (White et al., 2003).

C3b y C3bi son componentes de la cascada del complemento, mientras que el receptor de Fc se une a la "región constante" de los anticuerpos. Por lo tanto, los patógenos que están revestidos con factores del complemento o con anticuerpo (es decir, patógenos que están opsonizados) son también reconocidos por neutrófilos activados y son posteriormente fagocitados. En otras palabras, los neutrófilos activados poseen varios medios por los cuales reconocen patógenos (Tabla 1).

Fagocitosis y muerte. La unión de los neutrófilos (y otras células fagocíticas) a los marcadores de la superficie celular de los patógenos a través de estos receptores permite entonces a la célula fagocítica engullir el patógeno invasor y "matarlo" (Figura 3). Actualmente se conocen dos mecanismos para "matar". Estos incluyen: 1) un estallido oxidativo, por el que el fagocito expresa especies oxigenadas reactivas que destruyen el patógeno fagocitado, y 2) una fusión del patógeno engullido con una estructura de tipo lisosoma para formar un "fagosoma". El fagosoma es rico en enzimas digestivas que median en la digestión completa de los patógenos.

Infecciones comunes. Las especies mamíferas y aviares son continuamente estimuladas por patógenos en el tracto gastrointestinal y en el pulmón. Estos son sitios importantes para neutrófilos residentes, en los que se minimiza la invasión de los patógenos. Además, la glándula mamaria de los mamíferos representa un sitio para la estimulación de patógenos. En todas las infecciones, el sistema inmune innato desempeña un papel inicial esencial en la lucha contra la estimulación inmune inicial. El sistema innato es esencial para permitir que el sistema adaptativo (mediado por anticuerpos) se desarrolle y monte una respuesta inmune más específica y dirigida.

Cooperación entre los sistemas inmunes innato y adquirido en los rumiantes. Los anticuerpos que son específicos para un patógeno invasor escapan a un sitio de infección para optimizar el aclaramiento de un patógeno. Los individuos con un elevado título contra un antígeno específico son capaces de distribuir estos anticuerpos al sitio de infección a través de un endotelio que hace agua (que surge de una respuesta inflamatoria). La llegada de anticuerpos reactivos (es decir, IgG₂) al alveolo reviste (opsoniza) el patógeno y, como se indicó previamente, permite el reconocimiento de los patógenos por el neutrófilo a través de los receptores de Fc (Tabla 1) y la fagocitosis.

Estrés y función inmune. El estrés reduce las capacidades de los individuos para luchar contra la enfermedad. Los efectos negativos del estrés sobre el sistema inmune son mediados por las hormonas esteroides del estrés (cortisol, hidrocortisona y corticosterona). Burton y colaboradores, en Michigan State University (Weber et al., 2001), han identificado el mecanismo por el cual el estrés provoca una reducción de la función inmune. Específicamente, han documentado que los glucocorticoides (es decir, el cortisol) "activan" un parto próximo (Figura 4) y reducen la expresión de selectina L en los neutrófilos (Figura 5). Esto compromete un aspecto importante de la primera línea de defensa de un individuo contra la estimulación por patógenos. Específicamente, un individuo inmunosuprimido estresado presenta una capacidad reducida para controlar el revestimiento de las células endoteliales en los sitios de infección y para atacar y secuestrar patógenos. Esto puede dar lugar a una infección (Figura 6).

SUMARIO DEL INVENTO

El objeto del presente invento es proporcionar un método nuevo y previamente desconocido para la potenciación del sistema inmune en especies mamíferas y aviares. El invento se puede aplicar, pero no se limita, a especies mamíferas y aviares y reducirá la susceptibilidad de un individuo a enfermedades tanto fúngicas como bacterianas.

Un objeto más de este invento es proporcionar un método para la potenciación de la función inmune y, de este modo, minimizar u obviar las morbilidades y mortalidades causadas por, pero no limitadas a, bacterias y hongos patógenos con una preparación que comprende una combinación de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, β -glucano, diatomita, glucomanano y un mineral de arcilla, tal como silicato de aluminio, arcilla montmorillonita, bentonita o zeolita.

Otro objeto del invento es proporcionar una composición que comprende una combinación de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, β -glucano, diatomita, mineral de arcilla y glucomanano, que potencia aditivamente la función inmune y reduce por ello el potencial de bacterias y hongos patógenos para causar morbilidades y mortalidades en especies

mamíferas y aviares.

Se expondrán, en parte, objetos adicionales, ventajas y nuevas características del invento en la descripción que sigue, que resultarán evidentes, en parte, a los expertos en la técnica tras el examen de lo siguiente o podrán ser aprendidos con la práctica del invento. Para alcanzar los objetos precedentes y otros objetos, y de acuerdo con los fines del presente invento como aquí se describen, se describe un nuevo método para la potenciación de la función inmune de especies mamíferas y aviares. En particular, este invento aumenta la expresión de selectina L e interleucina 1 β de neutrófilos y minimiza o elimina por ello la colonización de las superficies epiteliales y los tejidos parenquimáticos subyacentes por bacterias y hongos patógenos, y reduce las poblaciones de organismos patógenos en sangre y minimiza o elimina por ello las patologías directamente causadas e indirectamente causadas por esta colonización. El invento comprende una mezcla de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, β -glucano, diatomita, mineral de arcilla y glucomanano. La diatomita es de calidad comercial estándar, asequible de una diversidad de fuentes. La β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa es producida a partir de la fermentación sumergida de una cepa de *Trichoderma longibrachiatum*. El β -1,3(4)-glucano y el glucomanano proceden de un producto comercial y son una extracción de cualquiera de una diversidad de levaduras. El producto de mineral de arcilla es de calidad comercial estándar (los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, arcilla montmorillonita, bentonita y zeolita). Las extracciones y producciones de diatomita, extracto de pared celular de levadura y mineral de arcilla son bien conocidas en la técnica y comercialmente asequibles.

Las composiciones que se proporcionan mediante el invento se pueden suministrar a cualquier especie mamífera o aviar, incluyendo, pero sin limitarse a, especies bovinas, equinas, ovinas, caprinas y aviares. Cuando se mezcla con el pienso o el alimento o se proporciona como un suplemento, el invento potencia la función inmune, reduciendo por ello la colonización por patógenos. El invento también minimiza o elimina la invasión del compartimento sanguíneo por bacterias y hongos patógenos. De este modo, el invento minimiza o elimina las manifestaciones de las patologías típicamente asociadas con infecciones epiteliales y sistémicas por hongos y bacterias. La administración del producto se puede utilizar como una medida profiláctica (es decir, para prevenir la colonización y el crecimiento de especies fúngicas y bacterianas patógenas en especies mamíferas o aviares), como un aditivo para los piensos o alimentos infectados con hongos o bacterias patógenas, o como un método preferido para tratar, y de este modo minimizar o eliminar, una infección fúngica o bacteriana existente, diagnosticada o no diagnosticada. La aplicación del invento como aquí se describe y a través de los mecanismos específicos y nuevos aquí descritos minimizará y posiblemente eliminará las manifestaciones de infecciones fúngicas y bacterianas. La aplicación del invento como aquí se describe también minimizará o posiblemente eliminará las manifestaciones asociadas con la presencia de organismos fúngicos y bacterianos patógenos, como se identificaron anteriormente, en el alimento o el pienso de especies mamíferas y aviares.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los dibujos y fotografías adjuntas que se incorporan en la siguiente "Descripción Detallada del Invento" forman parte de la memoria descriptiva e ilustran varios aspectos del presente invento y, junto con la "Descripción Detallada", sirven para explicar los detalles del invento. En la sección siguiente se presentan cinco figuras.

Figura 7. Efecto de cinco tratamientos experimentales sobre las concentraciones de selectina L de neutrófilo. Se llevó a cabo un experimento con 60 ovejas. Se asignaron doce ovejas a cada tratamiento. Los tratamientos consistían en:

1. Testigo
2. Inmunosuprimido [inyecciones diarias de Azium (dexametasona); 0,1 mg/kg dos veces/día].
3. Inmunosuprimido más producto experimental suministrado en una cantidad del 0,5% de la ingesta diaria de materia seca.
4. Inmunosuprimido más pienso mohoso (adición de una partida de trigo molido infectado con *Aspergillus fumigatus*; 0,68 kg/cabeza/día).
5. Inmunosuprimido más pienso mohoso (como en el Tratamiento 4) más el producto de pienso experimental como se esboza en el Tratamiento 3.

La duración de la prueba fue 28 días. El día 28, se extrajo sangre de seis ovejas por tratamiento y se recuperaron los neutrófilos mediante centrifugación en un gradiente de Percoll. Se determinaron las concentraciones de selectina L mediante un análisis por transferencia Western utilizando un anticuerpo específico para selectina L. En la Figura 8 se muestran las concentraciones relativas de selectina L entre los cinco grupos de tratamiento.

Figura 8. Densitometría de barrido de los datos mostrados en la Figura 7.

Figura 9. Análisis de la interleucina 1 β de neutrófilo en las mismas muestras de neutrófilos de oveja presentadas en la Figura 7.

Figura 10. Densitometría de barrido de los datos mostrados en la Figura 9.

Figura 11. Concentraciones de *Aspergillus fumigatus* en las muestras de sangre tomadas de las ovejas el día 28 del estudio anterior. Se evaluaron los niveles de DNA de *A. fumigatus* usando un ensayo cuantitativo específico para *A. fumigatus*, basado en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, polymerase chain reaction) con Sybr-Green.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

El presente invento se basa en el nuevo descubrimiento de que una combinación de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, β -1,3(4)-glucano, diatomita, mineral de arcilla y glucomanano potencia eficazmente la función inmune y reduce la colonización de tejidos y sangre por un patógeno.

10 La β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa procede de una fuente comercial y es producida a partir de una fermentación sumergida de una cepa de *Trichoderma longibrachiatum*.

15 La diatomita se prepara por métodos comúnmente conocidos en la técnica. Es asequible como un producto comercialmente asequible lavado con ácido, con sílice (SiO_2) al 95% y con sus componentes restantes no analizados pero que consisten esencialmente en ceniza (minerales), como es definido por la Association of Analytical Chemists (AOAC, 2002).

El extracto de pared celular de levadura se prepara por un método comúnmente conocido en la técnica. Es una fuente comercial de β -1,3(4)-glucano y glucomanano derivada de una levadura inactivada primaria (*Saccharomyces cerevisiae*), con la composición química siguiente:

Humedad	2-3%
Materia seca	97-98%
Proteínas	14-17%
Grasas	20-22%
Fósforo	1-2%
Mananos	22-24%
β -1,3(4)-glucano	24-26%
Ceniza	3-5%

20 Los minerales de arcilla (aluminosilicatos) utilizados en este invento pueden ser completados por cualquiera de una diversidad de arcillas comercialmente asequibles que incluyen, pero no se limitan a, arcilla montmorillonita, bentonita y zeolita.

25 En una realización preferida del invento, se combinan β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, diatomita, extracto de pared celular de levadura y mineral de arcilla en cantidades de 0,05-3%, 1-40%, 1-20% y 40-92%, respectivamente. En una composición preferida, se combinan β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, diatomita, extracto de pared celular de levadura y mineral de arcilla en cantidades de 0,1-3%, 5-40%, 2-10% y 40-80%, respectivamente. En una realización especialmente preferida del invento, se combinan β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, diatomita, extracto de pared celular de levadura y mineral de arcilla en cantidades de 0,2-3%, 30-40%, 4-6% y 50-65%, respectivamente. La forma física preferida del invento es un polvo seco y fluente que es adecuado para inclusión directa en un pienso o producto alimenticio o como un suplemento para la dieta o ración mixta total.

30 Las composiciones proporcionadas por el presente invento se pueden incorporar directamente a piensos o productos alimenticios comercialmente asequibles o se pueden suministrar como suplementos para piensos o productos alimenticios comercialmente asequibles. La composición contenida en el presente invento puede ser suministrada a cualquier especie mamífera o aviar. Los métodos del invento comprenden potenciar la función inmune en especies mamíferas y aviares. Cuando se incorpora directamente a piensos, el presente invento puede ser añadido a los piensos en cantidades que varían de 0,1 a 5 kg por tonelada de pienso. En una composición especialmente preferida, el invento puede ser añadido a los piensos en cantidades que varían de 1 a 2 kg por tonelada de pienso.

40 La composición contenida en el presente invento puede ser añadida a piensos para animales o a alimentos en cantidades que varían de 0,0125% a 2% en peso de pienso. En una realización preferida, la composición se añade a piensos para animales o a alimentos en cantidades que varían de 0,0625% a 1% en peso de pienso. En una realización especialmente preferida, el invento se añade en cantidades que varían de 0,125% a 0,5% en peso de pienso.

Alternativamente, la composición contenida en el presente invento puede ser suministrada directamente a especies

5 mamíferas o aviares como un suplemento en cantidades de 0,016 g/kg a 0,37 g/kg de peso corporal en vivo por día. En una realización especialmente preferida, el invento se puede proporcionar a especies mamíferas y aviares en cantidades de 0,10 g/kg a 0,20 g/kg de peso corporal por día. Un experto en la técnica puede apreciar que la cantidad suministrada del invento puede variar dependiendo de la especie animal, el tamaño del animal y el tipo de pienso al que se añade el invento.

10 Los nuevos métodos de este invento comprenden la capacidad de una combinación de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, diatomita, extracto de pared celular de levadura y arcilla para potenciar la función inmune. Los beneficios que resultan de la aplicación del invento a especies mamíferas incluyen, pero no se limitan a, pérdidas por muerte reducidas, incidencia reducida de aborto micótico, incidencia reducida de síndrome hemorrágico del yeyuno (síndrome del intestino muerto), incidencia reducida de desechos (diarrea), índice de crecimiento mejorado, eficacia de crecimiento mejorada, producción láctea mejorada, eficacia mejorada de producción láctea y recuentos reducidos de células somáticas en productos lácteos (ganado lechero). Los beneficios de la aplicación del invento a especies aviares incluyen, pero no se limitan a, pérdidas por muerte reducidas, producción de huevos y crecimiento mejorados, fertilidad mejorada, e incidencia reducida de enfermedades entéricas.

15 Lo siguiente está destinado a ser ilustrativo del invento y no ha de ser considerado restrictivo del alcance del invento como por lo demás aquí se describe.

Ejemplo 1

Se llevó a cabo un experimento usando 60 machos y hembras de oveja en crecimiento. Se asignaron las ovejas a uno de los cinco tratamientos (siete hembras y cinco machos por tratamiento):

- 20 1. Testigo
2. Inmunosuprimido [inyecciones diarias de Azium (dexametasona); 0,1 mg/kg dos veces/día].
3. Inmunosuprimido más el invento suministrado en una cantidad del 0,5% de la ingesta diaria de materia seca.
- 25 4. Inmunosuprimido más pienso mohoso (adición de una partida de trigo molido infectado con *Aspergillus fumigatus*; 0,68 kg/cabeza/día).
5. Inmunosuprimido más pienso mohoso (como en el Tratamiento 4) más el invento como se esboza en el Tratamiento 3.

30 Se alimentaron los animales con una dieta de tipo lácteo durante un periodo de 28 días. Se comunicó una inmunosupresión en los Tratamientos 2, 3, 4 y 5 mediante la inyección diaria de Azium utilizando una dosis elevada (un modelo de estrés extremo: Weber et al., 2001). Se estimularon las ovejas de los Tratamientos 4 y 5 con un moho patógeno alimentándolas con una partida de trigo molido que había sido contaminada con un moho patógeno (*Aspergillus fumigatus*). Las ovejas de los Tratamientos 3 y 5 fueron complementadas con el invento en una relación del 0,5% de su ingesta diaria de materia seca. Después de 28 días, se tomaron muestras de sangre por medio de una punción yugular y se aislaron las fracciones de neutrófilos utilizando una centrifugación en gradiente de densidades de Percoll. Después de esto, las muestras de proteína de neutrófilo fueron procesadas utilizando una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, y una transferencia Western usando anticuerpos que eran específicos para la selectina L y la interleucina 1 β . Se evaluaron las concentraciones relativas de selectina L e interleucina 1 β usando una densitometría de barrido.

40 Las Figuras 7 y 8 demuestran los efectos de los cinco tratamientos experimentales sobre la selectina L de neutrófilo. La inyección de Azium causó una acusada reducción ($P < 0,05$) de selectina L y proporciona la evidencia de que la inyección de Azium era realmente inmunosupresora. La adición de moho a las dietas no tuvo efecto alguno ($P > 0,05$) sobre las concentraciones de selectina L. Resulta interesante que la adición del invento al pienso (Tratamientos 3 y 5) causara el restablecimiento (potenciación: $P < 0,05$) de la selectina L.

45 **Interpretación.** El nuevo invento restableció (potenció) exitosamente los niveles normales de selectina L de neutrófilo. El restablecimiento de la selectina L en la superficie de los neutrófilos restaurará su capacidad para controlar el revestimiento endotelial para patógenos.

50 Las Figuras 9 y 10 demuestran los efectos de los cinco tratamientos experimentales sobre las concentraciones de interleucina 1 β de neutrófilo. El tratamiento con Azium causó una acusada reducción ($P < 0,05$) de la concentración de interleucina 1 β de neutrófilo. Esto demuestra que el Azium era inmunosupresor. El nuevo invento no ejerció efecto alguno ($P > 0,05$) sobre la interleucina 1 β de neutrófilo en ausencia de una estimulación con patógeno (es decir, el Tratamiento 3 frente al Tratamiento 2); sin embargo, el invento causó un acusado aumento ($P < 0,05$) de interleucina 1 β de neutrófilo en presencia de una estimulación con patógeno (es decir, el Tratamiento 5 frente al Tratamiento 4).

Interpretación. La interleucina 1 β es una citocina proinflamatoria importante que permite que el neutrófilo desempeñe su papel como fagocito. La capacidad del producto de pienso para restablecer la interleucina 1 β en presencia de

un patógeno (*A. fumigatus*) demuestra los posibles efectos del invento sobre la función inmune.

La Figura 11 muestra los efectos de los cinco tratamientos experimentales sobre las concentraciones de *A. fumigatus* en sangre. Las concentraciones de *A. fumigatus* se determinaron utilizando un ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cuantitativa, en tiempo real y con Sybr-Green, desarrollado en nuestro laboratorio. Los resultados demuestran que el invento reduce ($P < 0,05$) la concentración de *A. fumigatus* en sangre.

Interpretación. El restablecimiento de la función de los neutrófilos mostrado en las Figuras 7-10 se manifiesta por una reducción de la carga de patógenos detectada dentro del compartimento sanguíneo. El invento reduce la carga de patógenos.

Estos resultados muestran que la composición del invento [es decir, mineral de arcilla, extracto de pared celular de levadura, diatomita y β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa] es capaz de un efecto, previamente no descrito, de potenciación de la función inmune. El invento restablece específicamente los niveles de selectina L e interleucina 1β en los neutrófilos, restableciendo por ello la capacidad de los neutrófilos para controlar la presencia de patógenos invasores.

La combinación de productos potencia la inmunidad en especies mamíferas y domésticas y evita por ello la invasión y colonización del compartimento sanguíneo. Representa una mezcla que es fluente y fácilmente incorporada a productos de pienso y productos alimenticios. El presente invento fue eficaz en cuanto a conseguir sus efectos inmunoestimulantes bajo unas condiciones de crecimiento que podrían hallarse en los sistemas digestivos de mamíferos y aves, donde el huésped proporciona nutrientes, humedad, oxígeno y temperaturas elevadas.

La descripción precedente de la realización preferida del invento ha sido presentada con fines de ilustración y descripción. No se pretende que sea exhaustiva ni que limite el invento a la forma precisa descrita. A la luz de las anteriores ilustraciones, son posibles modificaciones o variaciones obvias. La realización fue elegida y descrita para proporcionar la mejor ilustración de los principios del invento y su aplicación práctica para permitir por ello que un experto normal en la técnica utilice el invento en diversas realizaciones y con modificaciones, según sean adecuadas al uso particular contemplado. Todas las citadas modificaciones y variaciones están dentro del alcance del invento, según viene determinado por las reivindicaciones adjuntas cuando se interpretan de acuerdo con la amplitud a la que tienen justa, legal y equitativamente derecho.

Tabla 1. Resumen de los mecanismos mediante los cuales los neutrófilos pueden reconocer/unirse a un patógeno antes de la fagocitosis.

Receptor del neutrófilo	PAMP ¹ o ligando	Comentario
CD14	Lipopolisacárido	Unión directa al patógeno
CD18	Lipopolisacárido	Unión directa al patógeno
TLR2	Lipoproteína, peptidoglicano, ácido lipoteicoico	Unión directa al patógeno
TLR3	RNA de cadena doble, derivado de virus	Unión directa al patógeno
TLR4	Lipopolisacárido	Unión directa al patógeno
TLR5	Flagelina	Unión directa al patógeno
TLR7/8	Pequeñas moléculas antivirales sintéticas	Unión directa al patógeno
TLR9	DNA CpG no metilado	Unión directa al patógeno
C3b/C3bi	Factores del complemento	Se une al patógeno opsonizado
Fc	"Región constante" de anticuerpos	Se une al patógeno opsonizado

¹PAMP: patrón molecular asociado a patógenos

Referencias citadas (por referencia)

Documentos de Patentes de EE.UU.

4.857.512	15 de agosto de 1989	Wagner et al.	514/54
5.183.667	2 de febrero de 1993	H. Koch	424/474
5.519.009	1 de octubre de 1993	B. Donzis	514/54
6.395.311	28 de mayo de 2002	Q. Jia	424/744
6.541.678	1 de abril de 2003	B. Klein	602/41
6.573.245	3 de junio de 2003	J. Marciani	514/25
6.660.722	9 de diciembre de 2003	J. C. Yvin	514/54

Otras referencias:

- 5 Adib Conquy M., y C. Fitting; "Immunological status of cardiac arrest and resuscitated patients. <http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR2002/Cytoinf-en.html>, 2002.
- AOAC, 2002; Official Methods of Analysis. 17^a edición; AOAC International Press.
- Burton J. L., y R. J. Erskine; "Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease", *Vet. Clin. Food Anim.* 19: 1-45, 2003.
- Invivogen; <http://www.invivogen.com/genedescription/TLR01.htm>, 2004.
- 10 Travis J., "Biologists reveal the proteins that first see dangerous microbes", *Science News*, semana del 8 de septiembre de 2001, vol. 160, n^o 10.
- Werling D., J. C. Hope, C. J. Howard y T. W. Jungi; "Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists"; *Immunology* 111: 41-52, 2004.
- 15 White S. N., K. H. Taylor, C. A. Abbey, C. A. Gill y J. E. Womack; "Haplotype variation in bovine Toll-like receptor 4 and computational prediction of a positively selected ligand-binding domain"; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 10.364-10.369, 2003.
- Weber P. S. D., S. A. Madsen, G. W. Smith, J. J. Ireland y J. L. Burton; "Pre-translational regulation of neutrophil L-selectin in glucocorticoid-challenged cattle"; *Vet. Immunol. Immunopath.* 83: 213-240, 2001.

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una combinación de β -glucano, glucomanano, β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, diatomita calcinada y un mineral de arcilla; para uso para potenciar la función inmune innata en especies animales no humanas y reducir por ello la susceptibilidad a una infección.
- 5 2. La composición de la Reivindicación 1, en que se potencia el sistema inmune innato en especies mamíferas y aviares, preferiblemente en especies mamíferas y aviares inmunosuprimidas.
3. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1 y 2, en que la administración de la composición da lugar a un cambio de los índices de la función inmune innata seleccionado del grupo que consiste en un aumento de la función de los neutrófilos, un aumento de los niveles de expresión de la selectina L de neutrófilo, un aumento de los niveles de expresión de interleucina 1β y una reducción de la carga de patógenos, y combinaciones de los mismos.
- 10 4. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, mezclada en alimentos o piensos de las especies animales no humanas.
5. La composición de la Reivindicación 1, en que la combinación de β -glucano, glucomanano, β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, diatomita calcinada y un mineral de arcilla es para uso en la inhibición del crecimiento fúngico en los productos de digestión de las especies animales no humanas.
- 15 6. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 2-5, en que las especies mamíferas incluyen todos los animales rumiantes, incluyendo preferiblemente el ganado lechero, el ganado para carne y las ovejas, y/o las especies aviares incluyen las especies de aves de corral usadas en la producción comercial de las granjas.
- 20 7. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, en que el mineral de arcilla es montmorillonita, bentonita, aluminosilicato, arcillas de zeolita, o mezclas de los mismos.
8. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1-7, en que la β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa se produce a partir de una fermentación sumergida de *Trichoderma longibrachiatum*.
- 25 9. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1-8, en que el β -glucano y el glucomanano proceden de la cocción y la autólisis enzimática de las paredes celulares de levaduras Gram positivas del género *Saccharomyces*, y, preferiblemente, el β -glucano y el glucomanano proceden de la cocción y la autólisis enzimática de las paredes celulares de levaduras Gram positivas de *Saccharomyces cerevisiae*.
10. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1-9, en que la diatomita se calcina a una temperatura mínima de 900 °C.
- 30 11. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1-10, en que la composición comprende entre 15% y 40% de diatomita, entre 50% y 81% de mineral de arcilla, entre 1,0% y 5,0% de β -glucano, entre 0,05% y 3,0% de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa y entre 1% y 8% de glucomanano.
- 35 12. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1-11, en que la composición comprende entre 20% y 30% de diatomita, entre 60% y 75% de mineral de arcilla, entre 1,0% y 3,5% de β -glucano, entre 0,1% y 3,0% de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa y entre 1,0% y 6,0% de glucomanano.
- 40 13. Una composición que comprende una combinación de β -glucano, glucomanano, β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, diatomita calcinada y un mineral de arcilla para uso en la potenciación de la función inmune o para uso en el tratamiento del crecimiento de mohos patógenos en un animal no humano seleccionado de entre especies mamíferas o aviares, potenciando por ello la función inmune para reducir la susceptibilidad a una infección en el animal o inhibiendo por ello el crecimiento de mohos en los productos de digestión que atraviesan el animal para reducir la susceptibilidad a una colonización micótica del tracto digestivo o a micosis invasivas.
14. La composición de la Reivindicación 13, en que la cantidad de la composición incorporada a la dieta del animal comprende entre el 0,0125% y el 5% en peso de la ingesta diaria de los animales.
- 45 15. La composición de la Reivindicación 13 ó 14, en que las especies de moho infectivas incluyen al menos una de *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rachiborskiomyces* y otros géneros que comprende la clasificación taxonómica fúngica.
16. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 13-15, en que las especies mamíferas incluyen todos los animales rumiantes, incluyendo preferiblemente el ganado lechero, el ganado para carne y las ovejas, y/o las especies aviares incluyen las especies de aves de corral usadas en la producción comercial de las granjas.
- 50 17. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 13-16, en que el mineral de arcilla es arcilla de montmorillonita, bentonita, aluminosilicato o zeolita, o mezclas de las mismas.

18. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 13-17, en que la β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa se produce a partir de una fermentación sumergida de *Trichoderma longibrachiatum*.
- 5 19. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 13-18, en que el β -glucano y el glucomanano proceden de la cocción y la autólisis enzimática de las paredes celulares de levaduras Gram positivas del género *Saccharomyces*, y, preferiblemente, el β -glucano y el glucomanano proceden de la cocción y la autólisis enzimática de las paredes celulares de levaduras Gram positivas de *Saccharomyces cerevisiae*.
20. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1-9, en que la diatomita se calcina a una temperatura mínima de 900 °C.
- 10 21. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1-10, en que la composición comprende entre 15% y 40% de diatomita, entre 50% y 81% de mineral de arcilla, entre 1,0% y 5,0% de β -glucano, entre 0,05% y 3,0% de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa y entre 1% y 8% de glucomanano.
22. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 1-11, en que la composición comprende entre 20% y 30% de diatomita, entre 60% y 75% de mineral de arcilla, entre 1,0% y 3,5% de β -glucano, entre 0,1% y 3,0% de β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa y entre 1,0% y 6,0% de glucomanano.
- 15 23. Un método para preparar una composición de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1-12 ó 13-22.
24. Uso de una composición que comprende una combinación de β -glucano, glucomanano, β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, diatomita calcinada y un mineral de arcilla en alimentos y piensos para animales.
25. Alimentos y piensos para animales que comprenden una combinación de β -glucano, glucomanano, β -1,3(4)-endoglucanohidrolasa, diatomita calcinada y un mineral de arcilla.

Figura 1. Movimiento de neutrófilos a través de un vaso sanguíneo. La selectina L (CD62L) se muestra como círculos sobre la superficie del neutrófilo. Aquella permite el acoplamiento del neutrófilo al endotelio. Adviértase el desprendimiento de selectina L y la migración del neutrófilo al tejido periférico, hacia un sitio de infección (F). Fuente: Burton y Erskine, 2003.

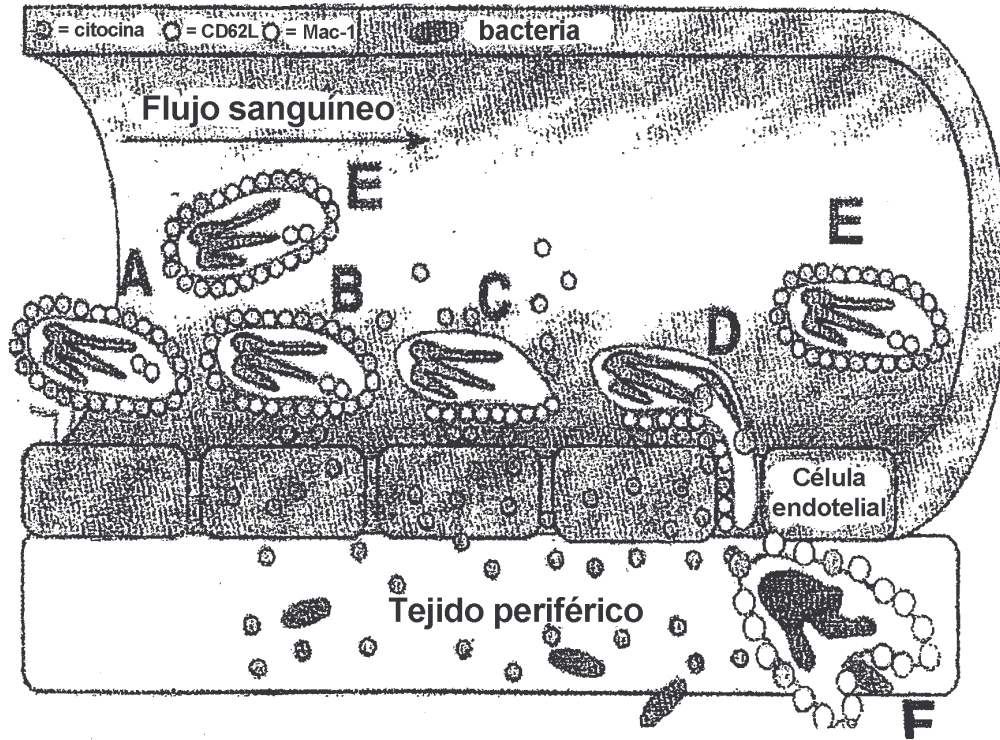


Figura 2. Receptores de tipo Toll sobre la superficie de una célula inmune y transducción de señales después de la unión de TLRs con PAMPs microbianos (fuente: M. Adib-Conquy, C. Fitting, 2002).

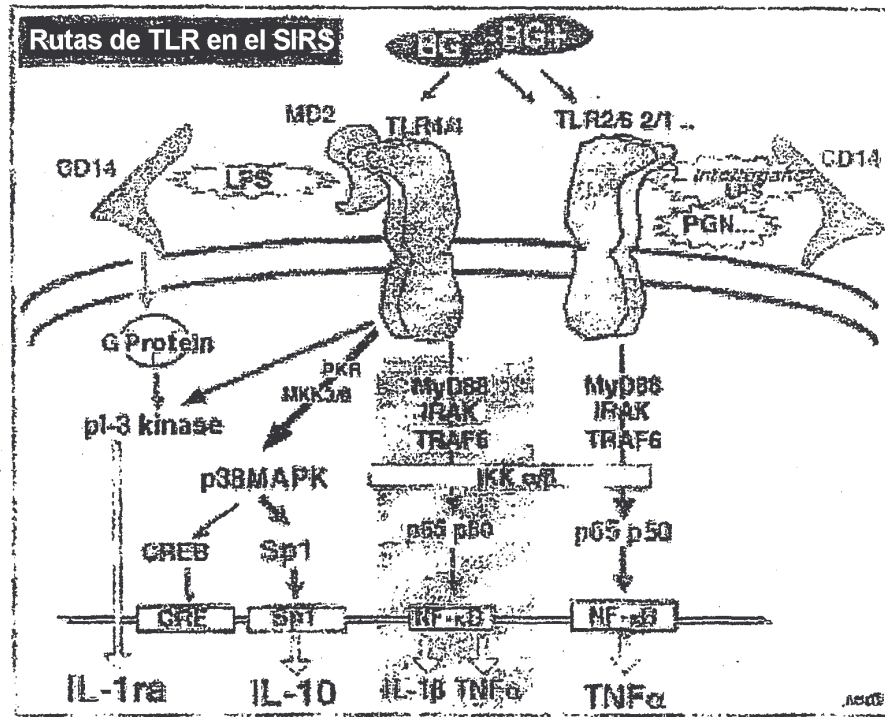


Figura 3. En un proceso llamado fagocitosis, este macrófago engulle una bacteria. Los receptores de tipo Toll y otros receptores dirigen a los fagocitos para que reconozcan a los microbios. Advértase las proyecciones de pseudópodos que rodean a la bacteria. Fuente: Travis, 2002.



Figura 4. Niveles de cortisol en ganado lechero con respecto al día del parto. Adviértase que el cortisol alcanza el máximo nivel el día del parto. Fuente: Weber et al., 2001.

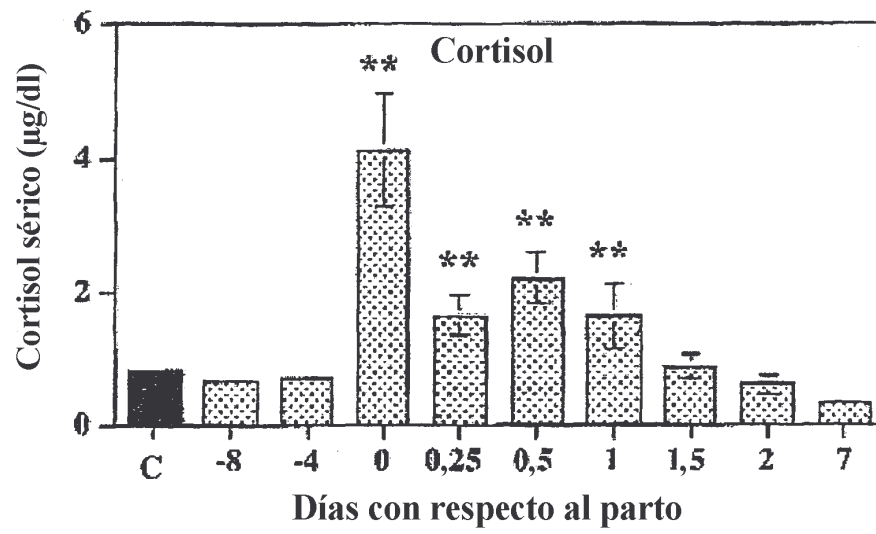


Figura 5. Las barras representan la concentración de selectina L de neutrófilo de vaca con respecto al día del parto. Fuente: Weber et al., 2001.

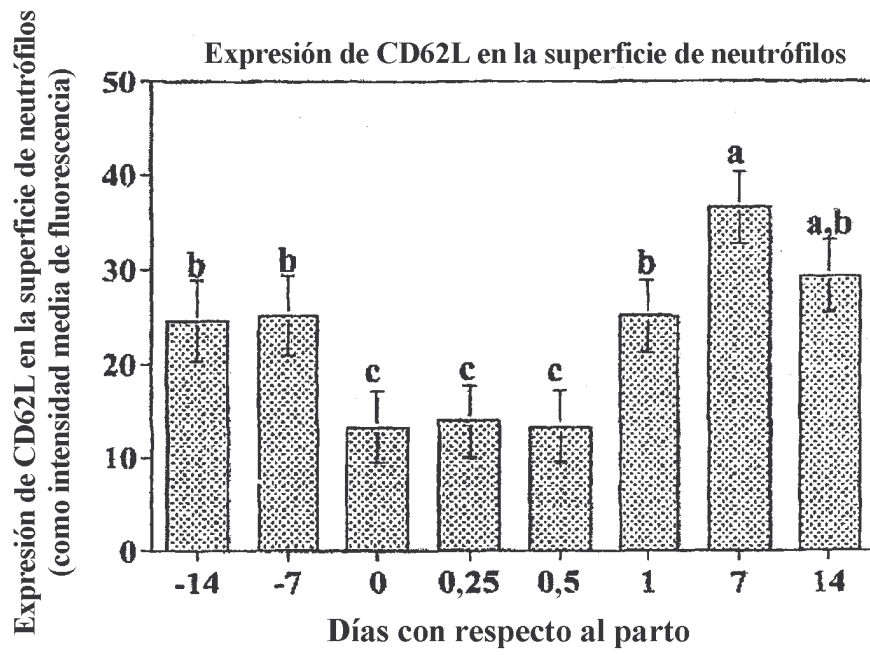


Figura 6. Neutrófilos que carecen de expresión de selectina L (CD62L) en una vaca lechera estresada (fuente: Burton y Erskine, 2003).

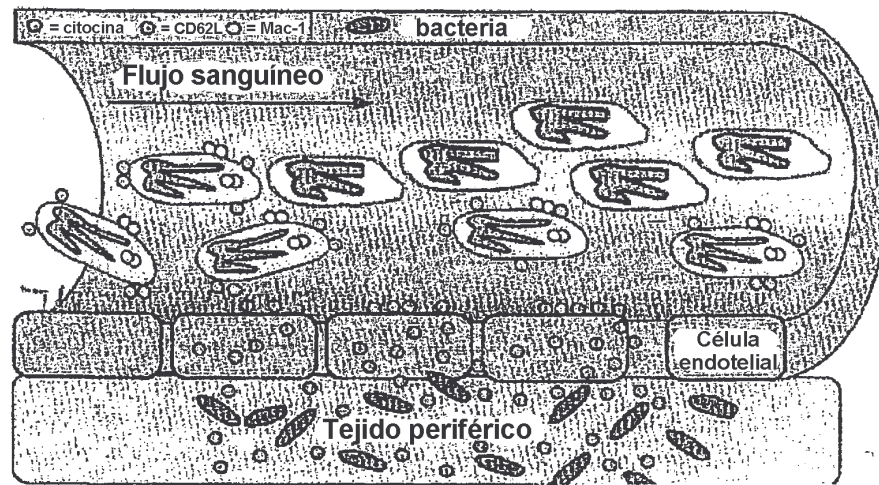


Figura 7. Efecto de cinco tratamientos experimentales sobre las concentraciones de selectina L de neutrófilo. Puntenney y Forsberg.

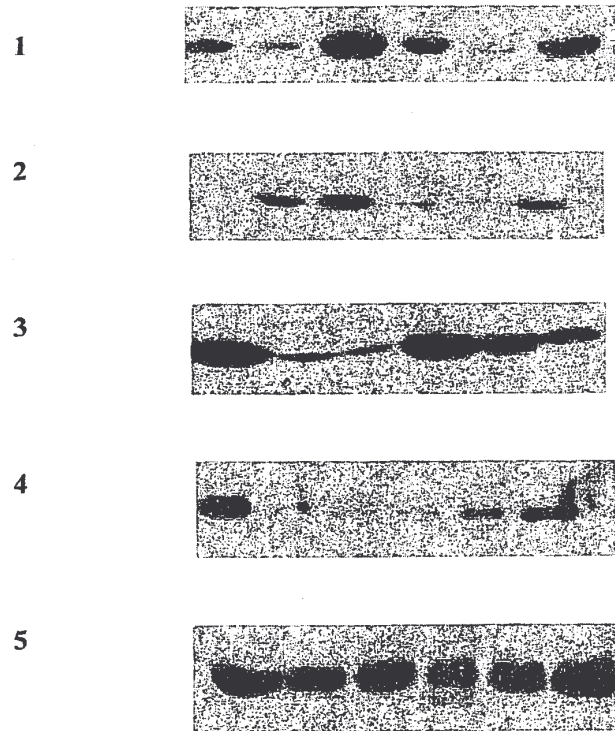


Figura 8. Densitometría de barrido de los datos mostrados en la Figura 7. Puntteney y Forsberg.

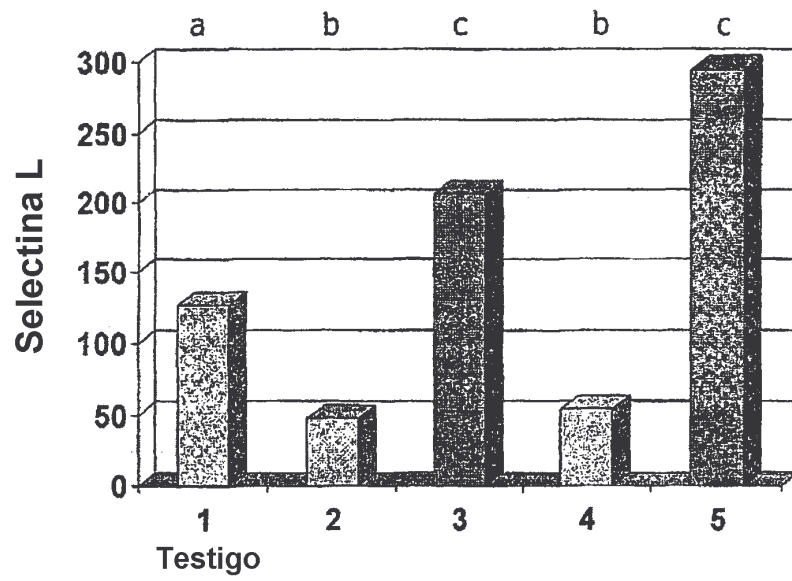


Figura 9. Análisis de la interleucina 1 β de neutrófilo en las mismas muestras de neutrófilos de oveja presentadas en la Figura 7. Puntenney y Forsberg.

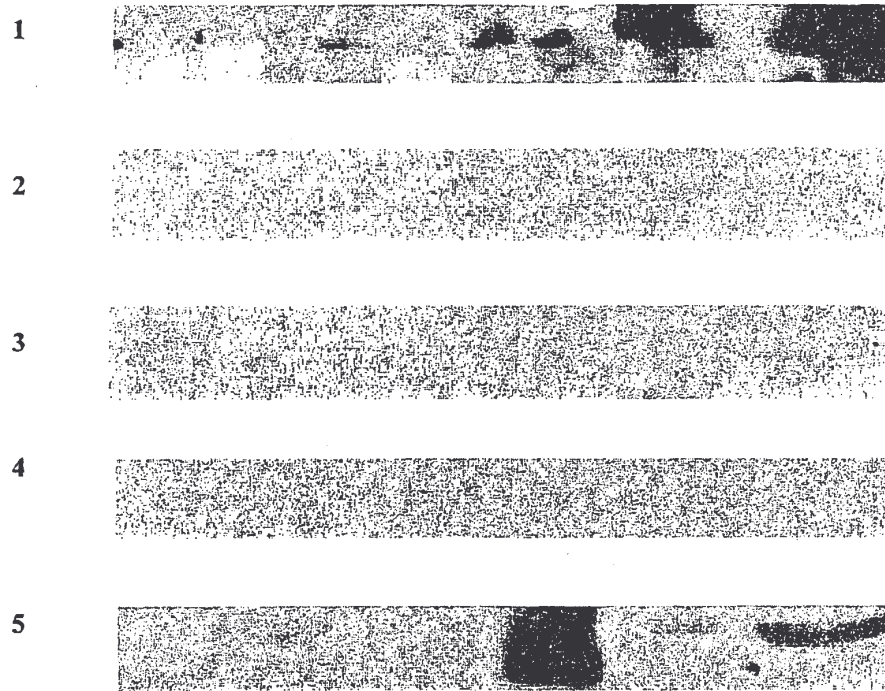


Figura 10. Densitometría de barrido de los datos mostrados en la Figura 9. Puntteney y Forsberg.

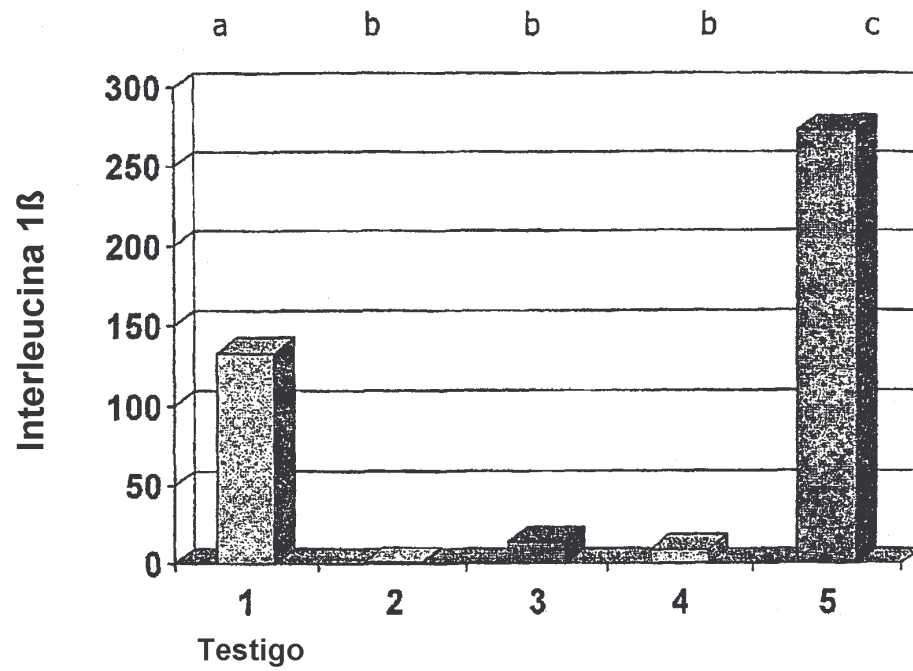


Figura 11. Concentraciones de *Aspergillus fumigatus* en muestras de sangre tomadas de las ovejas el día 28. Puntenney y Forsberg.

