



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 696**

51 Int. Cl.:  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A23L 1/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98912540 .6**  
96 Fecha de presentación : **03.04.1998**  
97 Número de publicación de la solicitud: **0996423**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2000**

54 Título: **Un método para producir dulces de gelatina que contienen anticuerpos.**

30 Prioridad: **03.04.1997 PCT/FI97/00208**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.11.2011**

73 Titular/es: **Elias Hakalehto**  
**Kasarmikatu 12 C 1**  
**70110 Kuopio, FI**  
**Oy REAGENA Ltd.**

72 Inventor/es: **Hakalehto, Elias**

74 Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 367 696 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

Un método para producir dulces de gelatina que contienen anticuerpos.

El objeto de la invención es un método para producir dulces de gelatina que contienen anticuerpos.

5 La naturaleza tiene sus propios componentes probióticos como los anticuerpos. Las proteínas anticuerpos se encuentran en la mayoría de los animales, y son los componentes claves de la inmunidad humoral y proporcionan una defensa primaria contra los microbios invasores. Los anticuerpos consisten en cuatro cadenas polipeptídicas que conforman la molécula funcional, que tiene dos sitios de unión a antígenos y un marco o armazón que tiene otras funciones biológicas. Una especificidad de unión es una función muy importante de los anticuerpos que les permite ser usados en la identificación y eliminación de estructuras extrañas, tales como microbios. Una vez que se ha activado el mecanismo de defensa del cuerpo por el material extraño, se forman contra él los anticuerpos específicos. La capacidad de unión única de los anticuerpos ayuda al cuerpo a eliminar el material perjudicial. Además de la inmunidad natural, los mecanismos de defensa del cuerpo pueden ser reforzados adicionalmente administrando anticuerpos externos que ejercen efectos terapéuticos y preventivos. Una vez que el cuerpo encuentra los microbios patógenos, el ataque de la enfermedad puede tener lugar dentro de pocos días o incluso pocas horas después de la invasión. Debido al sistema inmunitario activado, la aparición de anticuerpos específicos en los fluidos corporales que empieza a alcanzar su nivel terapéutico en pocos días o semanas conduce a la pérdida de la virulencia y recuperación de la enfermedad. La disminución del título de anticuerpos a los valores normales tarda unas cuantas semanas después de que el material extraño haya sido eliminado del cuerpo.

20 La capacidad de los anticuerpos de unirse a sus moléculas dianas muy específicamente ha sido explotada en la investigación biomédica y en el diagnóstico de enfermedades durante varias décadas. Además de investigación y diagnóstico las aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos ha subido en interés. Estas innovaciones están basadas en el uso de anticuerpos fabricados experimentalmente que imitan la función de los anticuerpos naturales del cuerpo. En aplicaciones preventivas, los anticuerpos administrados externamente pueden ralentizar la invasión de microbios patógenos hasta que la inmunidad natural esté lista para tomar el control de la invasión. Las posibles dianas de las terapias con anticuerpos pueden variar desde el uso clásico de suero inmunitario contra mordeduras de serpientes difíciles de gestionar hasta las modernas aplicaciones para el control de numerosos defectos inmunológicos.

25 A pesar de las ventajas evidentes de usar anticuerpos como componentes terapéuticos, su uso generalizado se ha enfrentado a numerosos problemas incluyendo el alto coste de su producción y seguridad. Los anticuerpos purificados del suero de animales de sangre caliente pueden contener agentes infecciosos extraños, además de que la inyección de anticuerpos alotípicos puede contribuir a la enfermedad del suero que en el peor de los casos puede ser letal.

30 De acuerdo con nuestro conocimiento actual, los anticuerpos de la yema de huevo proporcionan una alternativa no costosa y conveniente a los anticuerpos de mamíferos en las aplicaciones en las cuales el anticuerpo se administra al conducto gastrointestinal. Debido a nuestros métodos de purificación eficaces, hemos podido usar satisfactoriamente anticuerpos de yema de huevo en muchas aplicaciones de diagnóstico. De acuerdo con muchas publicaciones, los anticuerpos de la yema de huevo preparados después de la inmunización experimental con microbios o antígenos microbianos intactos probaron ser útiles en la prevención y recuperación de algunas enfermedades infecciosas en modelos animales. El método de preparar anticuerpos de la yema de huevo evita la extracción de sangre, reduciendo por tanto la tensión de los animales de producción. Esto hace más fácil cumplir las normas legales establecidas para los animales de experimentación, y además reduce el riesgo de contaminaciones de la sangre.

35 Se han producido en gallinas anticuerpos contra varios tipos de antígenos. Estos incluyen proteínas y polipéptidos, naturales y sintéticos de diferentes estructuras de células microbianas. Las gallinas se han revelado como unos productores muy eficaces de anticuerpos, igualando a la producción de grandes animales domésticos. Los anticuerpos específicos pueden ser aislados de la yema de huevo incluso después de dos semanas de la primera inmunización, tras lo cual la producción continúa durante al menos 100 días. Un huevo puede contener tanto como 150-200 mg de anticuerpos, de los cuales hasta el 5% pueden ser específicos de antígenos. En términos de coste por dosis terapéutica, la tecnología de la yema de huevo supera a cualquier otro método por aplicaciones comparativas.

40 Los antígenos que proceden de microbios patógenos pueden ser tratados con productos químicos o irradiación con rayos gamma para erradicar su virulencia en el hombre u otros animales. Una vez que se ha alcanzado el nivel deseado de anticuerpos en las yemas, éstas se homogeneizan y/o los anticuerpos se purifican hasta homogeneidad, se filtran para esterilización y se añaden a las formulaciones finales para dar su efecto probiótico y terapéutico.

45 Las membranas mucosas de las vías respiratorias proporcionan una puerta de entrada al cuerpo de muchos microbios perjudiciales. El aire respirado y los alimentos ingeridos aportan micro-organismos que atacan a las membranas mucosas del conducto respiratorio o gastrointestinal (GI) por donde pueden penetrar en el cuerpo y causar infección y el comienzo de una enfermedad. El cuerpo se defiende por sí mismo contra los invasores secretando inmunoglobulinas A y E (IgA, IgE) a las membranas mucosas, en donde se fijan a los organismos perjudiciales impidiendo su unión a los tejidos, y por tanto su penetración en el cuerpo. A veces este mecanismo, y los otros implicados, fallan en impedir la invasión debido parcialmente al periodo de carencia en suministrar anticuerpos reactivos a las membranas. A veces esto conduce al comienzo de la enfermedad. En el curso de la enfermedad, los anticuerpos reactivos se producen en la sangre donde inactivan al invasor, mientras los anticuerpos de la mucosa impiden la invasión de nuevos organismos.

Cuando los anticuerpos externos se administran a las membranas mucosas, pueden ayudar al sistema inmunitario natural del cuerpo proporcionando la primera línea de defensa que impide la unión y la penetración de micro-organismos invasores. Las dianas potenciales de los anticuerpos adicionales son:

- infecciones de los conductos gastrointestinal y respiratorio
- 5 - caries dental
- otitis y otras infecciones del oído medio.

La caries dental es, de acuerdo con el conocimiento actual, causada por bacterias de la boca. La fabricación experimental que hace uso de anticuerpos específicos ha demostrado la eficacia de los anticuerpos en la prevención de la caries dental en modelos de animales.

- 10 Las infecciones de las vías respiratorias con sus complicaciones secundarias pueden causar enfermedades graves particularmente en niños y personas de edad avanzada. Los tratamientos, si hay alguno disponible, de estas enfermedades son ineficaces y requieren un largo periodo de tiempo. Las estructuras ciliales de las cavidades del conducto respiratorio superior transportan partículas a la faringe. Este mecanismo es una parte importante del sistema de defensa del cuerpo. Las infecciones de las vías respiratorias destruyen la estructura ciliar, exponiendo el cuerpo a nuevos
- 15 invasores. En el peor de los casos, esto puede conducir a recidivas. La administración de anticuerpos reactivos contra el agente patógeno implicado puede impedir la infección real o detener la recurrencia de nuevas infecciones.

El objeto de la invención es presentar un método sencillo de producir dulces de gelatina que contienen anticuerpos. Además la finalidad es presentar un método con bajos costes de producción.

El objetivo de la invención se consigue con el método descrito en las reivindicaciones.

- 20 Esta invención usa las propiedades generales de los anticuerpos de ejercer efectos terapéuticos, y un modo conveniente para administrar los anticuerpos al conducto gastrointestinal (GI) y al respiratorio en una formulación basada en una mezcla de dulces de gelatina normales, tales como mermelada, y anticuerpos homogéneos o no homogéneos. Los anticuerpos de la mezcla pueden ser de orígenes de yema de huevo o de calostro. El calostro es la primera leche que una vaca produce después del parto y es rico en anticuerpos. De acuerdo con la invención, los principales beneficios de
- 25 usar dulces de gelatina como medio para administrar los anticuerpos son como sigue:

- el pH del medio puede ser ajustado alrededor del neutro lo cual es óptimo para los anticuerpos
- la composición polisacarídica de los dulces de gelatina mantiene la estabilidad de los anticuerpos
- los dulces de gelatina pueden alojar cantidades adecuadas de anticuerpos sin pérdida de su sabor
- la fabricación de dulces de gelatina ocurre a bajas temperaturas antes de que se permita a los dulces enfriarse

30 sin ninguna elevación posterior de la temperatura

- cuando se mastican, sorben o muerden, los dulces de gelatina se disuelven lentamente en el interior de la boca en donde tienen tiempo suficiente para ocupar las membranas de las mucosas. Las dosis repetidas de dichos dulces de gelatina potencian sus efectos probióticos y terapéuticos.

- 35 Los anticuerpos usados en la invención pueden ser anticuerpos naturales de calostro o yema de huevo, o pueden ser producidos experimentalmente por inmunización con los antígenos capaces de desencadenar una respuesta terapéutica. Los anticuerpos pueden ser homogéneos o parcialmente purificados de las fuentes antes mencionadas. Para purificación son eficaces la extracción con agua, la precipitación con sal o los métodos de micro- y ultrafiltración separadamente o en combinación. Los dulces de gelatina se pueden preparar por los métodos generales, y los anticuerpos se pueden añadir en forma líquida o sólida en cualquier etapa de la producción.

- 40 En general, los anticuerpos se pueden producir contra micro-organismos conocidos. Dianas especialmente potenciales para la innovación son:

- influenza (gripe), parainfluenza, RSV-, adeno-, rhino-, EBV-, citomegalo-, rota- y entero-virus
- bacterias o virus que causan inflamaciones en el conducto respiratorio o el gastrointestinal.
- microbios que causan enfermedades de la boca y los pies (por ej. *Streptococcus mutaras*)

45 - otros microbios que producen sustancias perjudiciales en el cuerpo.

Los anticuerpos se pueden producir también para eliminar las influencias de toxinas y otras sustancias que pueden ser tóxicas o perjudiciales (por ejemplo, toxinas del medio ambiente). Con la ayuda de esta invención es posible aumentar el lavado de organismos o compuestos perjudiciales del cuerpo. También impide la función de microbios o su reproducción evitando el transporte de moléculas esenciales a través de la pared celular o desplazando o fijando las células

microbianas que causan su distribución. La invención puede también aglutinar microbios perjudiciales de un modo en el que lleguen a ser eliminados por lavado del cuerpo, o lleguen a ser transportados otros lugares del cuerpo donde pierden su virulencia.

5 Los anticuerpos se pueden unir también a otras moléculas para aumentar sus efectos promotores de la salud usando métodos generales de acoplamiento. Estas moléculas efectoras pueden ser antibióticos, compuestos opsonisantes, lectinas, componentes que inhiben o estimulan el crecimiento de ciertos microbios, enzimas, cofactores u otras moléculas correspondientes. La unión de estos componentes a los anticuerpos se puede conseguir con diferentes métodos química o físicamente.

10 En la fabricación de dulces que contienen anticuerpos bioactivos, es muy importante que las condiciones durante su producción y conservación estén controladas para preservar la bioactividad, puesto que un pH anormal, la temperatura, la concentración de sal o productos químicos inadecuados pueden destruir la bioactividad de los anticuerpos. También es posible añadir soluciones tamponadas, trehalosas u otras moléculas que ayudan a la conservación de anticuerpos.

#### Ejemplo 1.

15 Se produjeron anticuerpos en una gallina (A) inyectándole un péptido consistente en los aminoácidos 1-29 del extremo amino de la hormona paratiroidea humana. Los anticuerpos producidos contra este péptido se aislaron y purificaron de la yema de huevos puestos por la gallina A por un método previamente conocido.

25 mg del anticuerpo producido se añadieron a un dulce de mermelada (Vihreä kuula, Fazer, Helsinki, Finlandia) retirando la cantidad correspondiente de mermelada del interior del dulce y reuniendo las partes de nuevo. El peso del dulce fue 21,5 g y el pH fue 3,51.

20 El dulce de mermelada que contenía el anticuerpo fue administrado a un sujeto humano. Después de 5 minutos se le dieron al sujeto 10 ml de solución salina estéril para enjuagar la boca durante 30 segundos. Esto sirvió como muestra que se examinó como en la Figura 1. Mermelada sin suplemento de anticuerpo que fue ingerida 5 minutos antes del experimento sirvió como ensayo en blanco.

Los resultados se muestran en la Figura 1, que se explica más adelante.

#### Ejemplo 2.

30 Un dulce que contenía un anticuerpo terapéutico anticuerpo se produjo por el siguiente método: Se calentaron 200 ml de agua hasta el punto de ebullición y se le añadieron 5 g agar-agar. La solución se hirvió 30 minutos para conseguir que el agar-agar se solubilizara. A continuación se añadieron 14,5 g de azúcar, 3,7 g de xilitol y 50 g de mermelada de mora de los pantanos (*Rubus chamaemorus*) (de Kesko, Finlandia). La solución se congeló a 55°C y se vertió en moldes de 7 ml. A continuación se añadieron 25 mg del anticuerpo de acuerdo con el ejemplo 1 en 0,4 ml de solución salina. Durante la adición, la temperatura fue alrededor de 40°C y la solución empezó a adquirir la forma del molde. El pH de la mermelada final fue 4,27.

El sujeto humano comió la mermelada y a continuación se le tomó una muestra y se analizó como en el ejemplo 1. La mermelada sin suplemento fue preparada, ingerida y analizada correspondientemente sirvió como ensayo en blanco.

35 Los resultados se muestran en la Figura 1.

40 La Figura 1 presenta los experimentos 1 y 2 con la mermelada terapéutica. Los experimentos se realizaron como se describe en el texto. Después de tomar muestras, partes alícuotas de las muestras se diluyeron con el tampón de ensayo Elisa (PBS-2% BSA-0,05% Tween 20-0,05% proclina-300) y se analizaron en una placa de microtitulación que estaba revestida con el antígeno peptídico y bloqueada con BSA-PBS. Se usaron el anticuerpo anti-pollo/pavo de conejo acoplado a fosfatasa alcalina como un anticuerpo secundario y fosfato de paranitrofenilo como sustrato. Las muestras de mermelada sin suplemento usadas como ensayo en blanco dieron resultados negativos (Absorción <0,15).

45 Los resultados de los ejemplos 1 y 2 (método Elisa) se presentan en la Figura 1. El control muestra la situación, cuando se añadieron 25 mg del anticuerpo a los 10 ml de solución salina fisiológica y se tomaron 50 µg/l de esta muestra y se analizaron del modo descrito en el ejemplo 1. Los resultados muestran que bajando el pH disminuye la unión biológica del anticuerpo. De un modo similar la regulación del pH (tamponamiento) mantiene la unión del anticuerpo. Cuando el anticuerpo fue vertido en agarosa (mermelada de mora de los pantanos), un alto contenido de azúcar puede haber ayudado a la restauración de la actividad biológica del anticuerpo a un pH bajo. Los resultados indican que los anticuerpos añadidos a la mermelada se disolvieron y retuvieron en la boca en donde se les pudo tomar una muestra y analizar respecto a la unión al antígeno original.

50

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de producir dulces gelatinosos, caracterizado porque se añaden anticuerpos a dulces similares o geles o gelatinosos o a mermeladas a baja temperatura antes de que los dulces se dejen enfriar sin elevar la temperatura posteriormente.
- 5 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque los anticuerpos se añaden a temperaturas alrededor de 40°C.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque los anticuerpos se añaden a los dulces después que la solución se vierte en moldes.
- 10 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque los anticuerpos se añaden a los dulces antes de que solidifiquen dichos dulces.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque los anticuerpos se añaden a los dulces en cavidades dentro de los dulces, después de que los dulces se han solidificado.
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque los anticuerpos proceden de calostro o leche.
- 15 7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque los anticuerpos proceden de yemas de huevos de gallina o de otras aves.
8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque los anticuerpos se filtran en condiciones estériles o se purifican.
- 20 9. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 7 y 8, caracterizado porque los anticuerpos se extraen primeramente de la yema de huevos a una solución y se filtran en condiciones estériles antes de la adición.
10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1- 9, caracterizado porque se ajusta el pH de los dulces gelatinosos.
- 25 11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizado porque los anticuerpos en el interior de los dulces gelatinosos se conservan usando soluciones tamponadas, trehalosas u otros azúcares u otras moléculas correspondientes para ayudar a la conservación de los anticuerpos.

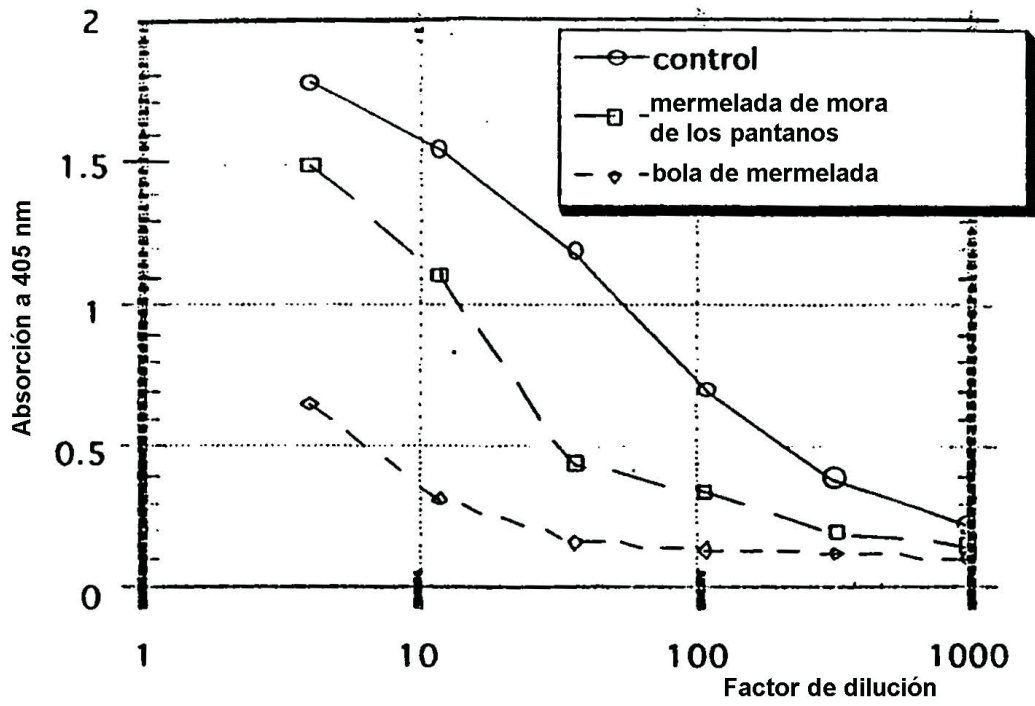


FIGURA 1