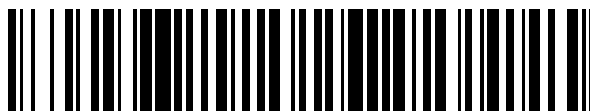


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 015**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/24** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 35/02** (2006.01)

**A61K 35/20** (2006.01)

**C07K 14/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2004 E 04784242 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 1670894**

54 Título: **Composiciones que incluyen diferentes tipos de factores de transferencia, métodos para elaborar las composiciones, y métodos de tratamiento usando las composiciones**

30 Prioridad:

**15.09.2003 US 663353**

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

**31.03.2014**

73 Titular/es:

**4LIFE PATENTS, LLC (100.0%)  
9850 South 300 West  
Sandy, UT 84070-3262, US**

72 Inventor/es:

**LISONBEE, DAVID;  
HENNEN, WILLIAM J. y  
DAUGHERTY, F. JOSEPH**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 452 015 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones que incluyen diferentes tipos de factores de transferencia, métodos para elaborar las composiciones, y métodos de tratamiento usando las composiciones.

5

Campo técnico

La presente invención se refiere generalmente a composiciones que incluyen factor de transferencia y, más específicamente, a composiciones que incluyen factor de transferencia a partir de diferentes tipos de animales de origen. La presente invención también se refiere a métodos para elaborar composiciones que incluyen diferentes tipos de factores de transferencia.

10

Antecedentes

Muchos patógenos mortales se transmiten a los seres humanos del reino animal. Por ejemplo, los monos son las fuentes del virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (HIV-I), que causa el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS) y la viruela de los monos, que es similar a la viruela; los mamíferos habitan en el suelo se cree que son la fuente del virus Ebola, los murciélagos de la fruta y los cerdos son la fuente del virus Nipah, el virus Hendra proviene de caballos, el virus responsable de la "gripe de Hong Kong" originada en los pollos y aves silvestres, especialmente los patos, son las fuentes de muchos de los virus de la gripe mortal. Muchas enfermedades también tienen reservorios animales. En forma de ejemplo, los ratones portan el virus Hanta, las ratas portan la peste negra, y los ciervos portan la enfermedad de Lyme.

20

*El sistema Inmune*

25

Los sistemas inmunes de los vertebrados están equipados para reconocer y defender el cuerpo contra los organismos invasores patógenos, como los parásitos, bacterias, hongos y virus. Los sistemas inmunes de los vertebrados incluyen típicamente un componente celular y un componente no celular.

El componente celular de un sistema inmune incluye los llamados "linfocitos," o las células blancas de la sangre, de los cuales hay varios tipos. Este es el componente celular de un sistema inmune maduro que típicamente soporta, la respuesta no específica primaria a los patógenos invasores, así como se implica en una respuesta específica secundaria a los patógenos.

30

En la respuesta primaria, o inicial, a una infección por un patógeno, las células blancas de la sangre que son conocidas como fagocitos localizan y atacan a los patógenos invasores. Típicamente, un fagocito internalizará o "comerá" un patógeno, después digerirá el patógeno. Además, las células blancas de la sangre producen y excretan productos químicos en respuesta a las infecciones patogénicas que están destinadas a atacar a los patógenos o ayudar a dirigir el ataque a patógenos.

35

Sólo si una infección por patógenos invasores continua evadiendo la respuesta inmune primaria es que se necesita una respuesta inmune secundaria, específica al patógeno. Como esta respuesta inmune secundaria se retrasa típicamente, esto también se conoce como "hipersensibilidad de tipo retardado." Un mamífero, por sí mismo, típicamente no estimulará una respuesta inmune secundaria a un patógeno hasta aproximadamente siete (7) a aproximadamente catorce (14) días después de haberse infectado con el patógeno. La respuesta inmune secundaria también se conoce como una inmunidad adquirida a patógenos específicos. Los patógenos tienen una o más proteínas características, que se conocen como "antígenos." En una respuesta inmune secundaria, las células blancas de la sangre conocidas como linfocitos B, o "células B," y los linfocitos T, o "células T," "aprenden" a reconocer uno o más de los antígenos de un patógeno. Las células B y las células T funcionan en conjunto para generar proteínas llamadas "anticuerpos," que son específicos para (*por ejemplo*, configurados para unirse o de lo contrario "reconocer") uno o más de ciertos antígenos en un patógeno.

40

45

50

Las células T son las principales responsables de la hipersensibilidad de tipo retardado o respuesta inmune secundaria, a un patógeno o agente antigénico. Hay tres tipos de células T: células T auxiliares, células T supresoras y células T específicas de antígeno, que también se refieren como citotóxica (que significa "células asesinas") linfocitos T (CTLs), o células T asesinas o células asesinas naturales (NK). Las células T auxiliares y T supresoras, aunque no especifican para ciertos antígenos, realizan funciones de acondicionamiento (*por ejemplo*, la inflamación que acompaña típicamente a una infección) que ayudan en la eliminación de patógenos o agentes antigénicos de un huésped infectado.

55

60

Los anticuerpos, que integran sólo una parte del componente no celular de un sistema inmune, reconocen antígenos específicos y, por lo tanto, se dice que son "antígeno específicos." Los anticuerpos generados a continuación, básicamente ayudan a las células blancas de la sangre en localizar y eliminar el patógeno del cuerpo. Típicamente, una vez que una célula blanca de la sangre ha generado un anticuerpo contra un patógeno, la célula blanca de la sangre y todos sus progenitores continúan para producir el anticuerpo. Después que se elimina una infección, un pequeño número de células T y células B que corresponden a los antígenos reconocidos se conservan en un estado

65

de "reposo". Cuando los agentes antigénicos o patógenos correspondientes reinfectan el huésped, las células T y células B en "reposo" se activan y, en cuarenta y ocho (48) horas, inducen una respuesta inmune rápida. Al responder de esta manera, el sistema inmunitario soporta una respuesta inmune secundaria a un patógeno, se dice que el sistema inmune tiene una "memoria" para ese patógeno.

Los sistemas inmunes de mamíferos también son conocidos por producir proteínas más pequeñas, conocidas como "factores de transferencia," como parte de una respuesta inmune secundaria a la infección de patógenos. Los factores de transferencia son otra parte no celular de un sistema inmune de los mamíferos. Los factores de transferencia antigénico específicos se cree que son estructuralmente análogos a los anticuerpos, pero en una escala molecular mucho menor. Tanto los factores de transferencia antigénico específicos como los anticuerpos incluyen sitios antigénico específicos. Además, tanto los factores de transferencia como los anticuerpos incluyen regiones altamente conservadas que interactúan con sitios receptores en sus respectivas células efectoras. En moléculas de factores de transferencia y de anticuerpos, una tercera región, "conectora," conecta los sitios antigénico específicos y las regiones altamente conservadas.

#### *El Papel de los Factores de Transferencia en el Sistema Inmune*

El factor de transferencia es un aislado de bajo peso molecular de los linfocitos. Estrechamente, los factores de transferencia pueden tener especificidad para antígenos individuales. Las patentes de Estados Unidos 5,840,700 y 5,470,835, las dos concedidas a Kirkpatrick y otros (de aquí en adelante colectivamente referidas como "las patentes de Kirkpatrick"), describen el aislamiento de factores de transferencia que son específicos para ciertos antígenos. En términos más generales, los factores de transferencia "específicos" se han generado a partir de cultivos celulares de linfocitos monoclonales. Incluso si se generan estos factores de transferencia contra un único patógeno, ellos tienen especificidad para una variedad de sitios antigénicos de ese patógeno. Por lo tanto, estos factores de transferencia se dice que son " patógeno específicos" en lugar de antigénico específicos. Del mismo modo, los factores de transferencia que se obtienen de un huésped que ha sido infectado con un determinado patógeno son patógeno específicos. Aunque tales preparaciones se denominan a menudo en la técnica como "antígeno específicas" debido a su capacidad para estimular una respuesta inmune secundaria cuando un antigénico en particular está presente, los factores de transferencia que tienen diferentes especificidades también pueden estar presentes en tales preparaciones. Por lo tanto, incluso las llamadas preparaciones de factores de transferencia "antígeno específicas", patógeno específicas pueden ser específicos para una variedad de antígenos.

Además, se cree que los factores de transferencia patógeno específicos y antigénico específicos pueden causar en un huésped estimular una respuesta inmune de hipersensibilidad de tipo retardado a patógenos o antígenos para los que tales moléculas de factores de transferencia no son específicos. El factor de transferencia "atrae" al menos las células T no específicas, las células T inductoras y células T supresoras, a un patógeno infeccioso o agente antigénico para facilitar una respuesta inmune secundaria o hipersensibilidad de tipo retardada, al patógeno que infecta o agente antigénico.

Típicamente, el factor de transferencia incluye un aislado de proteínas que tienen pesos moleculares de menos de aproximadamente 10,000 daltons (D) que se han obtenido a partir de fuentes de mamífero inmunológicamente activas. Se sabe que el factor de transferencia cuando se añade *in vitro* o *in vivo* a sistemas de células inmunes de mamífero, mejora o normaliza la respuesta del sistema inmune del mamífero receptor.

El sistema inmune de los recién nacidos por lo general no se ha desarrollado, o "madurado," lo suficiente como para defender efectivamente al recién nacido de los patógenos invasores. Por otra parte, antes del nacimiento, muchos mamíferos están protegidos de una amplia variedad de patógenos por sus madres. Por lo tanto, muchos mamíferos recién nacidos no pueden estimular inmediatamente una respuesta secundaria a una variedad de patógenos. Más bien, los mamíferos recién nacidos típicamente son dotados de inmunidad secundaria a patógenos por sus madres. Una forma en que se conoce que las madres fomentan el sistema inmune de los recién nacidos es proporcionando al recién nacido con un conjunto de factores de transferencia. En los mamíferos, el factor de transferencia es proporcionado por una madre al recién nacido en el calostro, que se sustituye típicamente por la leche de la madre después de un día o dos. El factor de transferencia transfiere básicamente la inmunidad específica, adquirida (es decir, hipersensibilidad de tipo retardado) de la madre al recién nacido. Esta inmunidad transferida típicamente condiciona las células del sistema inmune del recién nacido para reaccionar contra patógenos de una manera antigénico específica, así como en forma patógeno o antigénico no específica, hasta que el sistema inmune del recién nacido es capaz por sí solo de defender al recién nacido de patógenos. Por lo tanto, cuando el factor de transferencia está presente, el sistema inmune del recién nacido está condicionado para reaccionar a patógenos con una respuesta de hipersensibilidad, tal como la que se produce con una típica respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado. En consecuencia, se dice que el factor de transferencia "impulsa" la sensibilidad del sistema inmune a los patógenos.

Gran parte de la investigación que involucra factores de transferencia se ha realizado en los últimos años. Actualmente, se cree que el factor de transferencia es una proteína con una longitud de aproximadamente cuarenta y cuatro (44) aminoácidos. El factor de transferencia tiene típicamente un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 3,000 a aproximadamente 5,000 Daltons (Da), o aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 5

kDa, pero puede ser posible que moléculas de factor de transferencia tengan pesos moleculares fuera de este intervalo. El factor de transferencia también se cree que incluya tres fracciones funcionales, cada una de las cuales pueden incluir diferentes tipos de moléculas de factores de transferencia de: una fracción inductora; una fracción inmune supresora, y una fracción antígeno específica. Muchos en la técnica creen que el factor de transferencia incluye también una porción de nucleósido, que podría estar conectado a la molécula de proteína o separada de ella, lo que puede mejorar la capacidad del factor de transferencia para hacer que un sistema inmune de mamíferos estimule una respuesta inmune secundaria. La porción de nucleósido puede ser parte de las fracciones inductoras o supresoras del factor de transferencia.

Se cree que la región antígeno específica de los factores de transferencia antígeno específicos comprenda aproximadamente ocho (8) a aproximadamente doce (12) aminoácidos. Una segunda región altamente conservada de aproximadamente diez (10) aminoácidos se piensa que es una región de muy alta afinidad de unión al receptor de células T. Los aminoácidos restantes pueden servir para unir las dos regiones activas o pueden tener propiedades adicionales, aún por descubrir. La región antígeno específica de una molécula de factor de transferencia, que es análoga a la estructura antígeno específica de un anticuerpo conocido, pero en una escala de peso molecular mucho más pequeña, parece ser hipervariable y está adaptada para reconocer una proteína característica en uno o más patógenos. Las fracciones inductoras y supresoras inmunes se cree que imparten factor de transferencia con su capacidad para acondicionar las diversas células del sistema inmune de manera que las células son totalmente más sensibles a los estímulos patogénicos en su entorno.

*Fuentes de los componentes del sistema inmune no celular*

Convencionalmente, el factor de transferencia se ha obtenido del calostro de vacas lecheras, tales como por el método descrito en la patente de los Estados Unidos 4,816,563 otorgada a Wilson y otros (de aquí en adelante "Wilson"). Mientras que las vacas lecheras se caracterizan por producir grandes cantidades de calostro y, por lo tanto, grandes cantidades de factor de transferencia a través de un período relativamente corto de tiempo, las vacas lecheras sólo producen calostro durante un día o un día y medio cada año. Por lo tanto, las vacas lecheras no son ni una fuente constante de factores de transferencia, ni una fuente eficiente de factores de transferencia.

El factor de transferencia también se ha obtenido a partir de una amplia variedad de otras fuentes de mamíferos. Por ejemplo, en la investigación de factores de transferencia, los ratones se han usado como una fuente de factor de transferencia. Los antígenos se introducen típicamente por vía subcutánea en ratones, que luego se sacrifican seguido de una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado a los antígenos. El factor de transferencia se obtiene entonces a partir de células de bazo de los ratones.

Aunque diferentes mecanismos se usan típicamente para generar la producción de anticuerpos, la fuente original de anticuerpos también puede ser de mamífero. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener por inyectar un ratón, un conejo, u otro mamífero con un antígeno, obteniendo células productoras de anticuerpos del mamífero, después fusionar las células productoras de anticuerpos con células inmortalizadas para producir una línea celular de hibridoma, que continuará produciendo los anticuerpos monoclonales a lo largo de varias generaciones de células y, por lo tanto, durante largos períodos de tiempo.

Los anticuerpos contra los patógenos de mamíferos se han obtenido a partir de una amplia variedad de fuentes, incluyendo ratones, conejos, cerdos, vacas y otros mamíferos. Además, los patógenos que causan algunas enfermedades humanas, tales como el resfriado común, se sabe que se originan en las aves. Como se ha llegado a reconocer que los sistemas inmunes aviares (es decir, de aves) y los sistemas inmunes de mamíferos son muy similares, algunos investigadores han recurrido a las aves como una fuente para generar anticuerpos.

Los anticuerpos aviares que son específicos para los patógenos que infectan mamíferos, o "patógenos de mamíferos," se han obtenido por introducir antígenos en los huevos. Alternativamente, los anticuerpos pueden estar presentes en los huevos después de la exposición del animal fuente a antígenos, incluyendo antígenos de patógenos de mamíferos. La patente de Estados Unidos 5,080,895, concedida a Tokoro el 14 de enero de 1992 (de aquí en adelante "la patente 895"), describe un método que incluye inyectar gallinas con los patógenos que causan enfermedades infecciosas intestinales en los mamíferos neonatales. Las gallinas después producen anticuerpos que son específicos para estos patógenos, que están presentes en los huevos puestos por las gallinas. La patente 895 describe composiciones que incluyen estos anticuerpos específicos de patógenos y el uso de éstas para tratar y prevenir enfermedades intestinales en lechones y terneros neonatales. Sin embargo, el tratamiento de las infecciones patogénicas en los mamíferos con anticuerpos aviares puede tener resultados no deseados, dado que los sistemas inmunes de mamíferos pueden responder negativamente a las grandes moléculas de anticuerpos aviares por estimular una respuesta inmune a los propios anticuerpos. Además, como los sistemas inmunes de mamíferos no reconocen anticuerpos aviares como útiles por sus capacidades de reconocer ciertos patógenos, o las especificidades de anticuerpos aviares para antígenos de tales patógenos, los anticuerpos aviares frecuentemente no estimulan la respuesta inmune deseada en los mamíferos.

También se sabe que los factores de transferencia se pueden obtener a partir de huevos. La patente de los Estados Unidos 6,468,534 otorgada a Hennen y otros (de aquí en adelante "Hennen") describe un proceso por el cual pollos

hembra (es decir, gallinas) se exponen a uno a más antígenos, que resultan en la estimulación de una respuesta inmune, que incluyen una respuesta inmune secundaria, por los pollos.. Como resultado de la respuesta inmune secundaria, las moléculas de factores de transferencia están presentes en los huevos de los pollos. Los huevos pueden ser después procesados para proporcionar un producto en el que el factor de transferencia está presente.

5 Tal producto puede tomar la forma de un polvo de huevo secado por aspersión o secado por congelación, o liofilizada, y puede incluir todo o parte del huevo. El polvo de huevo puede se puede incorporar después directamente en cápsulas de gelatina o se mezcla con otras sustancias luego se introduce en cápsulas de gelatina.

10 La Figura 2 representa esquemáticamente el equipo de encapsulación de un tipo que es actualmente útil para encapsulación de factor de transferencia aviar derivado de huevo en la forma de un polvo de huevo. El equipo de encapsulación 20 incluye una tolva de alimentación de composición 24, una estación de alimentación 28, y un tornillo 26 en la comunicación entre cada tolva de alimentación de composición 24 y la estación de alimentación 28. El tornillo 26 transporta el polvo de huevo completo de la tolva de alimentación de composición 24 a la estación de alimentación 28.

15 Cuando el tornillo 26 opera, este se calienta a una temperatura que excede el punto de fusión relativamente bajo del colesterol, de yema de huevo, en el polvo de huevo. El colesterol calentado es pegajoso, cubriendo el tornillo 26, el conducto en comunicación con éste, y la estación de alimentación 28, disminuyendo de ese modo la eficiencia con la que el equipo de encapsulación 20 opera. Por consiguiente, el equipo de encapsulación se debe desarmar y limpiar periódicamente, que puede tomar una cantidad considerable de 5 veces (*por ejemplo*, hasta aproximadamente 8 horas), lo que resulta en una disminución significativa en la productividad del equipo de encapsulación 20 y, por tanto, el número de cápsulas que se pueden formar con éste. Por tanto, procesar el polvo de huevo completo para obtener un producto que contiene factores de transferencia es un tanto indeseable.

25 Además, las composiciones que se derivan de productos (*por ejemplo*, huevos o calostro) de un animal de origen único típicamente solo incluyen moléculas de factores de transferencia que tienen especificidad a antígenos a los que el animal de origen se ha expuesto. La consecuencia de tal exposición limitada puede ser que la efectividad de tales composiciones que contienen factores de transferencia en prevenir o tratar ciertos tipos de infecciones o condiciones está también limitada.

30 En consecuencia, existe una necesidad por una composición que es útil para causar que un sistema inmune de un sujeto tratado estimule una respuesta inmune a una colección más amplia de patógenos, así como para un método para mejorar la eficiencia y productividad con la que la encapsulación y otro equipo que forma la composición opera.

35 Descripción de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición de acuerdo con la reivindicación 1, y un método para formar la composición de acuerdo con la reivindicación 13.

40 La presente invención incluye una composición para estimular una respuesta inmune mediada por células T en un sujeto. La composición incluye factor de transferencia de al menos dos tipos diferentes de animales de origen, concretamente factor de transferencia bovino y de pollo. El término "tipo," como se usa en la presente con respecto a los animales de origen, describe los animales de origen de los cuales el factor de transferencia se puede obtener y refiere a los animales de origen de diferentes clases (*por ejemplo*, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, insectos, etc.).

45 El término "tipo," como se usa en la presente, se refiere además a animales de origen de diferentes subclases, ordenes (*por ejemplo*, artiodáctilos, primates, carnívoros, etc.), familias (bovino, homínidos, felinos, etc.), subfamilias, géneros (*por ejemplo*, ganado, seres humanos, gatos domésticos, etc.), e incluso especies y subespecies. El uso del término "tipo" en la presente con respecto a factores de transferencia denota el tipo de animal de origen del que se obtiene el factor de transferencia.

50 La composición incluye factores de transferencia de animales de origen tanto de mamíferos como no mamíferos, concretamente factor de transferencia bovino y de pollo, cuyos tipos de factores de transferencia se refieren además en la presente como "factor de transferencia de mamífero" y "factor de transferencia no mamífero," respectivamente. En forma de ejemplo no limitante, el factor de transferencia de mamífero se puede incluir en la composición como calostro o una fracción o extracto de éste, que están referidos colectivamente en la presente como "productos derivados de calostro," o de cualquier otra forma, como se conoce en la técnica (*por ejemplo*, como un leucocito (célula blanca de la sangre) extracto, como extracto esplénico ("a partir del bazo"), etc.). Además por vía del ejemplo, el factor de transferencia no mamífero de la composición ilustrativa se puede obtener a partir de un huevo o una fracción o extracto de éste, los que se refieren además en la presente como "productos derivados de huevo." Se ha descubierto que cuando diferentes tipos de factores de transferencia se combinan y administran a un animal tratado

60 (*por ejemplo*, un mamífero), ocurre alguna sinergia.

65 Cuando una composición de la presente invención incluye a producto derivado de calostro y un producto derivado de huevo, ambos productos se pueden incluir en la mezcla en cantidades (*por ejemplo*, en peso, en volumen, etc., de la mezcla total) que son aproximadamente igual, o más de un producto derivado de calostro y el producto derivado de huevo que de otro. Los resultados experimentales muestran que el factor de transferencia a partir de animales de

- origen que tienen crías altamente dependientes, tal como vacas, induce una respuesta inmune secundaria relativamente rápida, con anergia (*es decir*, una falta de sensibilidad por las células blancas de la sangre de las moléculas del factor de transferencia) estableciéndose relativamente rápido. El factor de transferencia a partir de animales de origen que tienen crías altamente dependientes, tales como los pollos y otras aves gallináceas, no induce tan rápido una respuesta inmune secundaria, pero proporciona una respuesta inmune secundaria más sostenida. Por consiguiente, las concentraciones relativas de producto de transferencia derivados del calostro y de productos derivados de huevo pueden ser adaptados para estimular una respuesta inmune secundaria que se produce o se mantiene durante un periodo de tiempo determinado.
- 5
- 10 Los ingredientes adicionales también pueden ser incluidos en una composición que incorpora las enseñanzas de la presente invención. Por ejemplo, una composición de la presente invención puede incluir una o más vitaminas, minerales, proteínas, o productos naturales (*por ejemplo*, hierbas, hongos, raíces, etc.), o extractos de éstos. Los polisacáridos, en particular, se cree que proporcionan sinergia adicional en la efectividad de una composición de la presente invención en la obtención de respuesta inmune secundaria en los animales tratados. Los polisacáridos ilustrativos están disponibles en forma de beta-glucanos y extractos de hongos (que, por supuesto, incluyen otros componentes).
- 15
- La presente invención incluye un método para procesar o fabricar un producto derivado de huevo que incluye factores de transferencia. El método inventivo de procesar o fabricar incluye mezclar un componente sustancialmente libre de grasa, concretamente un producto derivado de calostro, con el producto derivado de huevo antes o mientras el producto derivado de huevo se introduzca en el equipo de encapsulación. La encapsulación es un ejemplo de un método de procesamiento o fabricación en el que se pueden emplear tales técnicas.
- 20
- Además, se proporciona un método para reducir la frecuencia de limpieza de la fabricación o de otros equipos de procesamiento, tales como equipos de encapsulación, que se usan para procesar un producto derivado de huevo. Este método incluye mezclar una sustancia prácticamente libre de grasa o con menos grasa, como un producto derivado de calostro, con un producto derivado de huevo antes o durante la introducción del producto derivado de huevo en el equipo de procesamiento.
- 25
- 30 La composición de la presente invención se puede usar en métodos para tratar a un sujeto. Los métodos de tratamiento incluyen la administración de una composición de acuerdo con la presente invención a un sujeto. Como la composición incluye factor de transferencia, la administración de la composición al sujeto causará que el sistema inmune del sujeto estimule una respuesta inmune mediada por células T o mejorará una respuesta inmune mediada por células T por el sistema inmune del sujeto que ya está en proceso.
- 35
- Otras características y ventajas de la presente invención se harán evidentes para los expertos normales en la técnica mediante la consideración de la consiguiente descripción, los dibujos que se acompañan, y las reivindicaciones adjuntas.
- 40
- Breve descripción de las figuras
- En los dibujos, que representan modalidades ilustrativas de diversos aspectos de la presente invención:
- 45
- La Figura 1 representa un ejemplo de la manera en que una composición que incorpora enseñanzas de la presente invención puede ser realizada;
- La Figura 2 es una representación esquemática del equipo de encapsulación que se puede usar para introducir una modalidad en polvo de la composición de la presente invención en cápsulas de gelatina; y
- 50
- La Figura 3 ilustra esquemáticamente un protocolo de ensayo ilustrativo que se llevó a cabo para determinar la eficacia de varios aspectos de la presente invención.
- Mejor modo de llevar a la práctica la invención
- 55
- Una modalidad ilustrativa de la composición que incorpora enseñanzas de la presente invención incluye factor de transferencia a partir de al menos dos tipos diferentes de animales de origen, concretamente factor de transferencia bovino y factor de transferencia de pollo.
- 60
- Los diferentes tipos de factores de transferencia de la composición inventiva se pueden obtener de cualquier fuente adecuada. Por ejemplo, el factor de transferencia bovino puede obtenerse a partir de calostro, tal como se describe en Wilson o de otro modo como se conoce en la técnica (*por ejemplo*, un extracto de leucocito (célula blanca de la sangre), un extracto esplénico (*es decir*, "a partir del bazo"), etc.). Una fuente ilustrativa para el factor de transferencia de pollo es un huevo de un pollo, como se describe en Hennen. Por lo tanto, una composición de acuerdo con la presente invención puede incluir un primer componente que comprende calostro o una fracción o extracto de éste, que se denominan colectivamente en la presente como un "producto derivado de calostro", así
- 65

como un segundo componente que comprende huevo o una fracción o extracto de éste, que también se denomina en la presente como un "producto derivado de huevo."

5 Como composiciones que incorporan enseñanzas de la presente invención incluyen los factores de transferencia de diferentes tipos de animales de origen, pueden incluir moléculas de transferencia con una colección más amplia de especificidad por antígeno o especificidad por patógeno que las composiciones que contienen factores de transferencia convencionales. Por lo tanto, una composición de acuerdo con la presente invención es capaz de alistar el sistema inmune de un animal tratado para estimular una respuesta inmune mediada por células T contra una colección más amplia de agentes patógenos que aquellas contra las cuales las composiciones que contienen factores de transferencia convencionales son eficaces. Esto es porque los diferentes tipos de animales pueden estar expuestos a diferentes tipos de antígenos o patógenos, tales como mediante la vacunación, los entornos de los animales, o similares. Por otra parte, se sabe que algunas condiciones en ciertos animales son causadas por múltiples infecciones, incluso ampliar aún más la especificidad de una composición de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, uno o más patógenos pueden afectar negativamente (*por ejemplo*, suprimir o monopolizar) el sistema inmune del huésped, mientras que uno o más de otros patógenos se pueden dejar causar un estado de enfermedad en el huésped. Como otro ejemplo, algunos estados de enfermedad son causados por una combinación de patógenos.

20 Como un ejemplo, una composición que incluye componentes que contienen factor de transferencia tanto de vacas como de pollos incluirá moléculas de factores de transferencia que son específicos a antígenos o patógenos para los que se exponen las vacas, así como moléculas de factores de transferencia que tienen especificidad por antígenos o patógenos a los que los pollos están expuestos. Como las vacas y los pollos pueden estar expuestos a los antígenos o patógenos a los que el otro no está expuesto, tal composición puede incluir moléculas de factores de transferencia con especificidades a antígenos o patógenos que no estarían presentes en una composición que incluye sólo el factor de transferencia de las vacas (*por ejemplo*, en forma de un producto derivado de calostro) o factor de transferencia de pollos (*por ejemplo*, a través de un producto derivado de huevo).

30 Una composición de la presente invención puede incluir aproximadamente las mismas cantidades, medidas en términos de peso o volumen, de un producto derivado de calostro y un producto derivado de huevo (*es decir*, aproximadamente 50% del producto derivado de calostro y aproximadamente 50% del producto derivado de huevo). Alternativamente, una composición que incorpora enseñanzas de la presente invención puede incluir aproximadamente más del producto derivado de calostro (*por ejemplo*, aproximadamente 85% ó 60%, por peso combinado del producto derivado de calostro y producto derivado de huevo) que del producto derivado de huevo (aproximadamente 15% ó 40%, en peso). Como otra alternativa, la composición inventiva puede incluir más del producto derivado de huevo (*por ejemplo*, aproximadamente 60% ó 85%, en peso) que del producto derivado de calostro (*por ejemplo*, aproximadamente 40% ó 15% en peso). Como otro ejemplo, una composición que incorpora enseñanzas de la presente invención puede incluir un uno por ciento, en peso, de uno de un producto derivado de calostro y un producto derivado de huevo y aproximadamente 99%, en peso, del otro del producto derivado de calostro y el producto derivado de huevo. Aunque se han proporcionado cantidades específicas del producto derivado de calostro y del producto derivado de huevo, cualquier combinación de éstos está dentro del alcance de la presente invención.

45 Además de incluir una fuente de factor de transferencia (*por ejemplo*, un producto derivado de calostro, un producto derivado de huevo, etc.) una composición que incorpora enseñanzas de la presente invención puede incluir uno o más de otros ingredientes, incluyendo, pero sin limitarse a, vitaminas, minerales, proteínas, productos naturales (*por ejemplo*, hierbas, hongos, raíces, etc., o extractos de éstos), y similares. Los ingredientes adicionales pueden ser útiles para proporcionar ventajas adicionales a sujetos a los que se administra la composición, o puede mejorar la capacidad del factor de transferencia en la composición para estimular o mejorar una hipersensibilidad de tipo retardado, o respuesta inmune secundaria.

50 Como se muestra en la Figura 1, sin limitar el alcance de la presente invención, una composición 10 de acuerdo con la presente invención puede tomar la forma de una sustancia particulada o en polvo, que incluye los múltiples tipos de factores de transferencia (no mostrados). Con el fin de garantizar que una dosificación apropiada y precisa de la composición 10 se administra a un sujeto (no mostrado), la composición 10 puede estar contenida dentro de una cápsula de gelatina 12 de un tipo que es bien conocido y fácilmente disponible para aquellos en la técnica. El resultado es la cápsula ilustrada 14. Alternativamente, una composición de acuerdo con la presente invención puede ser realizada como una tableta, una llamada "capleta," un polvo no encapsulado, un líquido, un gel, o en cualquier otra forma farmacéuticamente aceptable. Los procesos adecuados para la colocación de la composición inventiva en cualquiera de tales formas son fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

60 En una modalidad ilustrativa de un método para fabricar o formar una composición de acuerdo con la presente invención, un primer tipo de factor de transferencia se puede combinar con un segundo tipo de factor de transferencia. Además, uno o más de otros tipos de factores de transferencia se pueden combinar con el primero y segundo tipos de factores de transferencia. Los diferentes tipos de factores de transferencia que se combinan pueden ser factores de transferencia sustancialmente purificados, componentes o "productos" que incluyen factores de transferencia, o cualquier combinación de éstos.

- Volviendo de nuevo a la Figura 2, un proceso para formar cápsulas llenas de composición 14, como la que se muestra en la Figura 1, se proporciona meramente como un ejemplo de un método para preparar una composición que incorpora las enseñanzas de la presente invención. Como se ilustra, la composición 10 se hace y las cápsulas llenas de composición 14 se forman usando el equipo de encapsulación estándar 20 de un tipo conocido en la industria, tales como la máquina de llenado de cápsulas SF-135 disponible de CapPlus Technologies de Phoenix, Arizona.
- Además de una o más tolvas de suministro de composición 24, un tornillo 26 asociado con cada tolva de suministro de composición 24, y una estación de alimentación 28 con la que cada tornillo 26 y el conducto 27 dentro del cual el tornillo 26 está contenido comunica, equipos de encapsulación 20 incluye uno o más tolvas de la cápsula 30, así como un sistema de alimentación neumático 32 para el transporte de los cuerpos de cápsulas 12a y/o tapas 12b para la estación de alimentación 28.
- A medida que el equipo de encapsulación introducirá la mezcla en cápsulas, que pueden ser tragadas por un sujeto, actualmente se prefiere que el componente sustancialmente libre de grasa y el producto derivado de huevo se introduzcan en el equipo de encapsulación en forma de polvo. El componente sustancialmente libre de grasa diluye la cantidad o concentración, de la grasa (*por ejemplo*, a partir de yema de huevo) presente en la mezcla en relación con la concentración de grasa que está presente en el producto derivado de huevo. En consecuencia, las cantidades relativas de producto sustancialmente libre de grasa y el producto derivado de huevo pueden ser adaptadas para proporcionar una concentración de grasa que minimizará la obstrucción del equipo de encapsulación.
- Continuando con el ejemplo de una composición 10 que incluye un producto derivado de calostro 10a como el componente sustancialmente libre de grasa y un producto derivado de huevo 10b, el producto derivado de calostro 10a y producto derivado de huevo 10b pueden introducirse simultáneamente en una sola tolva de alimentación de la composición 24 del equipo de encapsulación 20. Por ejemplo, el producto derivado de calostro 10a y el producto derivado de huevo 10b se pueden mezclar con la introducción de éstos en la tolva de alimentación de la composición 24, como se muestra, o se mezclan antes. Mediante la introducción de una sustancia que tiene un contenido de grasa inferior al producto derivado de huevo 10b en la tolva de alimentación de la composición 24 junto con el producto derivado de huevo 10b, el contenido de grasa (*por ejemplo*, la concentración) de la mezcla resultante es menor que la del producto derivado de huevo 10b, lo que reduce o elimina la probabilidad de que la tolva de suministro de la composición 24, el tornillo 26, el conducto 27, la estación de alimentación 28, o cualquier otro componente del equipo de encapsulación 20 se recubra con el colesterol o la grasa.
- Después de la introducción de una cantidad predeterminada de composición 10 en cuerpos de cápsulas 12a en la estación de alimentación, los cuerpos de cápsula 12a llenos se transportan a una estación de cierre de las cápsulas 34, donde las tapas de las cápsulas 12b se ensamblan con éstas para contener totalmente la composición 10 dentro de cápsulas 12.
- Una vez más, una cápsula llena de composición 14 es sólo un ejemplo de la manera en que una composición que incorpora enseñanzas de la presente invención puede ser realizada. La composición inventiva también puede adoptar otras formas, tales como tabletas, capletas, polvo suelto, líquido, gel, cápsulas rellenas de líquido o rellenos de gel, cualquier otra forma farmacéuticamente aceptable conocida en la técnica, cada una de las cuales puede ser hecha por los procesos conocidos.
- La composición de la presente invención se puede administrar a un sujeto (*por ejemplo*, un mamífero, tal como un humano, un perro, o un gato, un pájaro, un reptil, un pez, etc.) por cualquier proceso adecuado (*por ejemplo*, por vía enteral, parenteral, etc.), dependiendo, por supuesto, de la forma de éstos. Por ejemplo, prácticamente cualquier forma de la composición (*por ejemplo*, una cápsula, tableta, capleta, polvo, líquido, gel, etc.) se puede administrar por vía oral (es decir, a través de la boca del sujeto), a condición de que la composición incluya un portador farmacéuticamente aceptable de un tipo conocido en la técnica que evitará la degradación o la destrucción de las moléculas de factores de transferencia por las condiciones que persisten en el tracto digestivo del sujeto sin interferir sustancialmente con la eficacia de las moléculas de factores de transferencia incluidas en la composición.
- La dosificación de la composición o el factor de transferencia dentro de la composición que se administra al sujeto puede depender de una variedad de factores, incluyendo, sin limitarse, al peso del sujeto, la salud del sujeto, o condiciones (*por ejemplo*, patógenos) a la que el sujeto ha estado expuesto.
- La administración de la composición al sujeto puede hacer que el sistema inmune del sujeto estimule una respuesta inmune mediada por células T contra uno o más antígenos o patógenos. Por lo tanto, la composición puede ser administrada a un sujeto para tratar un estado de enfermedad que el sujeto está experimentando, para evitar que el sujeto exhiba un estado de enfermedad causada por un patógeno en particular, o para mejorar simplemente la salud general del sistema inmune del sujeto y la capacidad para rechazar los patógenos invasores o infectantes.
- Los siguientes EJEMPLOS ilustran la capacidad mejorada de una composición que incluye factores de transferencia de múltiples tipos de animales de origen para estimular que un sistema inmune de un sujeto tratado estimule una



respuesta inmune mediada por células T a varios tipos de patógenos, en la forma de las células diana. Las proporciones usadas en los EJEMPLOS se basan en el peso del material (*por ejemplo*, polvo de huevo, polvo de calostro) usado en una muestra de prueba en particular.

5 Ejemplo 1

En el EJEMPLO 1, una prueba preliminar, las células diana incluye bacterias (*por ejemplo*, *C. pneumoniae* y *H. pylori*) y virus (*por ejemplo*, virus del herpes simple-1 (HSV-1) y virus del herpes simple-2 (HSV- 2)) en la forma de células infectadas por virus, así como células cancerosas, o malignas (*por ejemplo*, células eritroleucémicas K562).

10 La técnica *in vitro* que se usó para hacer estas determinaciones fue el denominado "ensayo de liberación de cromo - 51," que incluye la medición de la cantidad de material radiactivo de cromo -51 (Cr-51) liberado por las células que han sido atacadas por las células NK. La medición de la radiactividad se puede obtener, por ejemplo, con un contador gamma Beckman 2000, que está disponible de Beckman Coulter, Inc., de Fullerton, California.

15 En el EJEMPLO 1, que fue una prueba preliminar, una cantidad fija (5 microgramos por mililitro de medio nutritivo y medio celular) de una composición en polvo se proporcionó en el medio de nutriente y medio celular, junto con una cantidad sustancialmente fija de células NK. Los ejemplos de las composiciones en polvo que se usaron incluyen harina de trigo blanqueada, Transfer Factor™ (TF), disponible de 4Life Research, LLC, de Sandy, Utah, Transfer Factor Plus™ (TFP o TF+), también disponible de 4Life Research, el factor de transferencia aviar disponible en un liofilizado (*es decir*, secado por congelación) polvo de huevo entero, y mezclas de TF y la TFP (tanto la fórmula comercializada en los Estados Unidos y el que se comercializa internacionalmente) con factor de transferencia aviar en una proporción de aproximadamente 85% del TF o la TFP (*es decir*, el factor de transferencia bovino), en peso, a aproximadamente 15% de factor de transferencia aviar, en peso. La composición en polvo, medios nutrientes, células NK, y células diana se mezclaron y se incubaron durante cuatro horas antes de medir los átomos radiactivos que se liberaron por la ruptura de las células diana por las células NK. Cada reacción ilustrativa se llevó a cabo por triplicado, con los resultados de las tres reacciones que tengan que ser promediados.

30 Además de incluir uno o más tipos de factores de transferencia, TF+ incluye una variedad de otros componentes, incluyendo hongos shiitake y maitake, cordyceps, hexafosfato de inositol, beta glucanos, beta sitosterol, y extracto de hoja de olivo. Los hongos shiitake y maitake se sabe que son buenas fuentes de polisacáridos y para promover la función de las células T. Los cordyceps son también ricos en polisacáridos. Los beta-glucanos, otra clase de polisacáridos, también se sabe que son un importante estimulador de células inmunes.

35 La siguiente TABLA incluye los datos de los recuentos por minuto obtenidos con cada combinación de células diana y composición en polvo, así como la efectividad de cada composición en polvo en estimular una respuesta inmune mediada por células NK contra las células diana con relación a la respuesta inmune mediada por células NK con respecto a (medida en por ciento de aumento) los mismos tipos y concentraciones de células diana en presencia de la harina de trigo blanqueada.

40 Ejemplo 1

TABLA 1  
Células objetivo

Composición	C. Pneu	H. Pyl	K562	HSV-1	HSV-2
Espontáneo	1,256/	1,875/	1,620/	974/	1,476/
Harina	1,323/	1,121/	1,267/	2,017/	1,262/
Promedio	1,290/	1,498/	1,444/	1,496/	1,365/
TF	2,593/	2,499/	2,445/	2,240/	2,473/
% incremento sobre la harina	96%	123%	93%	11%	96%
% incremento sobre el promedio	101%	67%	69%	50%	81%
TF+	3,386/	2,701/	3,243/	2,944/	1,956/
% incremento sobre la harina	156%	141%	156%	46%	55%
% incremento sobre el promedio					

Composición	Células objetivo				
	C. Pneu	H. Pyl	K562	HSV-1	HSV-2
	163%	80%	125%	97%	43%
Bov-Av TF	14,857/	11,434/	6,639/	17,910/	10,626/
<i>% incremento sobre la harina</i>	1023%	920%	424%	788%	742%
<i>% incremento sobre el promedio</i>	1052%	663%	360%	1098%	679%
Bov-Av TF+ US	6,196/	5,543/	4,008/	8,050/	4,693/
<i>% incremento sobre la harina</i>	458%	485%	306%	389%	362%
<i>% incremento sobre el promedio</i>	380%	270%	178%	438%	244%
Bov-Av TF+ Intl	5,747/	4,786/	3,640/	7,366/	4,269/
<i>% incremento sobre la harina</i>	424%	417%	277%	355%	328%
<i>% incremento sobre el promedio</i>	346%	219%	152%	393%	213%
100% TF aviar	2,553/	1,860/	2,483/	2,985/	2,183/
<i>% incremento sobre la harina</i>	93%	66%	96%	48%	73%
<i>% incremento sobre el promedio</i>	98%	24%	72%	100%	60%

5 Notablemente, las formulaciones denominadas "TF+" incluyen sólo aproximadamente la mitad (0.466667) del factor de transferencia como el presente en las formulaciones denominadas "TF." En consecuencia, el experto en la técnica podría esperar los datos que corresponden a la citotoxicidad inducida por los productos identificados como "Bov-Av TF+ US" y "Bov-Av TF+ Intl" sean algo menor que la citotoxicidad inducida por el producto identificado como Bov-Av TF. En su lugar, estas cifras fueron muy superiores. De hecho, parece que los datos que corresponden a "Bov=Av TF+ US" y "Bov-Av TF+ Intl", como aproximadamente diez veces demasiado alto. En consecuencia, correcciones apropiadas han sido hechas a la TABLA 1. Además, se ha realizado comprobación adicional, como es evidente de los ejemplos resultantes, para evaluar y verificar las capacidades de las combinaciones de diferentes tipos de factores de transferencia para estimular respuestas de las células T en los animales tratados.

15 Los resultados preliminares que se exponen en la TABLA 1 muestran que la administración de una composición de la presente invención a un sujeto es probable que aumente la respuesta inmune secundaria o hipersensibilidad de tipo retardado del sujeto, como se efectúa por las células NK, contra uno o más patógenos a un grado que excede por mucho la actividad de las células NK iniciada tanto por el factor de transferencia derivado de calostro como por el factor de transferencia derivado de huevo solos. De hecho, los resultados muestran que una composición que incorpora enseñanzas de la presente invención puede resultar en la facilitación de la actividad de las células de NK con un grado inesperado de sinergia.

20 En vista de estos resultados, la experimentación adicional se llevó a cabo para determinar la eficacia de una variedad más amplia de los aspectos de la presente invención.

## Ejemplo 2

Se evaluaron los efectos de diversas composiciones de factores de transferencia, incluyendo composiciones que incorporan las enseñanzas de la presente invención, en la actividad de los linfocitos en atacar las células cancerosas. La Figura 3 representa esquemáticamente el protocolo para la evaluación. Se obtuvo sangre de donantes sanos, en la referencia 40. Las células mononucleares, incluyendo las células asesinas naturales, se separaron de otros componentes de la sangre, en el carácter de referencia 42, mediante la metodología estándar de ficol-urografina, empleando un gradiente de densidad  $\rho = 1,077 \text{ g/cm}^3$ . Las células mononucleares aisladas, o "células efectoras," en una dilución de aproximadamente 60,000 células/100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo, se introdujeron después en alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos, tal como la disponible de Corning Incorporated de Corning, Nueva York, bajo el nombre comercial COSTAR<sup>®</sup>, como se muestra en el carácter de referencia 44.

Después de eso, las muestras de prueba que contienen factor de transferencia o "aditivos", como se señala en las TABLAS 2 a 5 más abajo, se introdujeron en cada pocillo, con concentraciones resultantes de las muestras de prueba que fueran 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml, 0.0001 mg/ml, y 0.00001 mg/ml, como se muestra también en el carácter de referencia 44. También se empleó un control que no incluye ningún producto de factor de transferencia. Las placas de microtitulación se colocaron después en una incubadora de CO<sub>2</sub> con condiciones de atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, 100% de humedad, y una temperatura de 37 °C, y se incubaron durante períodos de 24 horas y 48 horas. Cada variante de estudio se realizó por triplicado.

Después de la incubación, alrededor de 30,000 células tumorales K-562 (*es decir*, de leucemia eritroblástica humana), o "células diana," se introdujeron en cada pocillo, como se ilustra en el carácter de referencia 46, que proporciona una proporción de células efectoras-células diana de aproximadamente 2:1. Las células efectoras y diana se incubaron después durante períodos de 18 horas y 24 horas en la incubadora de CO<sub>2</sub>, bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

Después de eso, en el carácter de referencia 48, el método de MTT de definir la viabilidad de los cultivos celulares, que emplea un bromuro amarillo soluble, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-tetrazol (MTT), se usó, para determinar el número de células tumorales K-562 que murieron en cada pocillo. En esta prueba, las células vivas reducen el MTT a los cristales intracelulares púrpura-azules insolubles de MTT-formazan (MTT-f). Las células muertas no viables no son capaces de reducir el MTT a MTT-f. Por lo tanto, las propiedades ópticas de la solución resultante pueden ser evaluados para proporcionar una indicación de afectación de diversos productos que contienen factores de transferencia en la capacidad de las células efectoras para destruir las células tumorales K-562. Más específicamente, la intensidad de la transformación de MTT en MTT-f refleja el nivel general de actividad deshidrogenasa de las células estudiadas y es modulada por la actividad de los sistemas de fermentación conjugados; *por ejemplo*, la cadena respiratoria de transmisión de electrones, etc.

La solución de MTT usada en este EJEMPLO se preparó en 5 mg/ml de solución salina de Henks, como se conoce en la técnica. Las alícuotas de igual volumen de la solución de MTT se introdujeron en los pocillos de las placas de microtitulación, y las placas se incubaron en una incubadora de CO<sub>2</sub>, bajo las mismas condiciones señaladas anteriormente, durante un período de aproximadamente de tres a aproximadamente cuatro horas. Las placas de microtitulación se centrifugaron después a aproximadamente 1500 rpm durante aproximadamente 5 minutos, se retiró el sobrenadante, y se introdujeron alícuotas de 150  $\mu\text{l}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) en los pocillos.

Las placas de microtitulación después se aceptaron para situarse a temperatura ambiente durante un período de treinta minutos, permitiendo disolver completamente los cristales de formazan. Después de eso, se usó un espectrofotómetro de múltiples pocillos (LABSYSTEMS MultiScan MSS 340, disponible de Cambridge Scientific Products de Cambridge, Massachusetts) para evaluar cada pocillo de cada placa de microtitulación a una longitud de onda de 540 nm.

Como se muestra en el carácter de referencia 50, las mediciones de densidad óptica (OD) que se obtuvieron con el espectrofotómetro se usaron después para calcular el índice citotóxico (%) (CI (%)) de cada pocillo. El cálculo de CI (%) se realizó de acuerdo a la fórmula estándar:

$$CI (\%) = [1 - (OD_{e+t} - OD_e) / OD_t] * 100,$$

donde  $OD_{e+t}$  es la OD en series experimentales,  $OD_e$  es la OD en los pocillos, incluyendo sólo las células efectoras, y  $OD_t$  es la OD en los pocillos, incluyendo sólo las células diana.

TABLA 2

aditivo	CI (%) a 24 Horas					
	1 mg/ml	10 <sup>-1</sup> mg/ml	10 <sup>-2</sup> mg/ml	10 <sup>-3</sup> mg/ml	10 <sup>-4</sup> mg/ml	10 <sup>-5</sup> mg/ml
TF (bovino)	35	17	29	18	18	15
TF+ (formulación internacional)	13.5	20.3	35	28.5	10	20.3
TF+ (85:15, calostro: aviar)	13.3	10.6	29	30	21.6	76
TF (70:30, calostro: aviar)	80	47	24	12	30	26.3
TF (aviar)	16	37	47	47	16.1	34.3
Ninguno (muerte celular espontánea) (± 6%)	18	18	18	18	18	18

TABLA 3

aditivo	% Incremento en CI (sobre el CI espontáneo) a 24 Horas					
	1 mg/ml	10 <sup>-1</sup> mg/ml	10 <sup>-2</sup> mg/ml	10 <sup>-3</sup> mg/ml	10 <sup>-4</sup> mg/ml	10 <sup>-5</sup> mg/ml
TF (bovino)	94	-6	61	0	0	-17
TF+ (formulación internacional)	-25	13	94	58	-44	13
TF+ (85:15, calostro: aviar)	-26	-41	61	67	20	322
TF (70:30, calostro: aviar)	344	161	33	-33	67	46
TF (aviar)	-11	106	161	161	-11	91
Ninguno (muerte celular espontánea) (± 6%)	0	0	0	0	0	0

5

TABLA 4

aditivo	CI (%) a 48 Horas					
	1 mg/ml	10 <sup>-1</sup> mg/ml	10 <sup>-2</sup> mg/ml	10 <sup>-3</sup> mg/ml	10 <sup>-4</sup> mg/ml	10 <sup>-5</sup> mg/ml
TF (bovino)	19.3	50	54.7	15.3	40.7	11.3
TF+ (formulación internacional)	23.3	12	17	42	48	62
TF+(85:15)	48	82.7	96.7	69.4	54	91
TF (70:30)	97	94	99	90	96	91
TF (aviar)	68	49	45	35	58	70
Ninguno (muerte celular espontánea) (± 6%)	18	18	18	18	18	18

TABLA 5

aditivo	% Incremento en CI (sobre el CI espontáneo) a 48 Horas					
	1 mg/ml	10 <sup>-1</sup> mg/ml	10 <sup>-2</sup> mg/ml	10 <sup>-3</sup> mg/ml	10 <sup>-4</sup> mg/ml	10 <sup>-5</sup> mg/ml
TF (bovino)	7	178	204	-15	126	-37
TF+ (formulación internacional)	29	-33	-6	133	167	244
TF+ (85:15, calostro: huevo)	167	359	437	286	200	406
TF (70:30, calostro: huevo)	439	422	450	400	433	406
TF (aviar)	278	172	150	94	222	289
Ninguno (muerte celular espontánea) (± 6%)	0	0	0	0	0	0

10 Los datos proporcionados en las TABLAS 2 a 5 confirma que la mayoría de las muestras de prueba (es decir, composiciones que contienen factores de transferencia) estimularon la actividad citotóxica y antitumoral aumentada

(en relación a la muerte celular tumoral espontánea) de los linfocitos de donantes sanos contra las células tumorales K-562.

5 El mayor efecto estimulante aparece en los resultados de 48 horas, con el intervalo más efectivo de las concentraciones estimulantes que es desde aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 0.0001 mg/ml. Las muestras de prueba que incluyeron tanto el factor de transferencia derivado de calostro como el factor de transferencia derivado de huevo parecen ser una vez más el más efectivo en las condiciones dadas del experimento, lisando tantas como 80-98% de las células tumorales K-562.

10 Además los resultados de la TABLA 5 indican que las combinaciones de diferentes tipos de factores de transferencia, particularmente la proporción de 85:15 de TF+ con factor de transferencia derivado de huevo, pueden ser más efectivos que otras rutas de terapia para eliminar células no deseadas y patógenos del cuerpo de un animal tratado. Más específicamente, considerando que los inventores son conscientes, en las comprobaciones equivalentes, los mejores resultados que podrían lograrse con tratamiento de interleucina-2 han sido la citotoxicidad de 76% de las células tumorales K-562 con una incubación de 24 horas (lo que equivale a un aumento del 322% más de muertes espontáneas de tales células) y una citotoxicidad de 88% de las células tumorales K-562 con una incubación de 48 horas (lo que equivale a un aumento de 389% más de muertes espontáneas de tales células).

20 Ejemplo 3

Se realizó otro ensayo de confirmación para verificar los resultados mencionados anteriormente y de evaluar los efectos de una mayor variedad de composiciones de la presente invención en inducir a las NK y otras células mononucleares a matar las células tumorales K-562. El mismo protocolo descrito en el EJEMPLO 2 fue empleado en las pruebas del

25 Ejemplo 3.

Los resultados de periodos de incubación de 24 y 48 horas para una variedad de formulaciones de composiciones, incluyendo cada polvo de huevo y polvo de calostro bovino, se enumeran en las TABLAS de 6 a 9.

30

TABLA 6

calostro: huevo	CI (%) a 24 Horas				
	1 mg/ml	10 <sup>-1</sup> mg/ml	10 <sup>-2</sup> mg/ml	10 <sup>-3</sup> mg/ml	10 <sup>-4</sup> mg/ml
85:15	45	29	67.5	28	50
50:50	67.5	23	66	63.5	22.5
30:70	64.6	68.8	39.1	45.6	44
15:85	55.2	28	20.1	20	18.8
Ninguno (muerte celular espontánea) (± 6%)	18	18	18	18	18

TABLA 7

calostro: huevo	% Incremento en CI (sobre el CI espontáneo) a 24 Horas				
	1 mg/ml	10 <sup>-1</sup> mg/ml	10 <sup>-2</sup> mg/ml	10 <sup>-3</sup> mg/ml	10 <sup>-4</sup> mg/ml
85:15	150	61	275	56	178
50:50	275	28	267	253	25
30:70	259	282	117	153	144
15:85	207	56	12	11	4
Ninguno (muerte celular espontánea) (± 6%)	0	0	0	0	0

TABLA 8

calostro: huevo	CI (%) a 48 Horas				
	1 mg/ml	10 <sup>-1</sup> mg/ml	10 <sup>-2</sup> mg/ml	10 <sup>-3</sup> mg/ml	10 <sup>-4</sup> mg/ml
85:15	46	60	69	67	64
50:50	69	74	74	63	49
30:70	75	83	67	63	45
15:85	77	69	51	42	40
Ninguno (muerte celular espontánea) (± 6 %)	18	18	18	18	18

TABLA 9

calostro: huevo	% Incremento en CI (sobre el CI espontáneo) a 48 Horas				
	1 mg/ml	10 <sup>-1</sup> mg/ml	10 <sup>-2</sup> mg/ml	10 <sup>-3</sup> mg/ml	10 <sup>-4</sup> mg/ml
85:15	156	233	283	272	256
50:50	283	311	311	250	172
30:70	317	361	272	250	150
15:85	328	283	183	133	122
Ninguno (muerte celular espontánea) (± 6%)	0	0	0	0	0

5 Los datos de las TABLAS 6 a 9, particularmente de las TABLAS 6 y 8, muestran que cuando más factor de transferencia derivado del calostro está presente en una composición de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, 85:15), la respuesta inicial (prueba de 24 horas) es mayor que la respuesta generada por las composiciones que incluyen menos factor de transferencia derivado de calostro, pero no aumenta significativamente con el tiempo (prueba de 48 horas). Estos resultados sugieren que la anergia (es decir, la sensibilidad reducida) para el factor de transferencia derivado de bovino puede ocurrir relativamente rápido.

10 Las composiciones (por ejemplo, 50:50 y 30:70) que incluyen más factores de transferencia derivado de huevo proporcionan resultados a corto plazo comparables (prueba de 24 horas), pero ofrecen resultados mucho mejores a largo plazo (prueba de 48 horas).

15 Estos resultados apoyan la teoría que combinar diferentes tipos de factores de transferencia proporciona un efecto sinérgico. Ellos también indican que las proporciones de los diferentes tipos de factores de transferencia en una composición se pueden adaptar para proporcionar un resultado deseado.

20 Ejemplo 4

TABLA 10

		CI (%)					
		1 mg/ml	10 <sup>-1</sup> mg/ml	10 <sup>-2</sup> mg/ml	10 <sup>-3</sup> mg/ml	10 <sup>-4</sup> mg/ml	10 <sup>-5</sup> mg/ml
24 hrs.	TF+ (85:15) (calostro: huevo)	13.3	10.6	29	30	21.6	7
	85:15 (calostro: huevo)	45	29	67.5	28	50	
48 hrs.	TF+ (85:15) (calostro: huevo)	48	82.7	96.7	69.4	54	9
	85:15 (calostro: huevo)	46	60	69	67	64	

25 El EJEMPLO 4 compara los datos obtenidos en los EJEMPLOS 2 y 3 anteriormente para ilustrar que la inclusión de componentes adicionales, principalmente polisacáridos, en TF+ mejora la eficiencia con la que una composición que incorpora enseñanzas de la presente invención induce células NK y otras mononucleares de la sangre para matar a células tumorales K-562 y, por lo tanto, estimula una respuesta inmune secundaria.

5 Notablemente, en la prueba de 48 horas, donde se incluyeron polisacáridos, la citotoxicidad fue mayor en todas las diluciones por encima de 0.0001 mg/ml que en composiciones comparables que carecen de polisacáridos. Por lo tanto, los polisacáridos se cree que lo mismo aumentan el sinergismo con el que los dos o más tipos de factores de transferencia actúan o proporcionan sinergia adicional en la estimulación de una respuesta inmune secundaria.

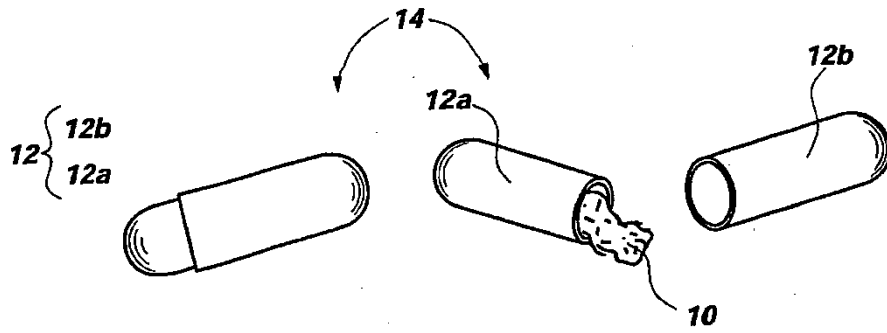
10 Aunque la descripción anterior contiene muchos detalles específicos, estos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención, sino meramente para proporcionar ilustraciones de algunas de las modalidades actualmente preferidas. Las características de diferentes modalidades se pueden emplear en combinación. El alcance de la invención es, por lo tanto, indicado y limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas en lugar de por la descripción anterior. Todas las adiciones, deleciones y modificaciones de la invención como se describe en la presente que entren dentro del significado y alcance de las reivindicaciones han de estar abarcados por ellas.

**REIVINDICACIONES**

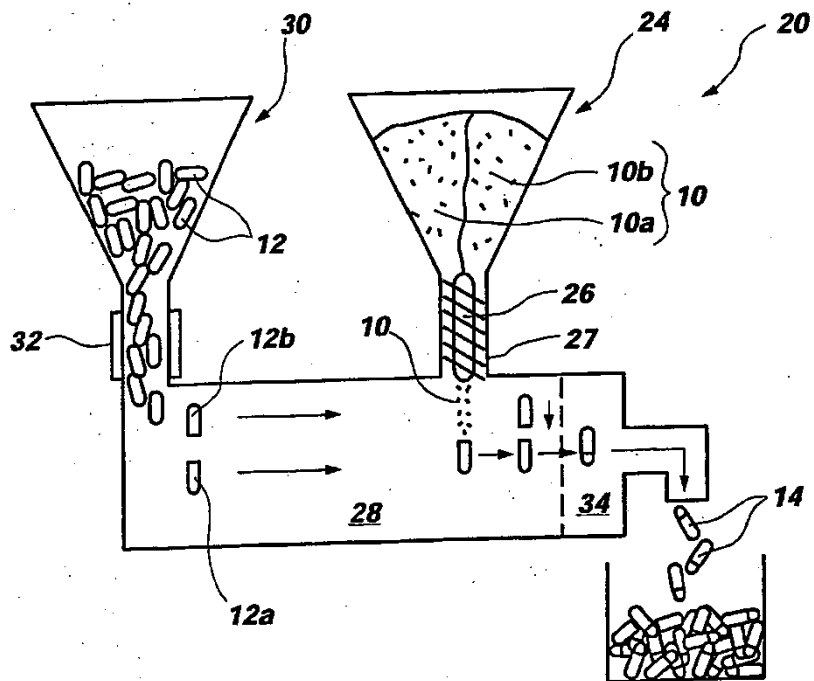
1. Una composición para iniciar una respuesta mediada por la célula T en un sujeto, que comprende:
- 5 factor de transferencia bovino; y  
factor de transferencia de pollo.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde el factor de transferencia bovino es un producto derivado del calostro.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde el factor de transferencia de pollo es un producto derivado del huevo.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde un peso combinado del factor de transferencia bovino y del factor de transferencia de pollo comprende tanto como aproximadamente 99%, en peso, del factor de transferencia bovino y tan poco como aproximadamente 1%, en peso, del factor de transferencia de pollo.
- 15 5. La composición de la reivindicación 4, en donde un peso combinado del factor de transferencia bovino y el factor de transferencia de pollo comprende aproximadamente 85%, en peso, del factor de transferencia bovino y aproximadamente 15%, en peso, del factor de transferencia de pollo.
- 20 6. La composición de la reivindicación 4, en donde un peso combinado del factor de transferencia bovino y del factor de transferencia de pollo comprende aproximadamente 60%, en peso, del factor de transferencia bovino y aproximadamente 40%, en peso, del factor de transferencia de pollo.
- 25 7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde un peso combinado del factor de transferencia bovino y del factor de transferencia de pollo comprende tan poco como aproximadamente 1%, en peso, del factor de transferencia bovino y tanto como aproximadamente 99%, en peso, del factor de transferencia de pollo.
- 30 8. La composición de la reivindicación 7, en donde un peso combinado del factor de transferencia bovino y del factor de transferencia de pollo comprende aproximadamente 15%, en peso, del factor de transferencia bovino y aproximadamente 85%, en peso, del factor de transferencia de pollo.
- 35 9. La composición de la reivindicación 7, en donde un peso combinado del factor de transferencia bovino y del factor de transferencia de pollo comprende aproximadamente 40%, en peso, del factor de transferencia bovino y aproximadamente 60%, en peso, del factor de transferencia de pollo.
- 40 10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que incluyen aproximadamente cantidades iguales, en peso, del factor de transferencia bovino y del factor de transferencia de pollo.
11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que además comprende un polisacárido.
- 45 12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, caracterizada además porque el factor de transferencia bovino se genera por una vaca en una respuesta inmune mediada por células T a un primer conjunto de agentes antigénicos a los que la vaca se ha expuesto y el factor de transferencia de pollo generado por un pollo en una respuesta inmune mediada por células T a un segundo conjunto de agentes antigénicos a los que el pollo se ha expuesto, el primer conjunto de agentes antigénicos y el segundo conjunto de agentes antigénicos, que incluyen al menos un agente antigénico poco común.
- 50 13. Un método para formar una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende combinar el factor de transferencia bovino y el factor de transferencia de pollo.
- 55 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13 cuando depende de las reivindicaciones 2 y 3, que comprende:
- 60 combinar el producto derivado de calostro con el producto derivado de huevo antes o durante la introducción del producto derivado de huevo en el equipo de encapsulación para formar cápsulas llenas de la composición.
15. El método de la reivindicación 14, caracterizado además porque la combinación comprende la combinación de aproximadamente pesos iguales del producto derivado de calostro y del producto derivado de huevo.



- 5
16. El método de la reivindicación 14, caracterizado además porque combinar comprende combinar el producto derivado de calostro en una cantidad mayor, en peso, del producto derivado de huevo con el producto derivado de huevo.
17. El método de la reivindicación 14, caracterizado además porque combinar comprende combinar el producto derivado de calostro, en una cantidad menor, en peso, del producto derivado de huevo con el producto derivado de huevo.
- 10
18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14-17, que comprende además:  
desgrasar el producto derivado de huevo.
- 15
19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14-18, que comprende además:  
combinar al menos un polisacárido con al menos uno del producto derivado de huevo y dicho producto derivado de calostro.



**FIG. 1**



**FIG. 2**

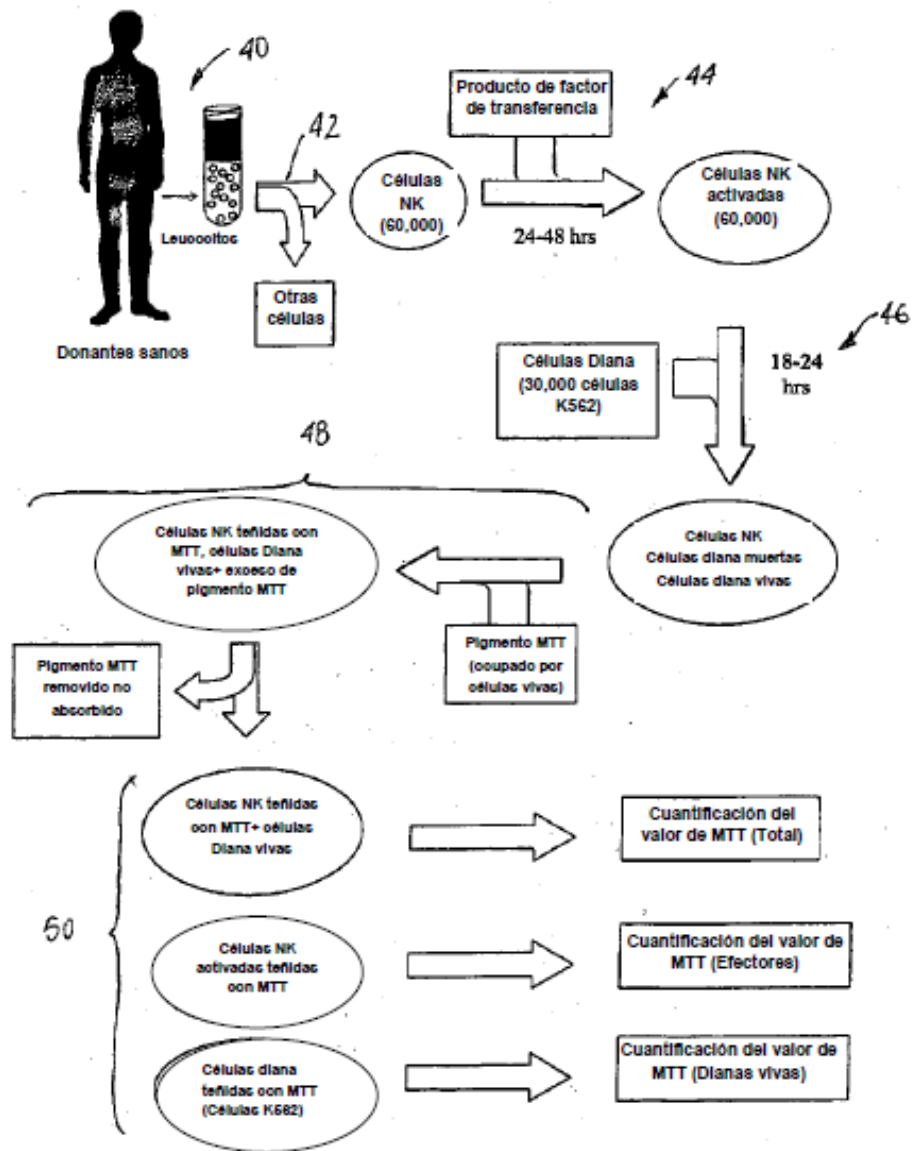


FIG. 3